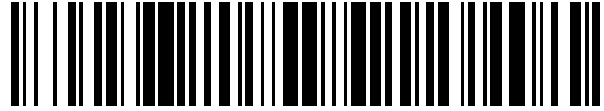


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 866**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12721758 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2705158**

54 Título: **Procedimiento para la detección de aberraciones cromosómicas**

30 Prioridad:

02.05.2011 DE 102011100242

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

15.09.2016

73 Titular/es:

ZYTOVISION GMBH (100.0%)

Fischkai 1

27572 Bremerhaven, DE

72 Inventor/es:

HAUKE, SVEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 866 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de aberraciones cromosómicas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de varias regiones diferentes de cromosomas o ADN en una célula para la detección de aberraciones cromosómicas estructurales, presentando las aberraciones cromosómicas al menos dos regiones de puntos de ruptura dentro de un cromosoma, basadas en fragmentos de ácidos nucleicos marcados de forma directa o indirecta (sondas) y a un preparado adecuado para este procedimiento.

10 Muchas enfermedades tumorales se basan en mutaciones cromosómicas estructurales tales como translocaciones, inversiones y duplicaciones de segmentos. La detección de estas modificaciones como marcador predictivo, de pronóstico o de diagnóstico diferencial tiene lugar, por norma general, mediante hibridaciones in situ (ISH) utilizando fragmentos de ácidos nucleicos marcados por fluorescencia (ISH fluorescente (FISH)), las denominadas sondas, o sondas marcadas con haptenos que, a continuación, son detectadas con anticuerpos y son visualizadas al microscopio óptico mediante reacciones de color (ISH de campo claro (BrISH) – a ellas pertenecen también ISH cromógena (CISH) e ISH de plata (SISH)).

15 La ventaja de las FISH es en este caso que sin una complejidad en la realización del método pueden detectarse simultáneamente, pero de forma claramente diferenciable entre sí, múltiples regiones genómicas. Para ello, fragmentos de ácidos nucleicos que se dirigen a diferentes regiones genómicas, son marcados, es decir, acoplados con colorantes de fluorescencia diferentes que se diferencian entre sí en su espectro de absorción y/o emisión. Si sondas multicolores de este tipo se utilizan, p. ej., en preparados de cromosomas metafásicos o en preparados de núcleos celulares de interfase, entonces los distintos colores pueden ser representados de manera separada entre sí mediante el empleo de conjuntos de filtro de microscopio específicos que conducen a intervalos, definidos con precisión, de longitudes de onda de la luz para la excitación de los colorantes en el preparado, así como permiten el paso de intervalos, definidos con precisión, de longitudes de onda de la luz emitida por los colorantes al analizador (el denominado conjunto de filtro pasabanda sencillo) o bien se representan al mismo tiempo las diferentes señales de fluorescencia de varios fragmentos (en el caso de dos colorantes de fluorescencia diferentes se habla en este caso de un conjunto de filtro pasabanda dual).

30 A la representación simultánea se le han impuesto, sin embargo, claros límites, dado que las regiones de absorción y emisión de los colorantes se encuentran a menudo tan próximas que no pueden ser separadas una de otra por los conjuntos de filtro del microscopio. Además, dos señales de diferentes colores que se superponen conducen a la percepción de colores mixtos (p. ej., rojo (o naranja) y verde proporcionan en este caso amarillo) que no se pueden diferenciar de señales del mismo color que son el resultado de otro fluorocromo y que no resultaron por solapamiento. Por estos motivos, en la FISH rutinaria se observan simultáneamente la mayoría de las veces solamente dos colores (naranja/rojo y verde) o bien tres colores (naranja/rojo y verde simultáneamente con una coloración opuesta del núcleo azul (DAPI)). Aproximadamente las mismas limitaciones que se establecen para la FISH son válidas para la BrISH. En este caso, es estado conocido de la técnica el uso de dos haptenos, la mayoría de las veces elegidos del grupo biotina, dinitrofenilo (DNP) y digoxigenina y dos enzimas acopladas a anticuerpos, la mayoría de las veces fosfatasa alcalina y peroxidasa (Carbone et al., J. Mol. Diagn. 2008, 10(6): 527-536; Hopman et al., Histochem. Cell Biol. 1997, 108(4-5) 291-298; Laakso et al., J. Pathol. 2006, 210(1):3-9; Mayr et al., Histopathology 2009, 55(6): 716-723; Tanner et al., Am. J. Pathol. 2000, 157(5): 1467-1472).

40 Las limitaciones mencionadas en el caso de la representación simultánea tienen una influencia decisiva sobre las composiciones de las sondas para la detección de translocaciones e inversiones. En este caso existen, en principio, dos técnicas decisivas y composiciones de sondas en la que se fundamentan. El principio de la formación de señales de fusión (las denominadas estrategias de color dual-fusión dual) (documento WO 02093130, Dewald et al., Blood 1998, 91(9): 3357-3365; Dewald et al., Cancer Genet. Cytogenet. 2000, 116(2): 97-104; Wan et al., J. Clin. Pathol. 2003, 56(6): 471-474) o bien de señales de fusión que se separan (las denominadas estrategias de color dual-separación o bien color dual-escisión (van der Burg et al., Leukemia 1999, 13(12): 2107-2113; Boomer et al., Leukemia 2001, 15(1): 95-102; van der Burg et al., Leukemia 2004, 18(5): 895-908). En la subsiguiente representación de estos dos principios y modelos de señales derivados se ha de tener en cuenta que una célula normal es, por norma general, diploide, es decir, cada uno de los alelos está presente por duplicado. Dado que, por norma general, por las aberraciones sólo se ve afectado uno de los dos alelos, junto a la señal aberrante se pueden visualizar, por norma general, también todavía la señal normal del alelo no afectado por la aberración. Para una mejor comprensión, en lo que sigue se describe el modelo de señal de la señal normal, no siempre explícitamente.

55 En el caso de las estrategias de color dual-fusión dual la región del punto de ruptura 1 es flanqueada proximal y distalmente por fragmentos de ácidos nucleicos del mismo color (p. ej., naranja), la región del punto de ruptura 2, es decir, del participante recíproco en la translocación, es flanqueada de forma proximal y distal por fragmentos de ácidos nucleicos de un segundo color (p. ej., verde). La situación normal, es decir, sin roturas cromosómicas en la región de los dos participantes en la translocación, se caracteriza en este caso por una señal verde y una señal naranja separada en el espacio.

En el caso de una translocación recíproca se producen roturas dentro de los puntos de ruptura de los dos participantes en la translocación, y la región proximal de uno de los participantes en la translocación se fusiona con la región distal del otro participante, y viceversa. Por consiguiente, resultan dos pares de señales verde/naranja, denominadas también señales de fusión, dado que a menudo se solapan las señales de diferente color de modo que se visualiza una señal de color mixto. El inconveniente de estas técnicas de sondas es que las señales de fusión sólo se forman cuando los puntos de ruptura de los dos participantes en la translocación se encuentran en la región de los fragmentos de ácidos nucleicos marcados respectivos. En el caso de translocaciones que afectan sólo a uno de los dos participantes, no se forman señales de fusión. En este caso, se produce únicamente la formación de una señal adicional con el color de la señal que es característico para el participante afectado por la translocación. Es decir, p. ej., se forma una señal verde adicional cuando el punto de ruptura de la translocación se encuentra en la región que fue cubierta por los ácidos nucleicos marcados con el fluorocromo verde. Señales adicionales de este tipo pueden ser cubiertas, sin embargo, a menudo por otros núcleos celulares, encontrarse próximas en el caso de una de las otras señales del mismo color y, por consiguiente, no percibirse como señal adicional, o perderse por artefactos de corte de tejidos. En este caso, puede producirse un diagnóstico falso, dado que no se percibe una translocación que afecta a sólo uno de los participantes en la translocación.

En el caso de las estrategias de color dual-rotura la región de un punto de ruptura es flanqueada de modo proximal y distal por fragmentos de ácidos nucleicos marcados de manera diferente o marcados con color (p. ej., naranja distal, verde proximal). La situación normal, es decir, sin una ruptura cromosómica de esta región se caracteriza en este caso por una señal de fusión. En una situación aberrante, es decir, cuando se produce una ruptura cromosómica entre los fragmentos de sondas, las señales se separan una de otra en el espacio. La diferencia entre la situación normal y la situación aberrante se caracteriza, por lo tanto, por la distancia de señales de distinto color.

El inconveniente de estas composiciones de sondas es que no son posibles afirmaciones sobre los participantes en la translocación implicados. Además, condicionado por el eje de visión con el que el observador mira el núcleo celular en interfase, puede suceder que dos señales separadas en el espacio que, en relación con el eje de visión, se encuentren superpuestas, sigan siendo percibidas como señal de fusión.

Junto a las aplicaciones de dos colores arriba mencionadas, se utilizan en los análisis de FISH también sondas de tres colores, cuatro colores y cinco colores. En este caso, junto a los colores de fluorescencia convencionales claramente más intensos naranja/rojo y verde se utilizan los otros colores disponibles más débiles, p. ej., oro o rojo o azul. Por lo tanto, en aplicaciones rutinarias se utilizan, por ejemplo, sondas de FISH de cuatro colores sólo para la detección de deleciones o amplificaciones (documentos EP 1035215B1, WO 2007/028031, EP 0549709B1), ya que en este caso, la mayoría de las veces en el caso de las marcaciones de las sondas, sólo se puede recurrir a secuencias repetitivas para el refuerzo de las intensidades de color, p. ej., de azul y oro.

Las estrategias de FISH triples descritas por Fink et al. (Leuk. Res. 2009, 33(6): 843-846) se dirigen a la detección de sucesos de translocación diferentes que pueden asociarse uno junto a otro en una región cromosómica (es decir, están afectados diferentes genes que se encuentran en la vecindad). En este caso, para la correspondiente evaluación de los modelos de señales se consideran en cada caso sólo dos colores que detectan una aberración individual, no jugando entonces papel alguno respectivo el tercer color.

En relación con la BrISH utilizando más de dos colores, Hopman et al. (Histochem. Cell Biol. 1997, 108(4-5):291-298) describe una realización de una hibridación in situ triple cromógena que, en general, fija como objetivo la detección de tres regiones cromosómicas repetitivas. De acuerdo con el estado actual de la técnica, las translocaciones se detectan mediante BrISH sólo utilizando dos haptenos y, por consiguiente, dos colorantes.

Asimismo, se desconoce el uso del método BrISH para la detección de inversiones e inserciones.

Las inversiones y, en particular, las pequeñas inversiones no pueden ser detectadas con las técnicas y procedimientos que se describen en las solicitudes de patente WO 02093130A3 y WO 2005/111235 A2. El documento WO 2005/111235 A2 describe un procedimiento que presenta el uso de sondas de tres colores. Sin embargo, la región del cromosoma que es marcada por el 3^{er} marcador de una sonda, no se ve afectada directamente por la modificación, de modo que en el caso de una modificación estructural del cromosoma se elimina la primera señal de fusión y, en este caso, se forma una nueva señal de disociación y una nueva señal de fusión. Este suceso, en el caso de inversiones, en particular inversiones pequeñas, no se puede diferenciar o sólo se diferencia muy mal de una situación normal.

El documento WO 02093130A3 da a conocer un procedimiento para la detección de translocaciones cromosómicas utilizando dos o bien cuatro marcadores/colorantes, en este caso, las sondas se hibridan en diferentes cromosomas. Este procedimiento se adecúa sólo de forma condicionada para la detección de inversiones. Además, el proceso de evaluación es claramente más complicado en virtud de la pluralidad de las señales que se pueden derivar de los cuatro marcadores/colorantes.

Además, el documento WO 2009/102446 A2 se refiere a procedimientos y composiciones especialmente para la detección de inversiones cromosómicas entre EML4 y ALK mediante FISH, pudiendo emplearse la hibridación in situ de fluorescencia descrita en el mismo, en particular para fines diagnósticos y de pronóstico, así como para

estrategias terapéuticas. Para el procedimiento de detección se emplean únicamente dos sondas para una estrategia de color dual-fusión sencilla.

5 Además, Osoegawa Atsushi et al. describen, en el marco de la publicación científica "Incidentally proven pulmonary ALKoma" publicada en Intern. Med. 2010, un procedimiento para la detección de inversiones EML4-ALK mediante FISH que se basa en una estrategia de señal de disociación o bien una estrategia de color dual-rotura con dos sondas.

10 Todos los métodos y composiciones de sondas para BrISH y FISH disponibles actualmente en relación con inversiones, en particular, pero no limitadas a las mismas, en el caso de tumores tienen carencias. No existen composiciones de sondas y métodos y sus modelos de señales resultantes que permitan en cualquier caso el reconocimiento seguro de una inversión. En particular, en el caso de pequeñas inversiones, es decir, inversiones de segmentos genómicos cortos (por ejemplo, regiones menores que 20 Mb), este suceso de aberración no es reconocido la mayoría de las veces.

15 Por lo tanto, es misión de la presente invención proporcionar un procedimiento con el que se posibilite una detección más segura de aberraciones cromosómicas estructurales, presentando las aberraciones cromosómicas al menos dos regiones de puntos de ruptura dentro de un cromosoma.

Para la solución del problema, se propone un procedimiento del tipo mencionado al comienzo, en el que

- una primera sonda marcada con un marcador A (sonda A) y una segunda sonda marcada con un marcador B (sonda B) flanquean una región de punto de ruptura 1 que forman señales de fusión A-B y
- 20 - dos tercera y cuanta sondas (sondas C) marcadas con un marcador C flanquean una región de punto de ruptura 2 que forman las señales de fusión C-C, modificándose las señales de fusión antes mencionadas, en el caso de una aberración cromosómica, en señales de fusión A-C y señales de fusión B-C.

La región del punto de ruptura 1 y la región del punto de ruptura 2 describen posibles puntos de ruptura dentro de un cromosoma.

25 El término "flanquear" se entiende en este caso de modo que la sonda A y la sonda B se hibridan en cada caso en un lado de la región del punto de ruptura 1, y análogamente las sondas C se hibridan en cada caso en un lado de la región del punto de ruptura 2.

Es asimismo imaginable extender la sonda C a lo largo de la región del punto de ruptura 2 con el fin de obtener el mismo efecto, a saber la formación de las señales de fusión C-C.

Por sondas se entienden fragmentos de ácidos nucleicos que están marcados con un determinado marcador.

30 El procedimiento de acuerdo con la invención permite, con respecto a los métodos y composiciones conocidos arriba mencionados, por vez primera una detección inequívoca y/o incluso posible por vez primera de inversiones, en particular también inversiones genómicas pequeñas, así como también la diferenciación inequívoca con translocaciones.

35 Preferiblemente, en el caso de los fragmentos de ácidos nucleicos marcados (sondas) se trata de polinucleótidos, polinucleótidos modificados o fragmentos de ácidos nucleicos modificados u oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados.

Por ejemplo, para el experto en la materia son conocidos PNA y LNA para polinucleótidos modificados.

Preferiblemente, los fragmentos de ácidos nucleicos presentan diferentes marcadores A, B y C, por consiguiente se forman también diferentes sondas A, B y C.

40 Para ello, se utiliza una combinación a base de tres colorantes de fluorescencia diferentes en la FISH o tres moléculas informadoras diferentes en la BrISH para la marcación de los fragmentos de ácidos nucleicos (o en general polinucleótidos o también oligonucleótidos).

45 Preferiblemente, el marcador se elige del grupo de colorantes, sustratos colorantes, colorantes de quimioluminiscencia (p. ej., acridinio), radioisótopos, marcadores de espín, enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de soja y/o beta-galactosidasa), haptenos (p. ej., digoxigenina, biotina, 5(6)-carboxifluoresceína, rodamina, bromodesoxiuridina, acetilaminofluoreno, trinitrofenol, derivado de trinitrofenol, estradiol y/o DNP), puntos cuánticos, perlas, aminohexilos, pirenos y colorantes de fluorescencia (p. ej., fluoresceína, derivado de fluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, cumarina, derivado de cumarina, rodamina, derivado de de rodamina, tetrametilrodamina, lisamina, rojo Texas, AMCA, TRITC, colorante IR, colorante Alexa, colorante Dyomics, ficoeritrina, azul cascada, verde Oregón 488, azul Pacífico y/o verde rodamina).

50 El procedimiento de acuerdo con la invención también se puede llevar a cabo mediante el método FISH utilizando tres colorantes de fluorescencia directamente incorporados para las regiones de emisión verde, rojo y oro.

También mediante el método FISH, utilizando tres colorantes de fluorescencia incorporados directamente para las regiones de emisión verde, rojo y oro, el procedimiento se puede llevar a cabo.

La evaluación tiene lugar preferiblemente mediante análisis de señales de fluorescencia.

5 Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo mediante el método BrISH utilizando biotina, digoxigenina y DNP que se unen con fosfatasa alcalina acoplada a anticuerpos, peroxidasa acoplada a anticuerpos y beta-galactosidasa acoplada a anticuerpos.

10 Sorprendentemente, se comprobó que en el caso del procedimiento de acuerdo con la invención se forman nuevas señales de fusión A-C y B-C, formándose las señales de fusión A-C o bien B-C a través de un suceso de disociación de dos colores de las señales de fusión A-B y a través de un suceso de disociación de un color de las señales de fusión C-C. Como modelo de señales que resultan con ello (bajo el uso/observación/evaluación simultáneos del tercer color/del tercer marcador) se pueden observar en este caso dos nuevas señales de fusión. Por consiguiente, el procedimiento de acuerdo con la invención permite por vez primera y de manera sorprendente las detecciones arriba mencionadas de las aberraciones arriba mencionadas que no son posibles o sólo lo son de forma insuficiente con el estado conocido de la técnica. En este caso, una evaluación simultánea del tercer color/tercer marcador junto a los otros dos colores/marcadores permite el reconocimiento por vez primera o inequívoco de la aberración.

15 También en el caso de inversiones genómicas, en particular, pero no limitadas a ellas, de inversiones pequeñas con segmentos genómicos que están afectados por la inversión, menores que 20 Mb, la separación en el espacio de las señales puede ser tan pequeña que siguen siendo percibidas como una señal de fusión. En estos casos, puede producirse un diagnóstico erróneo, dado que una translocación no es percibida como tal.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la detección de inversiones y/o inserciones y/o duplicaciones.

Preferiblemente, para la detección de inversiones, inserciones y/o duplicaciones de segmentos genómicos cortos.

25 De manera particularmente preferida, los segmentos genómicos invertidos, insertados y/o duplicados se encuentran en la región menor que 20 Mb, preferiblemente menor que 15 Mb, de manera particularmente preferida menor que 10 Mb y todavía más preferiblemente menor que 5 Mb.

30 En el caso de inversiones de segmentos genómicos cortos resultan dos nuevas señales de fusión compuestas que, por ejemplo, en un análisis FISH en la interfase se pueden reconocer claramente mediante conjuntos de filtro adecuados habituales. Sin embargo, no se ha de excluir el hecho de que en el caso de regiones de puntos de ruptura mayores, las señales de fusión A-C o B-C se encuentren separadas en el espacio, de modo que las señales no pueden ser ya reconocidas inequívocamente como señales de fusión. Al menos, en estos casos se presenta entonces de forma separada una señal C.

Asimismo, es posible diferenciar, con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención, inversiones de translocaciones.

35 Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea para la detección de inversiones, estando afectadas la inversión inv(2)(p22-p21p23) y/o los genes ALK y/o EML4.

En la FISH pueden percibirse en este caso básicamente al menos dos de los colorantes de fluorescencia simultáneamente mediante un correspondiente conjunto de filtro, lo cual permite un rastreo rápido y sencillo análogamente a las estrategias de sondas de dos colores arriba mencionadas, pero, además de ello, ofrece una seguridad diagnóstica adicional.

40 En lo que sigue se describen con más detalle las ventajas de una detección genómica de inversiones mediante las nuevas composiciones de sondas y las nuevas técnicas ISH:

45 la detección segura o inequívoca de la inversión de segmentos genómicos cortos (regiones menores que 20 Mb) no es posible con composiciones de sondas habituales. Además, la detección de la inversión de segmentos genómicos mayores (regiones mayores que 20 Mb) es a menudo sólo posible con dificultad. Estado conocido de la técnica son en este caso diferentes conceptos de sondas. En el caso más sencillo, se observa sólo una de las dos regiones del punto de ruptura con una estrategia de color dual-rotura. En el caso de una inversión se produce en este caso una separación en el espacio de las señales de fluorescencia. Esta separación de señales se manifiesta, sin embargo, también en el caso de translocaciones recíprocas habituales que implican a la región del punto de ruptura, de las que no es posible una diferenciación con este concepto de sondas.

50 Otro inconveniente es que en el caso de sondas y técnicas de color dual-rotura se produce también en un estado no re-organizado una separación de la señal de fusión en señales de fluorescencia situadas próximas una junto a otra, pero perceptibles una de otra forma separada. Si el segmento genómico de la inversión per se es sólo muy corto (p. ej., menor que 20 Mb) esto puede conducir a que la separación de la señal en el espacio esperada sólo sea no esencialmente mayor y, por consiguiente, pueda ser omitida. Con esta estrategia no es, por consiguiente, posible

una diferenciación entre inversión y translocación recíproca, además, situaciones aberrantes pueden ser interpretadas erróneamente como no re-organizadas.

En el caso de una estrategia de color dual-fusión dual, la región del punto de ruptura proximal sería cubierta, p. ej., con fragmentos de ácidos nucleicos marcados en verde, y la región del punto de ruptura distal sería cubierta, p. ej., con fragmentos de ácidos nucleicos marcados en naranja. En el caso de la inversión de un segmento genómico corto, p. ej., menor que 20 Mb, resultarían dos señales verdes situadas muy próximas una junto a otra y asimismo dos señales naranjas situadas muy próximas una junto a otra. En el caso de la superposición de señales resultarían, por consiguiente, dos señales de fusión situadas muy próximas una junto a otra, que en virtud de su proximidad en el espacio, por ejemplo también en el caso de un conjunto de filtro pasabanda dual correspondiente, no podrían ser percibidas a menudo con seguridad como dos señales de fusión separadas. En este caso, podría poner remedio, por ejemplo, también el uso de conjuntos de filtro pasabanda sencillos, específicos para los dos colores de señales. Sin embargo, esto ralentizaría el proceso de evaluación y lo complicaría. Además de ello, en el caso de segmentos de cromatina descondensada, también en el caso de alelos normales, se produce a menudo la formación de señales alargadas a modo de un collar de perlas, de las que, en virtud de una inversión, dos señales separadas en el espacio no se pueden diferenciar obligatoriamente. La interpretación errónea de dos señales de fusión situadas próximas una junto a otra como sólo una señal de fusión conduciría a una afirmación diagnóstica falsa negativa.

La composición de las sondas de la presente invención combina, entre otros, también la estrategia de color dual-rotura para la detección de la rotura en una de las dos regiones del punto de ruptura con una estrategia de color sencillo-rotura utilizando un tercer marcador, p. ej. fluorocromo, en la FISH, p. ej., azul, que puede ser detectado de forma separada de los dos primeros marcadores, p. ej., colorantes (p. ej. verde y naranja), para la detección de la ruptura en la segunda región del punto de ruptura. En el caso de una inversión se produce en este caso, por ejemplo en el caso de una aplicación de FISH en el conjunto de filtro pasabanda dual, por norma general, una separación perceptible de las señales de fusión en una señal verde y naranja separada en el espacio. Al mismo tiempo se produce, por ejemplo, perceptible en un segundo conjunto de filtro, específico para azul, por parte de la ruptura en la segunda región del punto de ruptura, una separación de la señal azul en dos señales separadas en el espacio. A diferencia de las estrategias habituales una inversión se caracteriza, por lo tanto, por dos sucesos perceptibles de manera diferente entre sí, lo cual conduce a una afirmación diagnóstica claramente más segura, precisamente en el caso de modelos de señales no claros. Así, en el caso de una separación de señal verde-naranja no clara puede tener lugar una confirmación a través de la evaluación en el conjunto de filtro pasabanda sencillo para la señal azul. Si también en este caso se produce una señal azul adicional y se co-localizan en cada caso una señal azul con en cada caso una señal verde y una señal naranja, entonces esto se considera como confirmación de la inversión. Sin embargo, si se presenta un modelo de señal azul normal, entonces la señal verde-naranja se considera asimismo como no aberrante. En el caso de una separación inequívoca de la señal en una señal verde y una señal naranja, la evaluación del modelo de señal azul sirve para la diferenciación entre una inversión, en este caso se presenta una señal azul adicional, y una translocación con participantes desconocidos en la translocación, en este caso se presenta un modelo de señal azul normal.

Otro objeto de la invención es un preparado de acuerdo con la invención para la detección de varias regiones de cromosomas o ADN diferentes en una célula para la detección de aberraciones cromosómicas estructurales, presentando las aberraciones cromosómicas al menos dos regiones de punto de ruptura en un cromosoma, basándose en fragmentos de ácidos nucleicos (sondas) marcados de forma directa o indirecta, que comprende

- una primera sonda marcada con un marcador A (sonda A) y una segunda sonda marcada con un marcador B (sonda B) flanquean una región de punto de ruptura 1 que forman señales de fusión A-B y
- dos tercera y cuanta sondas (sondas C) marcadas en cada caso con un marcador C flanquean una región de punto de ruptura 2 que forman las señales de fusión C-C, modificándose las señales de fusión antes mencionadas, en el caso de una aberración cromosómica, en señales de fusión A-C y señales de fusión B-C.

Preferiblemente, el preparado de acuerdo con la invención presenta sondas que están marcadas con los marcadores arriba mencionados.

Con ayuda de los siguientes dibujos y ejemplos se describe con mayor detalle la invención. Muestran:

Fig. 1: representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de una inversión

Fig. 2: esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH triple "Sonda ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck™" de la razón social ZytoVision GmbH

Fig. 3: análisis por FISH para la detección de la inversión inv(2)(p22-p21p23) utilizando la sonda de FISH triple "Sonda ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck™"

Fig. 4: análisis de CISH para la detección de la inversión nv(2)(p22-p21p23) utilizando la sonda de FISH triple "Sonda ZytoDot 2C SPEC ALK/EML4 Tri-Check™" de la razón social ZytoVision GmbH

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de una inversión utilizando tres marcadores. Muestra el modelo de señales en el caso de la inversión inv(2)(p22-p21 p23) que afecta a los genes ALK y EML4. Los marcadores A y B de una sonda ISH triple flanquean en cada caso un lado de la región del punto de ruptura 1 (ALK) y el marcador C flanquea en cada caso un lado de la región del punto de ruptura 2 (EML4).

En la interfase de una célula normal (sin aberraciones, parte superior de la figura) se pueden reconocer dos señales de fusión consistentes en marcador A y marcador B y dos señales de marcador C. En una interfase afectada por una inversión (parte inferior de la figura) aparece una nueva señal de fusión A-C consistente en el marcador A y el marcador C así como una nueva señal de fusión B-C consistente en el marcador B y el marcador C. Junto a éstas están señales de fusión y señales individuales del cromosoma normal.

La Fig. 2 muestra un esquema de modelos de señal en el caso de utilizar una sonda de FISH triple "Sonda ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck™" de la razón social ZytoVision GmbH. La sonda se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que están orientados en 2p23 frente a secuencias situadas proximales a la región del punto de ruptura ALK, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión 572 nm) que están orientados en 2p23 frente a secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura ALK, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que están orientados en la región 2p21 a las secuencias situadas distales y proximales en la región del punto de ruptura de EML4.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ALK (2p23) aparecen como señales de fluorescencia verdes y naranjas, las señales de hibridación para el gen EML4 (2p21) aparecen como señales de fluorescencia azules.

En células normales o bien células sin re-organizaciones de ALK-EML4, en la interfase aparecen dos señales de fusión verde/naranja en el caso de utilizar un conjunto de filtro pasabanda dual adecuado y dos señales azules en el caso de utilizar un conjunto de filtro pasabanda sencillo adecuado (véase la Fig. 1).

Un locus 2p21-23 afectado por una inversión ALK-EML4 está caracterizado por una señal verde separada y una señal naranja separada, así como una señal azul adicional. En este caso, la señal verde separada y la señal naranja están dispuestas en cada caso junto a una señal azul (véase la Fig. 2).

Un locus 2p21-23 afectado por una inversión ALK-EML4 con una delección de secuencias 5'-ALK está caracterizada por la pérdida de una señal verde y por una señal azul adicional. En este caso, la señal naranja se encuentra junto a una señal azul (véase la Fig. 3).

Una señal verde separada y una señal naranja separada en combinación con un número normal de señales azules (véase la Fig. 4) representa una translocación ALK sin inclusión de EML4 o, cuando las señales verde y naranja separadas se encuentran muy próximas una junto a otra, representan un locus 2p21-23 no re-organizado.

La Fig. 3 muestra un análisis de FISH para la detección de la inversión inv(2)(p22-p21p23) utilizando la sonda FISH triple "Sonda ZytoLight SPEC ALK/EML4 Triple Check™". La sonda se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que están orientados en 2p23 frente a secuencias situadas proximales a la región del punto de ruptura ALK, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están orientados en 2p23 frente a secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura ALK, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión 480 nm) que están orientados en la región 2p21 frente a secuencias situadas distales y proximales a la región del punto de ruptura de EML4. Con conjuntos de filtro adecuados se puede visualizar el modelo de señal.

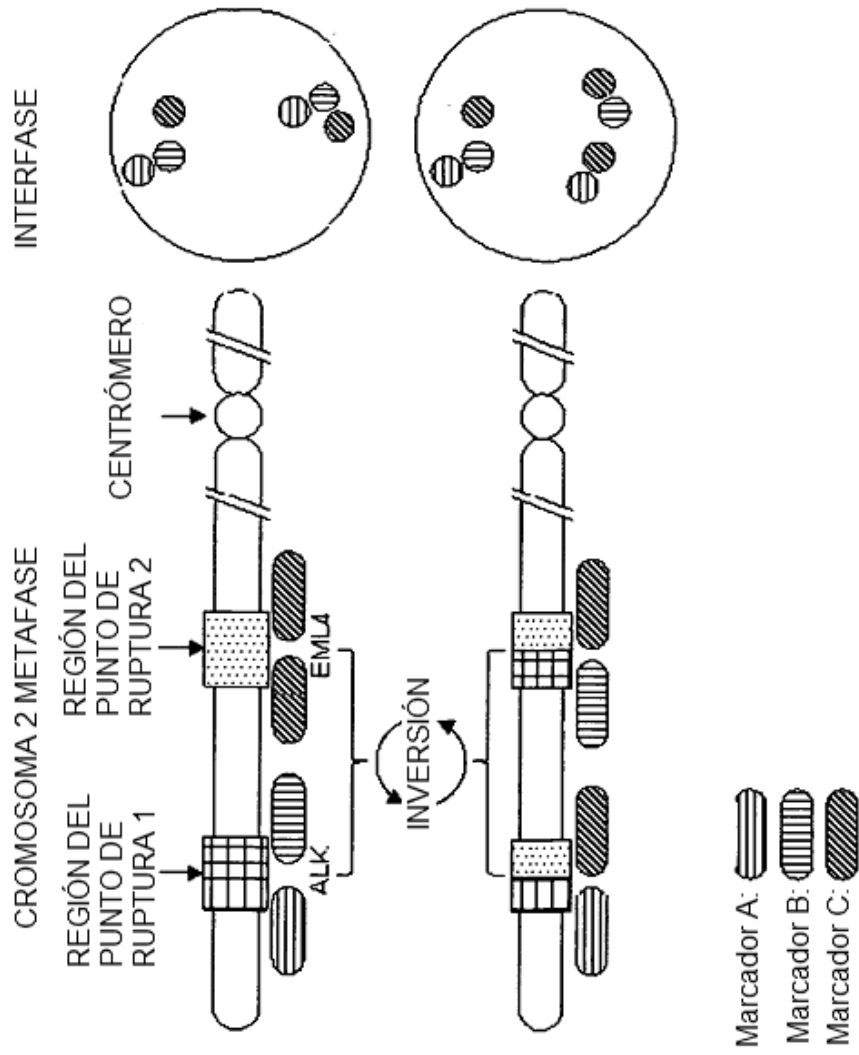
La Fig. 4 muestra un análisis por FISH para la detección de la inversión inv(2)(p22-p21p23) utilizando la sonda de FISH triple "Sonda ZytoDot 2C SPEC ALK/EML4 Tri-Check™". La sonda se compone de polinucleótidos marcados con digoxigenina que están dirigidos en dos 2p23 frente a secuencias situadas proximales a la región del punto de ruptura de ALK. Polinucleótidos marcados con DNP, que están dirigidos en 2p23 frente a secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK, así como polinucleótidos marcados con biotina que están dirigidos en la región 2p21 frente a secuencias situadas distales y proximales a la región del punto de ruptura de EML4. La detección de las marcaciones tuvo lugar a través de anticuerpos primarios (no marcados) (anti-DIG/anti-DNP/anti-BIO) que son detectados por anticuerpos conjugados por enzima polimerizados secundarios (polímero HRP/polímero AP/beta-GAL), así como la reacción enzimática de los sustratos (AP-RED/HRP-GREEN/beta-GAL-BLUE) que conduce a la formación de señales rojas, verdes y azules intensas permanentes que se pueden representar al microscopio óptico, p. ej., con una lente seca 40x.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de varias regiones diferentes de cromosomas o ADN en una célula para la detección de aberraciones cromosómicas estructurales, presentando las aberraciones cromosómicas al menos dos regiones de puntos de ruptura dentro de un cromosoma, basadas en fragmentos de ácidos nucleicos marcados de forma directa o indirecta (sondas), caracterizado por que
- 5
- una primera sonda marcada con un marcador A (sonda A) y una segunda sonda marcada con un marcador B (sonda B) flanquean una región de punto de ruptura 1 que forman señales de fusión A-B y
 - dos tercera y cuanta sondas (sondas C) marcadas con un marcador C flanquean una región de punto de ruptura 2 que forman las señales de fusión C-C, modificándose las señales de fusión antes mencionadas, en el caso de una aberración cromosómica, en señales de fusión A-C y señales de fusión B-C,
- 10 las señales de fusión antes mencionadas se modifican, en el caso de una aberración cromosómica, en señales de fusión A-C y señales de fusión B-C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en el caso de las sondas se trata de polinucleótidos, polinucleótidos modificados o fragmentos de ácidos nucleicos modificados u oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados.
- 15
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que las sondas A, B y C son marcadores diferentes.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el marcador se elige del grupo que comprende colorantes, sustratos colorantes, colorantes de quimioluminiscencia (p. ej., acridinio), radioisótopos, marcadores de espín, enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de soja y/o beta-galactosidasa), haptenos (p. ej., digoxigenina, biotina, 5(6)-carboxifluoresceína, rodamina, bromodesoxiuridina, acetilaminofluoreno, trinitrofenol, derivado de trinitrofenol, estradiol y/o DNP), puntos cuánticos, perlas, aminohexilos, pirenos y colorantes de fluorescencia (p. ej., fluoresceína, derivado de fluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, cumarina, derivado de cumarina, rodamina, derivado de de rodamina, tetrametilrodamina, lisamina, rojo Texas, AMCA, TRITC, colorante IR, colorante Alexa, colorante Dyomics, ficoeritrina, azul cascada, verde Oregón 488, azul Pacífico y/o verde rodamina).
- 20
5. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el procedimiento se lleva a cabo por el método de FISH utilizando tres colorantes de fluorescencia directamente incorporados para las regiones de emisión verde, rojo y azul.
- 25
6. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el procedimiento se lleva a cabo por el método FISH utilizando tres colorantes de fluorescencia directamente incorporados para las regiones de emisión verde, naranja/rojo y oro.
- 30
7. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el procedimiento se lleva a cabo por el método BrISH utilizando biotina, digoxigenina y DNP, que se unen con fosfatasa alcalina acoplada a anticuerpos, peroxidasa acoplada a anticuerpos y beta-galactosidasa acoplada a anticuerpos.
- 35
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, para la detección de inversiones, inserciones y/o duplicaciones.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, para la detección de inversiones, inserciones y/o duplicaciones de segmentos genómicos cortos.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que se detectan segmentos genómicos invertidos, insertados y/o duplicados en un intervalo menor que 20 Mb, preferiblemente menor que 15 Mb, de manera particularmente preferida menor que 10 Mb y todavía más preferiblemente menor que 5 Mb.
- 40
11. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que son visibles en el modelo de señales las proteínas de fusión A-C o B-C modificadas en un intervalo grande de puntos de ruptura como señal de fusión A-C y señal C / señal B o como señal de fusión B-C y señal C / señal A.
12. Procedimiento según la reivindicación 9, para la diferenciación de inversiones y translocaciones.
- 45
13. Procedimiento según la reivindicación 8, para la detección de inversiones, estando afectadas la inversión inv(2)(p22-p21 p23) y/o los genes ALK y/o EML4.
14. Preparado para la detección de varias regiones de cromosomas o ADN diferentes en una célula para la detección de aberraciones cromosómicas estructurales, presentando las aberraciones cromosómicas al menos dos regiones de punto de ruptura dentro de un cromosoma, basándose en fragmentos de ácidos nucleicos (sondas) marcados de forma directa o indirecta, que comprende
- 50

- una primera sonda marcada con un marcador A (sonda A) y una segunda sonda marcada con un marcador B (sonda B) flanquean una región de punto de ruptura 1 que forman señales de fusión A-B y
 - dos tercera y cuanta sondas (sondas C) marcadas en cada caso con un marcador C flanquean una región de punto de ruptura 2 que forman las señales de fusión C-C,
- 5 modificándose las señales de fusión antes mencionadas, en el caso de una aberración cromosómica, en señales de fusión A-C y señales de fusión B-C.
15. Preparado según la reivindicación 14, caracterizado por que las sondas están configuradas según las reivindicaciones 2-7.

Fig. 1



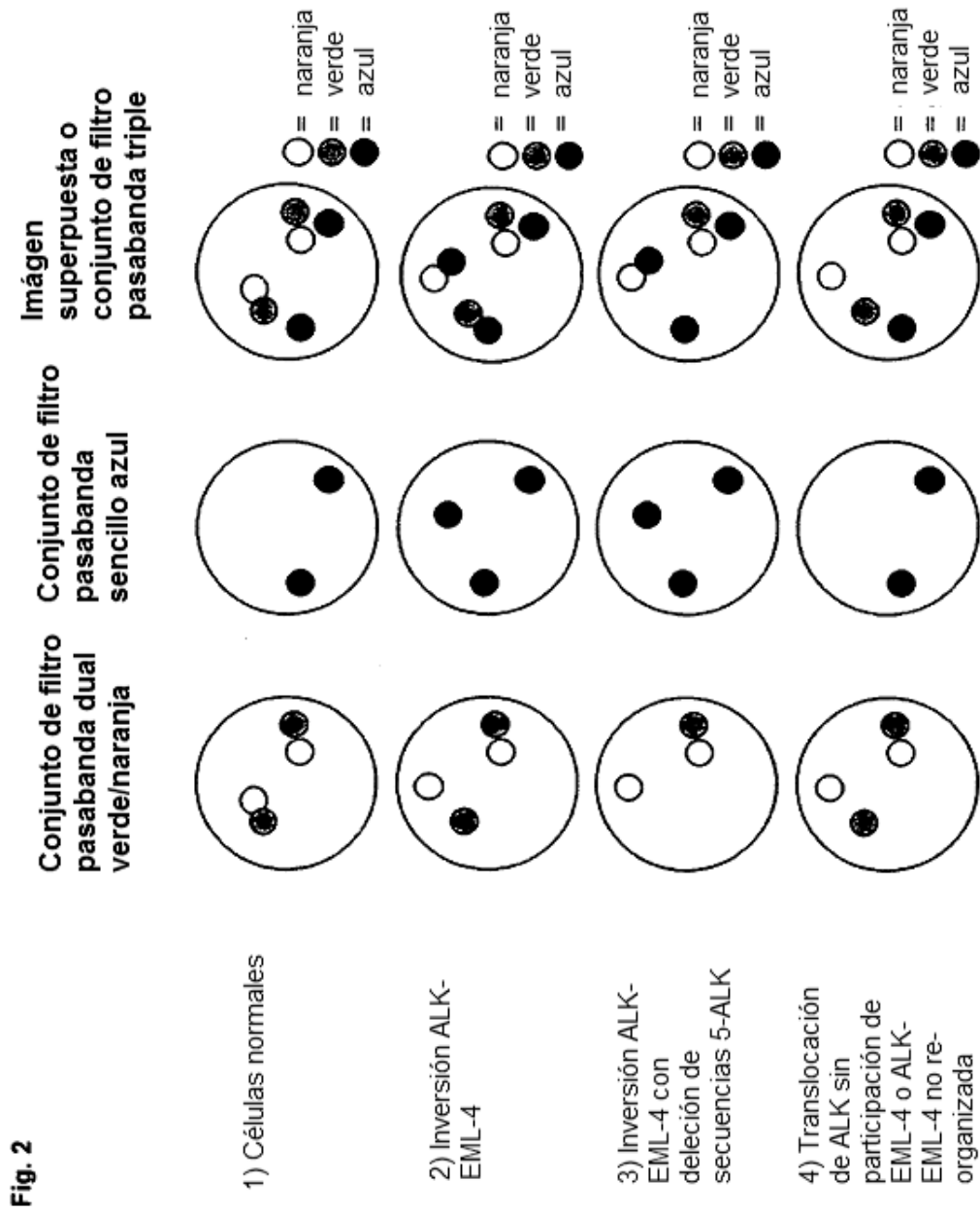
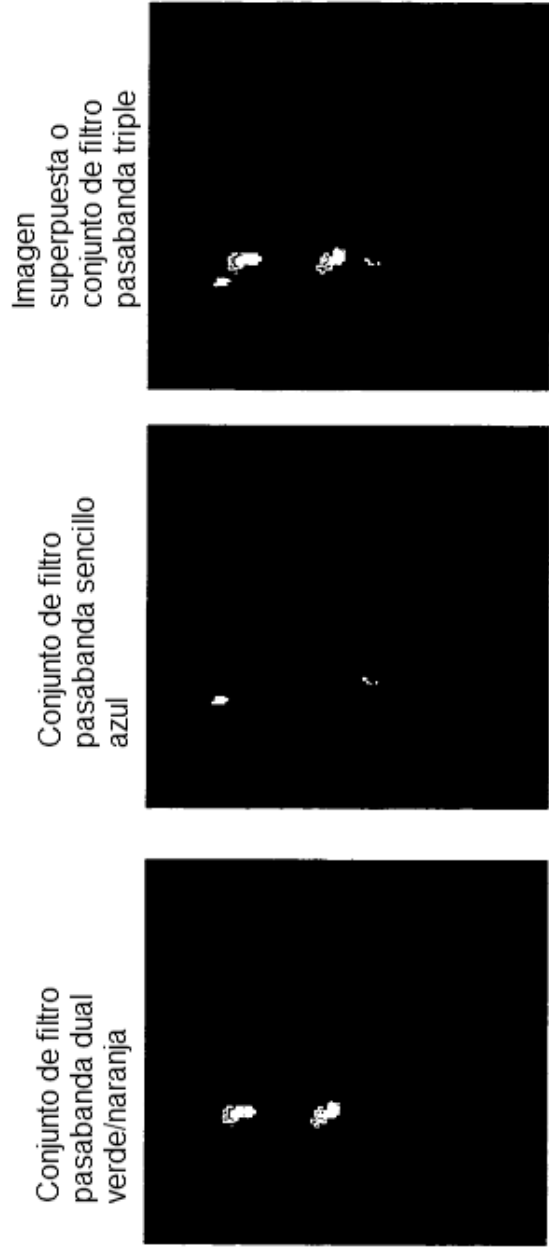


Fig. 3

Núcleos Normales



Inversión ALK-EML-4



Fig. 4

