(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 601 237**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2010 PCT/IB2010/003490**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2011 WO11067678**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2010 E 10818076 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2507391**

(54) Título: **Composiciones y métodos para realizar hibridaciones sin desnaturalización**

(30) Prioridad:

02.12.2009 US 265966 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2017

(73) Titular/es:

DAKO DENMARK A/S (100.0%)
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK

(72) Inventor/es:

MATTHIESEN, STEEN, H.

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

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

Composiciones y métodos para realizar hibridaciones sin desnaturalización

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 61/265.966, presentada el 2 de diciembre de 2009.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para eliminar la etapa de desnaturalización de aplicaciones de hibridación. En una realización, la presente invención puede usarse para el examen molecular *in vivo*, *in vitro* e *in situ* de ADN y ARN. En particular, la invención puede usarse para el examen molecular de ADN y ARN en los campos de citología, histología y biología molecular. En otras realizaciones, la presente invención puede usarse para aplicaciones de hibridación *in situ* (ISH).

Fondo y descripción

Las moléculas de ácido nucleico bicatenarias *(*es decir, ADN (ácido desoxirribonucleico), ADN/ARN (ácido ribonucleico) y ARN/ARN) se asocian en una configuración helicoidal doble. Esta estructura de doble hélice se estabiliza mediante puentes de hidrógeno entre bases en cadenas opuestas cuando las bases se aparean de una manera particular (A+T/U o G+C) y uniones hidrófobas entre bases apiladas. El apareamiento de bases complementarias (hibridación) es fundamental para todos los procesos que implican ácido nucleico.

En un ejemplo de hibridación básico, se diseñan cebadores o sondas de ácido nucleico para unirse, o “hibridarse”, con un ácido nucleico diana, por ejemplo, ADN o ARN en una muestra. Un tipo de aplicación de hibridación, hibridación *in situ* (ISH), incluye hibridación a una diana en una muestra en la que la muestra puede estar *in vivo*, *in situ*, o por ejemplo, fijada o adherida a un portaobjetos de vidrio. Las sondas pueden marcarse para hacer posible la identificación del híbrido sonda-diana mediante el uso de un microscopio/escáner de fluorescencia o campo brillante. Tales sondas marcadas pueden usarse, por ejemplo, para detectar anomalías genéticas en una secuencia diana, proporcionando información valiosa sobre, por ejemplo, trastornos prenatales, cáncer, y otras enfermedades genéticas o infecciosas.

Con el fin de que las sondas o los cebadores se unan al ácido nucleico diana en la muestra, deben separarse las cadenas complementarias del ácido nucleico. Esta etapa de separación de cadenas, denominada “desnaturalización”, normalmente requiere condiciones agresivas para alterar los puentes de hidrógeno y las uniones hidrófobas en la doble hélice. Una vez que se han separado las cadenas complementarias de ácido nucleico, una etapa de “renaturalización” o “reapareamiento” permite que los cebadores o sondas se unan al ácido nucleico diana en la muestra. Esta etapa también se denomina en ocasiones etapa de “hibridación”.

Los experimentos de hibridación tradicionales, tales como ensayos de ISH, usan altas temperaturas (por ejemplo, de 95ºC a 100ºC) y/o disoluciones que contienen formamida para desnaturalizar ácido nucleico bicatenario. Sin embargo, estos métodos tienen inconvenientes significativos.

Por ejemplo, el calor puede destruir la estructura del propio ácido nucleico porque los enlaces fosfodiéster pueden romperse a altas temperaturas, lo que lleva a un conjunto de ácidos nucleicos monocatenarios rotos. Además, el calor puede llevar a complicaciones cuando se usan pequeños volúmenes, puesto que la evaporación de los tampones acuosos es difícil de controlar.

A menudo se usan disoluciones que contienen formamida para superar algunos de los problemas asociados con la desnaturalización por calor. La formamida rompe los pares de bases desplazando de forma flexible y uniforme las moléculas de hidrato unidas y produciendo la “formamidación” de los sitios de unión de Watson-Crick. Por tanto, la formamida tiene un efecto desestabilizante sobre los ácidos nucleicos bicatenarios y análogos, permitiendo que se produzca desnaturalización a temperaturas inferiores. Sin embargo, aunque formamida disminuye la temperatura de fusión (Tm) del ácido nucleico bicatenario, también prolonga significativamente el tiempo de renaturalización, en comparación con disoluciones acuosas de desnaturalización sin formamida.

Además, la formamida tiene desventajas más allá de un tiempo de procesamiento largo. La formamida es un material tóxico, peligroso, sometido a estrictas normas para su uso y eliminación. Además, el uso de una alta concentración de formamida parece producir la destrucción morfológica de la estructura celular, nuclear y/o cromosómica.

Por tanto, existe la necesidad de superar los inconvenientes asociados con la etapa de desnaturalización de aplicaciones de hibridación. Al abordar esta necesidad, la presente invención proporciona varias posibles ventajas con respecto a las aplicaciones de hibridación de la técnica anterior, tales como tiempos de hibridación más rápidos, temperaturas de hibridación inferiores y disolventes de hibridación menos tóxicos.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar métodos que dan como resultado aplicaciones de hibridación

que tienen al menos una de las siguientes ventajas con respecto a las aplicaciones de hibridación de la técnica anterior: menor fondo, menor evaporación de reactivo, conservación de la morfología de la muestra, procedimiento más sencillo, procedimiento más rápido, automatización más fácil y reactivos más seguros. La presente invención logra estos objetivos eliminando la etapa de desnaturalización.

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un método de hibridación de secuencias de ácido nucleico *in situ* en una muestra en un portaobjetos sin una etapa de desnaturalización y en un sistema automatizado que comprende:

- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico,

- proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico,

- proporcionar una composición de hibridación que comprende una cantidad eficaz de al menos un disolvente aprótico polar, y

- combinar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda y la composición de hibridación en el sistema automatizado durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda,

en el que el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de hibridación de secuencias de ácido nucleico *in situ* en una muestra en un portaobjetos sin una etapa de desnaturalización y en un sistema automatizado que comprende:

- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico, y

- aplicar una composición de hibridación que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico y una cantidad eficaz de al menos un disolvente aprótico polar durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda,

en el que el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

Los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier técnica de hibridación. Los métodos de la invención también pueden aplicase a cualquier sistema molecular que se hibride o se una usando apareamiento de bases, tal como, por ejemplo, ADN, ARN, ANP, ANB, y análogos sintéticos y naturales de los mismos.

El método de hibridación de ácidos nucleicos de la presente invención puede usarse para el análisis *in vivo* o *in vitro* de ADN genómico, cromosomas, fragmentos cromosómicos, genes y aberraciones cromosómicas tales como translocaciones, deleciones, amplificaciones, inserciones, mutaciones o inversiones asociadas con un estado normal o una enfermedad. Además, los métodos son útiles para la detección de agentes infecciosos así como de cambios en los niveles de expresión de ARN, por ejemplo, ARNm y su ADN complementario (ADNc).

Otros usos incluyen el análisis *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de ARN mensajero (ARNm), ARN viral, ADN viral, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN no codificante (ARNnc, por ejemplo, ARNt y ARNr), ARN de transferencia-mensajero (ARNtm), micro ARN (miARN), ARN de interacción con piwi (ARNpi), ARN no codificante largo, ARN nucleolar pequeño (ARNnup), ARN antisentido, ARN bicatenario (ARNbc), metilaciones y otras modificaciones de bases, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), variaciones en el número de copias (VNC) y ácidos nucleicos marcados con, por ejemplo, radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, digoxigenina (DIG) o antígenos, solos o en combinación con ácidos nucleicos no marcados.

El método de hibridación de ácidos nucleicos de la presente invención es útil para análisis *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de ácidos nucleicos usando técnicas tales como PCR, PCR *in situ*, transferencia de tipo Northern, transferencia de tipo Southern, citometría de flujo, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, quimioluminiscencia, inmunohistoquímica, cariotipo virtual, ensayo genético, microalineamiento de ADN (por ejemplo, hibridación genómica comparativa – alineamiento (CGH-alineamiento), perfil de expresión genética, Gene ID, sondas tipo *Tiling array*, electroforesis en gel, electroforesis capilar, e hibridaciones *in situ* tales como FISH, SISH, CISH. En una realización, los métodos de la invención son útiles para aplicaciones de hibridaciones de ácidos nucleicos, con la condición de que tales aplicaciones no incluyan amplificación del ácido nucleico tal como, por ejemplo, mediante PCR, PCR *in situ*, etc.

Los métodos de la invención pueden usarse en muestras *in vitro* e *in vivo* tales como frotis de médula ósea, frotis de sangre, preparaciones tisulares incluidas en parafina, muestras tisulares disociadas enzimáticamente, médula ósea, amniocitos, preparaciones de citospina, huellas, etc.

La invención proporciona métodos para hibridar al menos una molécula con una diana *in situ* en una muestra en un portaobjetos sin una etapa de desnaturalización y en un sistema automatizado. En determinadas realizaciones, el método de la invención reduce significativamente los niveles de fondo sin necesidad de agentes de bloqueo, y sin

necesidad de hibridación durante la noche en tampones que contienen formamida. Por tanto, la invención puede eliminar, por ejemplo, el uso de, o reducir la dependencia de formamida. Por consiguiente, en algunos aspectos, la presente invención supera el problema de toxicidad principal y la etapa de renaturalización prolongada asociada con el uso de ensayos de hibridación tradicionales con formamida.

Una divulgación de la solicitud es una composición o disolución para su uso en aplicaciones de hibridación. Las composiciones para su uso según esta divulgación incluyen una composición acuosa que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico y al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos bicatenarios. Una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos bicatenarios es una cantidad que permite la hibridación. Por ejemplo, una manera de someter a prueba si la cantidad de disolvente aprótico polar es eficaz para permitir la hibridación es determinar si el disolvente aprótico polar, cuando se usa en las composiciones y los métodos de hibridación descritos en el presente documento, tal como en el ejemplo 1, produce una señal detectable y/o un producto de ácido nucleico amplificado.

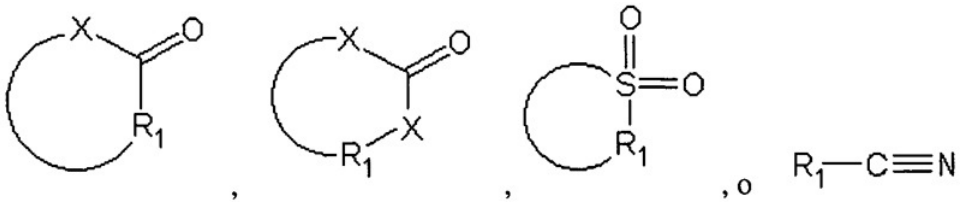
Los ejemplos no limitativos de cantidades eficaces de disolventes apróticos polares incluyen, por ejemplo, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 95% (v/v). En algunas realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 5% al 60% (v/v). En otras realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 10% al 60% (v/v). Todavía en otras realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 30% al 50% (v/v). También son adecuadas concentraciones del 1% al 5%, del 5% al 10%, del 10%, del 10% al 20%, del 20% al 30%, del 30% al 40%, del 40% al 50% o del 50% al 60% (v/v). En algunas realizaciones, el disolvente aprótico polar estará presente a una concentración del 0,1%, el 0,25%, el 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4% o el 5% (v/v). En otras realizaciones, el disolvente aprótico polar estará presente a una concentración del 7%, el 7,5%, el 8%, el 8,5%, el 9%, el 9,5%, el 10%, el 10,5%, el 11%, el 11,5%, el 12%, el 12,5%, el 13%, el 13,5%, el 14%, el 14,5%, el 15%, el 15,5%, el 16%, el 16,5%, el 17%, el 17,5%, el 18%, el 18,5%, el 19%, el 19,5% o el 20% (v/v).

La solicitud da a conocer la composición acuosa que comprende un disolvente aprótico polar que tiene toxicidad reducida. Por ejemplo, una composición menos tóxica que las disoluciones tradicionales usadas en aplicaciones de hibridación puede comprender una composición con la condición de que la composición no contenga formamida, o con la condición de que la composición contenga menos del 50%, o menos del 25%, o menos del 10%, o menos del 5%, o menos del 2%, o menos del 1%, o menos del 0,5%, o menos del 0,1%, o menos del 0,05%, o menos del 0,01% de formamida. Una composición menos tóxica también puede comprender, en una divulgación, una composición con la condición de que la composición no contenga dimetilsulfóxido (DMSO), o con la condición de que la composición contenga menos del 10%, el 5%, el 2%, o menos del 1%, o menos del 0,5%, o menos del 0,1%, o menos del 0,05%, o menos del 0,01% de DMSO.

En una realización de la invención, los disolventes apróticos polares adecuados para su uso en la invención pueden seleccionarse basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen. Por ejemplo, los disolventes apróticos polares adecuados pueden tener un parámetro de solubilidad en dispersión de entre 17,7 y 22,0 $MPa^{1/2}$, un parámetro de solubilidad polar de entre 13 y 23 $MPa^{1/2}$ y un parámetro de solubilidad por puente de hidrógeno de entre 3 y 13 $MPa^{1/2}$.

Según una realización de la presente invención, los disolventes apróticos polares adecuados para su uso en la invención son compuestos cíclicos. Un compuesto cíclico tiene una estructura de base cíclica. Los ejemplos incluyen los compuestos cíclicos dados a conocer en el presente documento. En otras realizaciones, el disolvente aprótico polar puede elegirse de las fórmulas 1-4 a continuación:

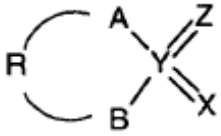
Fórmula 1 Fórmula 2 Fórmula 3 Fórmula 4



donde X es O y R1 es alquildiílo.

Según otra realización de la invención, los disolventes apróticos polares adecuados para su uso en la invención pueden elegirse de la fórmula 5 a continuación:

Fórmula 5



donde X es opcional y si está presente, se elige de O o S;

donde Z es opcional y si está presente, se elige de O o S;

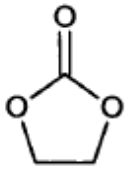
donde A y B son independientemente O o N o S o parte del alquildiílo o una amina primaria;

donde R es alquildiílo; y

donde Y es O o S o C.

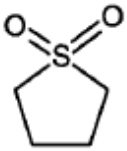
En las fórmulas 6-9 a continuación se facilitan ejemplos de disolventes apróticos polares adecuados según la fórmula 5:

Fórmula 6



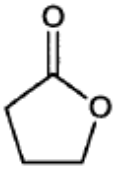
donde:
X no existe
A, B y Z son O
Y es C; y
R es etano-1,2-diílo

Fórmula 7



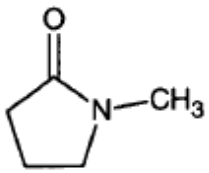
donde:
Z y X son O;
A y B forman parte del alquildiílo;
Y es S; y
R es butano-1,4-diílo;

Fórmula 8



donde:
X no existe;
A forma parte del alquildiílo;
Y es C;
B y Z son O; y
R es propano-1,3-diílo;

Fórmula 9



donde:
X no existe;
A forma parte del alquildiílo;
Y es C;
B es metilamina;
Z es O; y
R es propano-1,3-diílo

Aún según otra realización de la invención, el disolvente aprótico polar tiene funcionalidad lactona, sulfona, nitrilo, sulfito o carbonato. Tales compuestos se distinguen por sus constantes dieléctricas relativamente altas, altos momentos dipolares y solubilidad en agua.

Según otra realización de la invención, el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad lactona es γ-butirolactona (GBL), el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad sulfona es sulfolano (SL), el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad nitrilo es acetonitrilo (AN), el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad sulfito es sulfito de glicol/sulfito de etileno (GS) y el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad carbonato es carbonato de etileno (EC), carbonato de propileno (PC) o tiocarbonato de etileno (ETC). Aún en otro aspecto de la invención, las composiciones y los métodos de la invención comprenden un disolvente aprótico polar, con la condición de que el disolvente aprótico polar no sea acetonitrilo (AN) ni sulfolano (SL). En una realización, se proporciona una cantidad de energía suficiente para hibridar los ácidos nucleicos primero y segundo.

En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico está en una muestra biológica. En otra realización, la muestra biológica es una muestra de citología o histología.

En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia monocatenaria y la segunda secuencia de ácido nucleico es una secuencia bicatenaria. En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia bicatenaria en una muestra biológica y la segunda secuencia de ácido nucleico es una secuencia monocatenaria. Aún en otra realización, ambas secuencias de ácido nucleico primera y segunda son bicatenarias. Aún en otra realización, ambas secuencias de ácido nucleico primera y segunda son monocatenarias.

Un aspecto adicional de la invención comprende un método en el que la etapa de proporcionar una cantidad de energía suficiente para desnaturalizar los ácidos nucleicos implica una etapa de calentamiento realizada mediante el uso de microondas, baños calientes, placas calientes, hilo térmico, elemento de Peltier, calentamiento por inducción o lámparas térmicas.

Según una divulgación adicional de la solicitud, la invención se refiere al uso de una composición que comprende entre el 1 y el 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar en ensayos de hibridación.

Aún según otra divulgación de la solicitud, la invención se refiere al uso de una composición que comprende una composición acuosa tal como se describe en el presente documento para su uso en ensayos de hibridación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa el transcurso de tiempo típico para la detección de locus individual con sondas de FISH marcadas primarias en cortes tisulares incluidos en parafina fijadas con formaldehído (muestras histológicas). Las barras representan un ensayo de hibridación realizado usando una disolución tradicional (parte superior) y el transcurso de tiempo típico para un ensayo de hibridación realizado usando una composición de la invención (parte inferior). La primera barra a la izquierda en cada transcurso de tiempo representa la etapa de desparafinación; la segunda barra representa la etapa de pretratamiento térmico; la tercera barra representa la etapa de digestión; la cuarta barra representa las etapas de desnaturalización e hibridación; la quinta barra representa la etapa de lavado en condiciones de rigurosidad; y la sexta barra representa la etapa de montaje.

La figura 2 representa el transcurso de tiempo típico para la detección de locus individual con sondas de FISH marcadas primarias en muestras citológicas. Las barras representan un ensayo de hibridación realizado usando una disolución tradicional (parte superior) y el transcurso de tiempo típico para un ensayo de hibridación realizado usando una composición de la invención (parte inferior). La primera barra a la izquierda en cada transcurso de tiempo representa la etapa de fijación; la segunda barra representa las etapas de desnaturalización e hibridación; la tercera barra representa la etapa de lavado en condiciones de rigurosidad; y la cuarta barra representa la etapa de montaje.

Descripción detallada

A. Definiciones

En el contexto de la presente invención los siguientes términos han de entenderse tal como sigue:

“Muestra biológica” ha de entenderse como cualquier muestra *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de una o más células o fragmentos de célula. Esta puede ser, por ejemplo, un organismo unicelular o multicelular, corte tisular, muestra citológica, extensión cromosómica, secuencias de ácido nucleico purificadas, secuencias de ácido nucleico obtenidas artificialmente logradas, por ejemplo, mediante un sistema con base biológica o mediante síntesis química, microalineamiento u otra forma de chip de ácido nucleico. En una realización, una muestra es una muestra de mamífero, tal como, por ejemplo, una muestra humana, murina, de rata, felina o canina.

“Ácido nucleico”, “cadena de ácido nucleico” y “secuencia de ácido nucleico” significan cualquier elemento que se una o se hibride usando apareamiento de bases incluyendo oligómeros o polímeros que tienen una estructura principal formada de análogos de nucleótidos y/o ácido nucleico que se producen de manera natural que comprenden nucleobases no convencionales y/o estructuras principales no convencionales *(*por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (ANP) o ácido nucleico bloqueado (ANB)), o cualquier forma derivatizada de un ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico peptídico” o “ANP” significa un polímero sintético que tiene una estructura principal de poliamida con nucleobases colgantes (que se producen de manera natural y modificadas) incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera de los segmentos de oligómero o polímero a los que se hace referencia o se reivindican como ácidos nucleicos peptídicos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.539.082, 5.527.675, 5.623.049, 5.714.331, 5.718.262, 5.736.336, 5.773.571, 5.766.855, 5.786.461, 5.837.459, 5.891.625, 5.972.610, 5.986.053, 6.107.470, 6.201.103, 6.228.982 y 6.357.163, en el documento WO96/04000, o en cualquiera de las referencias citadas en los mismos. La nucleobase colgante, tal como, por ejemplo, una base de purina o pirimidina en el ANP puede conectarse a la estructura principal a través de un ligador tal como, por ejemplo, uno de los ligadores enseñados en el documento PCT/US02/30573 o en cualquiera de las referencias citadas en el mismo. En una realización, el ANP tiene una estructura principal de N-(2-aminoetil)-glicina). Los ANP pueden sintetizarse (y opcionalmente marcarse) tal como se enseña en el documento PCT/US02/30573 o en cualquiera de las referencias citadas en el mismo. Los ANP se hibridan estrechamente, y con alta especificidad de secuencia, con ADN y ARN, puesto que la estructura principal del ANP no está cargada. Por tanto, las sondas de ANP cortas pueden mostrar especificidad comparable con sondas de ADN o ARN más largas. Las sondas de ANP también pueden mostrar mayor especificidad en la unión a ADN o ARN complementario.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico bloqueado” o “ANB” significa un oligómero o polímero que comprende al menos una o más subunidades de ANB. Tal como se usa en el presente documento, el término “subunidad de ANB” significa un ribonucleótido que contiene un puente de metileno que conecta el oxígeno en 2’ de la ribosa con el carbono en 4’. Véase en general, Kurreck, Eur. J. Biochem., 270:1628-44 (2003).

Los ejemplos de ácidos nucleicos y análogos de ácido nucleico también incluyen polímeros de monómeros de nucleótidos, incluyendo desoxirribonucleótidos (ADN) mono y bicatenarios, ribonucleótidos (ARN), formas α-anoméricas de los mismos, análogos sintéticos y naturales de los mismos y similares. La cadena de ácido nucleico puede estar compuesta en su totalidad por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (ANP), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), análogos sintéticos o naturales de los mismos, o mezclas de los mismos. Puede usarse ADN, ARN u otros ácidos nucleicos tal como se define en el presente documento en el

método y las composiciones de la invención.

"Disolvente aprótico polar" se refiere a un disolvente orgánico que tiene un momento dipolar de aproximadamente 2 unidades Debye o más, una solubilidad en agua de al menos aproximadamente el 5% (volumen) a o cerca de temperatura ambiente, es decir, aproximadamente a 20ºC, y que no experimenta intercambio de hidrógeno significativo a aproximadamente pH neutro, es decir, en el intervalo de 5 a 9, o en el intervalo 6 a 8. Los disolventes apróticos polares incluyen los definidos según los parámetros de solubilidad de Hansen comentados a continuación.

"Alquildiílo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o cíclico, ramificado, saturado o insaturado que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la retirada de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original.

"Disolución acuosa" ha de entenderse como una disolución que contiene agua, incluso cantidades pequeñas de agua. Por ejemplo, una disolución que contiene un 1% agua ha de entenderse como una disolución acuosa.

"Aplicación de hibridación", "ensayo de hibridación", "experimento de hibridación", "procedimiento de hibridación", "técnica de hibridación", "método de hibridación", etc. ha de entenderse que se refieren a cualquier procedimiento que implica hibridación de ácidos nucleicos. A menos que se especifique otra cosa, los términos "hibridación" y "etapa de hibridación" ha de entenderse que se refieren a la etapa de reapareamiento del procedimiento de hibridación así como a la etapa de desnaturalización (si está presente).

"Composición de hibridación" se refiere a una disolución acuosa de la invención para realizar un procedimiento de hibridación, por ejemplo, para unir una sonda a una secuencia de ácido nucleico. Las composiciones de hibridación pueden comprender, por ejemplo, al menos un disolvente aprótico polar, al menos una secuencia de ácido nucleico y una disolución de hibridación. Las composiciones de hibridación no comprenden enzimas ni otros componentes, tales como desoxinucleósido trifosfatos (dNTP), para amplificar ácidos nucleicos en una muestra biológica.

"Disolución de hibridación" se refiere a una disolución acuosa para su uso en una composición de hibridación de la invención. Las disoluciones de hibridación se comentan en detalle a continuación y pueden comprender, por ejemplo, agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo.

"Composición de PCR" se refiere a una disolución acuosa de la invención para realizar un procedimiento de hibridación para amplificar una secuencia de ácido nucleico. Las composiciones de PCR pueden comprender, por ejemplo, al menos un disolvente aprótico polar, al menos una enzima para amplificar ácidos nucleicos, un conjunto de cebadores de oligonucleótido de ácido nucleico, una mezcla de dNTP y una disolución de PCR.

"Disolución de PCR" se refiere a una disolución acuosa para su uso en una composición de PCR de la invención. Las disoluciones de PCR pueden comprender por ejemplo, agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales y detergentes.

"Parámetros de solubilidad de Hansen" y "HSP" se refieren a los siguientes parámetros de energía de cohesión (solubilidad): (1) el parámetro de solubilidad en dispersión (δ_D, "parámetro D"), que mide interacciones no polares derivadas de fuerzas atómicas; (2) el parámetro de solubilidad polar (δ_P, "parámetro P"), que mide interacciones de dipolo permanente-dipolo permanente; y (3) el parámetro de solubilidad por puente de hidrógeno (δ_H, "parámetro H"), que mide intercambio de electrones. Los parámetros de solubilidad de Hansen se definen adicionalmente a continuación.

"Secuencias repetitivas" ha de entenderse que se refieren a los componentes de reapareamiento rápido (aproximadamente el 25%) y/o de reapareamiento intermedio (aproximadamente el 30%) de genomas de mamíferos. Los componentes de reapareamiento rápido contienen secuencias altamente repetitivas pequeñas (de algunos nucleótidos de longitud) encontradas habitualmente en tándem *(*por ejemplo, ADN satélite), mientras que los componentes de reapareamiento intermedio contienen ADN repetitivo intercalado. Las secuencias repetidas intercaladas se clasifican o bien como SINE (secuencias repetidas intercaladas cortas) o bien como LINE (secuencias repetidas intercaladas largas), clasificándose ambas como retrotransposones en primates. Las SINE y las LINE incluyen, pero no se limitan a, repeticiones de Alu, repeticiones de Kpn, repeticiones de dinucleótido, repeticiones de trinucleótido, repeticiones de tetranucleótido, repeticiones de pentanucleótido y repeticiones de hexanucleótido. Las repeticiones de Alu constituyen la mayoría de las SINE humanas y se caracterizan por una secuencia consenso de aproximadamente 280 a 300 pb que consiste en dos secuencias similares dispuestas como un dímero de cabeza-cola. Además de las SINE y las LINE, también existen secuencias de repetición en telómeros de cromosomas en los extremos terminales de los cromosomas y centrómeros de cromosomas, que contienen distintas secuencias de repetición que existen sólo en la región central de un cromosoma. Sin embargo, a diferencia de las SINE y las LINE, que están dispersas aleatoriamente por todo el genoma, las secuencias de repetición de telómeros y centrómeros se localizan dentro de una región determinada del cromosoma.

"No tóxico" y "toxicidad reducida" se definen con respecto al etiquetado de toxicidad de la formamida según la "Directiva 1999/45/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de mayo de 1999 acerca de la aproximación de las leyes, normativas y disposiciones administrativas de los estados miembros en relación a la clasificación, envasado y etiquetado de preparaciones peligrosas" (ecb.jrc.it/legislation/1999L0045EC.pdf) ("Directiva"). Según la

Directiva, la toxicidad se define usando el siguiente orden de clasificación: T+ “muy tóxico”; T “tóxico”, C “corrosivo”, Xn “nocivo”, Xi “irritante.” Las frases de riesgo (“frases R”) describen los riesgos de la toxicidad clasificada. La formamida se enumera como T (tóxica) y R61 (puede producir daño en el niño no nacido). Todos los productos químicos siguientes se clasifican como menos tóxicos que la formamida: acetonitrilo (Xn, R11, R20, R21, R22, R36); sulfolano (Xn, R22); γ-butirolactona (Xn, R22, R32); y carbonato de etileno (Xi, R36, R37, R38). En el momento de presentar esta solicitud, tritiocarbonato de etileno y sulfito de glicol no aparecen etiquetados en la actualidad.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “desnaturalización a temperatura reducida” y “desnaturalización a baja temperatura” se refieren a desnaturalizaciones realizadas por debajo de aproximadamente 82ºC.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “temperatura ambiente” y “TA” se refieren a de aproximadamente 20ºC a aproximadamente 25ºC, a menos que se establezca otra cosa.

B. Selección de disolvente

Los disolventes apróticos polares adecuados para su uso en la invención pueden seleccionarse basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen. Se conocen en la técnica métodos para determinar y/o calcular experimentalmente los HSP para un disolvente, y se han notificado HSP para más de 1200 productos químicos.

Por ejemplo, el parámetro D puede calcularse con precisión razonable basándose en el índice de refracción, o puede deducirse a partir de diagramas comparándolo con disolventes conocidos de tamaño, forma y composición similares tras establecer una temperatura y volumen molar críticos. El parámetro P puede estimarse a partir de momentos dipolares conocidos (véase, por ejemplo, McClellan A.L., Tables of Experimental Dipole Moments (W.H. Freeman 1963)) usando la ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1: } \delta_P = 37{,}4(\text{momento dipolar})/V^{1/2}$$

donde V es el volumen molar. No hay ecuaciones para calcular el parámetro H. En cambio, el parámetro H se determina habitualmente basándose en contribuciones de grupo.

Las caracterizaciones del HSP se visualizan convenientemente usando una representación esférica, con el HSP de un disolvente de referencia adecuado determinado experimentalmente en el centro de la esfera. El radio de la esfera (R) indica la variación tolerable máxima del HSP del disolvente de referencia que todavía permite que tenga lugar una “buena” interacción. Los disolventes buenos están dentro de la esfera y los malos están fuera. La distancia, R_a, entre dos disolventes basada en sus valores de HSP respectivos puede determinarse usando la ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2: } (R_a)^2 = 4(\delta_{D1}-\delta_{D2})^2 + (\delta_{P1}-\delta_{P2})^2(\delta_{H1}-\delta_{H2})^2$$

donde el subíndice 1 indica la muestra de referencia, el subíndice 2 indica el producto químico de prueba, y todos los valores se dan en $MPa^{1/2}$. La buena solubilidad requiere que R_a sea menor que el radio determinado experimentalmente de la esfera de solubilidad R_o. La diferencia de energía relativa entre dos disolventes, es decir, el número RED, puede calcularse tomando la razón de R_a con respecto a R_o, tal como se muestra en la ecuación 3.

$$\text{Ecuación 3: } \text{RED} = R_a/R_o$$

Los números RED menores de 1,0 indican alta afinidad; los números RED iguales o próximos a 1,0 indican condiciones límite; y los números RED progresivamente superiores indican afinidades progresivamente inferiores.

En algunas realizaciones, los parámetros D de los disolventes apróticos polares de la invención son de entre 17,7 y 22,0 $MPa^{1/2}$. Tales parámetros D relativamente altos están asociados generalmente con disolventes que tienen estructuras cíclicas y/o estructuras con azufre o halógenos. No es probable que los compuestos lineales estén entre los disolventes apróticos polares más adecuados para su uso en la invención, pero pueden considerarse si sus parámetros P y H están dentro de los intervalos comentados a continuación. Puesto que el parámetro D se multiplica por 4 en la ecuación 2, los límites son la mitad de R_o. Además, debe observase que valores de D de aproximadamente 21 o superiores a menudo son característicos de un sólido.

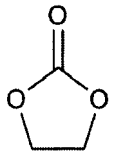
En algunas realizaciones, los parámetros P de los disolventes apróticos polares de la invención son de entre 13 y 23 $MPa^{1/2}$. Tales parámetros P excepcionalmente altos están asociados generalmente con disolventes que tienen un alto momento dipolar y presumiblemente también un volumen molecular relativamente bajo. Por ejemplo, para V cerca de 60 cc/mol, el momento dipolar debe ser de entre 4,5 y 3,1. Para V cerca de 90 cc/mol, el momento dipolar debe ser de entre 5,6 y 3,9.

En algunas realizaciones, los parámetros H de los disolventes apróticos polares de la invención son de entre 3 y 13 $MPa^{1/2}$. Generalmente, los disolventes apróticos polares que tienen un grupo alcohol no son útiles en las composiciones y los métodos de la invención, puesto que los parámetros H de tales disolventes serían demasiado altos.

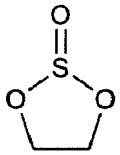
El volumen molar del disolvente aprótico polar también puede ser relevante, puesto que entra en la evaluación de los

tres parámetros de solubilidad de Hansen. A medida que el volumen molar se hace más pequeño, los líquidos tienen a evaporarse rápidamente. A medida que el volumen molar se hace más grande, los líquidos tienden a entrar en la región sólida en el intervalo de los parámetros D y P enumerados anteriormente. Por tanto, los disolventes apróticos polares de la invención están bastante próximos al límite líquido/sólido en el espacio de HSP.

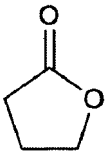
En algunas realizaciones, los disolventes apróticos polares de la invención tienen funcionalidad lactona, sulfona, nitrilo, sulfito y/o carbonato. Tales compuestos se distinguen por sus constantes dieléctricas relativamente altas, altos momentos dipolares y solubilidad en agua. Un disolvente aprótico polar con funcionalidad lactona a modo de ejemplo es γ-butirolactona (GBL), un disolvente aprótico polar con funcionalidad sulfona a modo de ejemplo es sulfolano (SL; sulfuro-dióxido de tetrametileno), un disolvente aprótico polar con funcionalidad nitrilo a modo de ejemplo es acetonitrilo (AN), un disolvente aprótico polar con funcionalidad sulfito a modo de ejemplo es sulfito de glicol/sulfito de etileno (GS) y los disolventes apróticos polares con funcionalidad carbonato a modo de ejemplo son carbonato de etileno (EC), carbonato de propileno (PC) o tritiocarbonato de etileno (ETC). A continuación se facilitan las estructuras de estos disolventes a modo de ejemplo y en la tabla 1 se facilitan sus parámetros de solubilidad de Hansen, números RED y volúmenes molares.



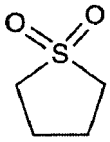
carbonato de etileno



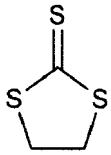
sulfito de glicol



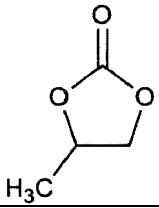
γ-butirolactona



sulfolano



tritiocarbonato de etileno



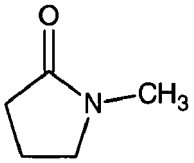
carbonato de propileno

Tabla 1

	D	P	H	RED	Volumen molar (cm^3/mol)
Correlación (R_0=3,9)	19,57	19,11	7,71	-	-
GBL	19,0	16,6	7,4	0,712	76,5
PC	20,0	18,0	4,1	0,993	85,2
SL	20,3	18,2	10,9	0,929	95,7
EC	19,4	21,7	5,1	0,946	66,0
ETC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
GS	20,0	15,9	5,1	n/d	75,1

n/d = no disponible

Otros disolventes apróticos polares adecuados que pueden usarse en la invención son compuestos cíclicos tales como, por ejemplo, ε-caprolactona. Además, también pueden ser adecuadas para su uso en la invención pirrolidinonas sustituidas y estructuras relacionadas con nitrógeno en un anillo de 5 ó 6 miembros, y estructuras cíclicas con dos grupos nitrilo, o un bromo y un grupo nitrilo. Por ejemplo, la N-metilpirrodinona (mostrada a continuación puede ser un disolvente aprótico polar adecuado para su uso en los métodos y composiciones de la invención.



Otros disolventes apróticos polares adecuados pueden contener un grupo uretano en anillo (NHCOO-). Sin embargo, no todos estos compuestos son adecuados, puesto que la 1,3-dimetil-2-imidazolidinona no produce señales cuando se usa en las composiciones de hibridación de la invención. Un experto en la técnica puede examinar los compuestos útiles en las composiciones y los métodos de la invención tal como se describe en el presente documento. Los productos químicos a modo de ejemplo que pueden ser adecuados para su uso en la invención se exponen en las tablas 2 y 3 a continuación.

Tabla 2

Disolvente	D	P	H
Acetanilida	20,6	13,3	12,4
N-Acetilpirrolidona	17,8	13,1	8,3

4-Aminopiridina	20,4	16,1	12,9
Benzamida	21,2	14,7	11,2
Benzimidazol	20,6	14,9	11,0
1,2,3-Benzotriazol	18,7	15,6	12,4
Dióxido de butadieno	18,3	14,4	6,2
Carbonato de 2,3-butileno	18,0	16,8	3,1
(Épsilon) Caprolactona	19,7	15,0	7,4
Anhídrido cloro-maleico	20,4	17,3	11,5
2-Clorociclohexanona	18,5	13,0	5,1
Cloronitrometano	17,4	13,5	5,5
Anhídrido citracónico	19,2	17,0	11,2
Crotonolactona	19,0	19,8	9,6
Ciclopentanona	17,8	11,9	5,2
Ciclopropilnitrilo	18,6	16,2	5,7
Sulfato de dimetilo	17,7	17,0	9,7
Dimetilsulfona	19,0	19,4	12,3
1,2-Dinitrobenceno	20,6	22,7	5,4
2,4-Dinitrotolueno	20,0	13,1	4,9
Difenilsulfona	21,1	14,4	3,4
1,2-Dinitrobenceno	20,6	22,7	5,4
2,4-Dinitrotolueno	20,0	13,1	4,9
Épsilon-Caprolactama	19,4	13,8	3,9
Cloruro de etanosulfonilo	17,7	14,9	6,8
N-etil-2-pirrolidona	18,0	12,0	7,0
N-formil-piperidina	18,7	10,6	7,8
Furfural	18,6	14,9	5,1
2-Furonitrilo	18,4	15,0	8,2
Isoxazol	18,8	13,4	11,2
Anhídrido maleico	20,2	18,1	12,6
Malononitrilo	17,7	18,4	6,7
4-Metoxi-benzonitrilo	19,4	16,7	5,4
1-Metoxi-2-nitrobenceno	19,6	16,3	5,5
1-Metil-imidazol	19,7	15,6	11,2
3-Metil-isoxazol	19,4	14,8	11,8
N-Metil-2-pirrolidona	18,0	12,3	7,2
N-óxido de N-metil-morfolina	19,0	16,1	10,2
Metil-fenil-sulfona	20,0	16,9	7,8
Metil-sulfolano	19,4	17,4	5,3
4-Toluenosulfonato de metilo	19,6	15,3	3,8
3-Nitroanilina	21,2	18,7	10,3
2-Nitrotiofeno	19,7	16,2	8,2
2,10-Fenantrenoquinona	20,3	17,1	4,8
Anhídrido ftálico	20,6	20,1	10,1
1,3-Propanosulfona	18,4	16,0	9,0
Beta-Propiolactona	19,7	18,2	10,3
2-Pirrolidona	19,4	17,4	11,3
Sacarina	21,0	13,9	8,8
Succinonitrilo	17,9	16,2	7,9
Sulfanilamida	20,0	19,5	10,7
Sulfonano	20,3	18,2	10,9
2,2,6,6-Tetraclorociclohexanona	19,5	14,0	6,3
Tetrametilensulfóxido	18,2	11,0	9,1
Tiazol	20,5	18,8	10,8
3,3,3-Tricloropropeno	17,7	15,5	3,4
1,1,2-Tricloropropeno	17,7	15,7	3,4
1,2,3-Tricloropropeno	17,8	15,7	3,4
Carbonato de vinileno	17,3	18,1	9,6

La tabla 2 expone una lista a modo de ejemplo de posibles productos químicos para su uso en las composiciones y los métodos de la invención basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen. Naturalmente otros compuestos también cumplen estos requisitos tales como, por ejemplo, los expuestos en la tabla 3.

Tabla 3

Producto químico (momento dipolar)	RED	Punto de fusión, ºC
Carbonato de cloroetileno (4,02)	0,92	-
2-Oxazolidinona (5,07)	0,48	86-89
2-Imidazol	1,49	90-91
1,5-Dimetiltetrazol (5,3)	~1,5	70-72
N-Etiltetrazol (5,46)	~1,5	
Sulfuro-dióxido de trimetileno (4,49)	-	-
Sulfito de trimetileno (3,63)	-	
1,3-Dimetil-5-tetrazol (4,02)	-	-
Piridazina (3,97)	1,16	-8
2-Tiouracilo (4,21)	-	-
N-Metilimidazol (6,2)	1,28	-
1-Nitroso-2-pirrolidinona	~1,37	-
Fosfinato de etil-etilo (3,51)	-	-
5-Ciano-2-tiouracilo (5,19)	-	-
4H-Piran-4-tiona (4,08)	1,35	32-34
4H-Piran-4-ona = gamma-pirona (4,08)	1,49	Punto de ebullición (PB) 80
2-Nitrofurano (4,41)	1,14	29
Alfa-Bromo-tetronato de metilo (6,24)	-	-
Óxido de tetrahidrotiapirano (4,19)	1,75	60-64
Picolinonitrilo (2-cianopiridina) (5,23)	0,40	26-28 (PB 212-215)
Nitrobencimidazol (6,0)	0,52	207-209
Isatina (5,76)	-	193-195
N-fenil-sidnona (6,55)	-	-
Sulfato de glicol (etilenglicol) Nota: no soluble al 40%	-	99ºC

Algunos de los productos químicos enumerados en las tablas 2 y 3 se han usado en aplicaciones de hibridación y/o PCR en la técnica anterior (por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) se ha usado en aplicaciones de hibridación y PCR, y el sulfolano (SL), el acetonitrilo (AN), la 2-pirrolidona, la ε-caprolactama y el etilenglicol se han usado en aplicaciones de PCR). Tal como se estableció anteriormente, el disolvente aprótico polar en la invención no es DMSO. En algunas realizaciones, el disolvente aprótico polar no es sulfolano, acetonitrilo, 2-pirrolidona, ε-caprolactama ni etilenglicol. Sin embargo, la mayoría de los disolventes apróticos polares no se han usado en aplicaciones de hibridación de la técnica anterior. Además, aun cuando tales compuestos se hubieran usado, la técnica anterior no reconocía que pudieran usarse ventajosamente para disminuir las temperaturas de desnaturalización ni para eliminar la etapa de desnaturalización de las aplicaciones de hibridación, tal como se da a conocer en esta solicitud.

Además, no todos los productos químicos enumerados en las tablas 2 y 3 son adecuados para su uso en las composiciones y los métodos de la invención. Por ejemplo, aunque los parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) del DMSO caen dentro de los intervalos enumerados anteriormente, el DMSO no funciona para eliminar la etapa de desnaturalización en los métodos de la invención. Sin embargo, está completamente dentro de las competencias del experto habitual examinar compuestos adecuados usando las orientaciones proporcionadas en el presente documento incluyendo someter a prueba un compuesto en uno de los ejemplos proporcionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los disolventes apróticos polares adecuados tendrán HSP dentro de los intervalos enumerados anteriormente y una estructura mostrada en las fórmulas 1-9 anteriormente.

Disolventes apróticos polares mostrados a modo de ejemplo adicionales adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen delta-valerolactona (2-piperidona), gamma-valerolactona, sulfoleno (butadienosulfona), pentametilenosulfona, y 1,2-dioxan-2-ona.

En algunas realizaciones, el disolvente aprótico polar se elige de carbonato de etileno, sulfolano, gamma-butirolactona y carbonato de propileno. En otras realizaciones, el disolvente aprótico polar se elige de carbonato de etileno, sulfolano, gamma-butirolactona, carbonato de propileno, tritiocarbonato de etileno, sulfito de glicol/sulfito de etileno, delta-valerolactama (2-piperidona) y 1-óxido de tetrahidrotiofeno. Aún en otras realizaciones, el disolvente aprótico polar se elige de carbonato de etileno, sulfolano, gamma-butirolactona, carbonato de propileno, tritiocarbonato de etileno, sulfito de glicol/sulfito de etileno, delta-valerolactama (2-piperidona), 2-pirrolidona, 1-óxido de tetrahidrotiofeno, pentametilensulfona y 1,2-dioxan-2-ona.

C. Composiciones, tampones y disoluciones

(1) Disoluciones de hibridación

Se conocen en la técnica disoluciones de hibridación tradicionales. Tales disoluciones pueden comprender, por

ejemplo, agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo.

Por ejemplo, los agentes tamponantes pueden incluir SSC, HEPES, SSPE, PIPES, TMAC, TRIS, SET, ácido cítrico, un tampón fosfato, tal como, por ejemplo, fosfato de potasio o pirofosfato de sodio, etc. Los agentes tamponantes pueden estar presentes a concentraciones de desde 0,01x hasta 50x, tal como, por ejemplo, 0,01x, 0,1x, 0,5x, 1x, 2x, 5x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x o 50x. Normalmente, los agentes tamponantes están presentes a concentraciones de desde 0,1x hasta 10x.

Los agentes acelerantes pueden incluir polímeros tales como FICOLL, PVP, heparina, sulfato de dextrano, proteínas tales como BSA, glicoles tales como etilenglicol, glicerol, 1,3 propanodiol, propilenglicol o dietilenglicol, combinaciones de los mismos tales como disolución de Dernhardt y BLOTTO, y disolventes orgánicos tales como formamida, dimetilformamida, etc. El agente acelerante puede estar presente a concentraciones de desde el 1% hasta el 80% o del 0,1x al 10x, tal como, por ejemplo, el 0,1% (o 0,1x), el 0,2% (o 0,2x), el 0,5% (o 0,5x), el 1% (o 1x), el 2% (o 2x), el 5% (o 5x), el 10% (o 10x), el 15% (o 15x), el 20% (o 20x), el 25% (o 25x), el 30% (o 30x), el 40% (o 40x), el 50% (o 50x), el 60% (o 60x), el 70% (o 70x), o el 80% (o 80x). Normalmente, la formamida está presente a concentraciones de desde el 25% hasta el 75%, tal como el 25%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 75%, mientras que el sulfato de dextrano y el glicol están presentes a concentraciones de desde el 5% hasta el 10%, tal como el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9% o el 10%.

Los agentes quelantes pueden incluir EDTA, EGTA, etc. Los agentes quelantes pueden estar presentes a concentraciones de desde 0,1 mM hasta 10 mM, tal como 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM o 10 mM. Normalmente, los agentes quelantes están presentes a concentraciones de desde 0,5 mM hasta 5 mM, tal como 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM o 5 mM.

Las sales pueden incluir cloruro de sodio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, etc. Las sales pueden estar presentes a concentraciones de desde 1 mM hasta 750 mM, tal como 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM o 750 mM. Normalmente, las sales están presentes a concentraciones de desde 10 mM hasta 500 mM, tal como 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM o 500 mM.

Los detergentes pueden incluir Tween, SDS, Triton, CHAPS, ácido desoxicólico, etc. El detergente puede estar presente a concentraciones de desde el 0,001% hasta el 10%, tal como, por ejemplo, el 0,0001, el 0,01, el 0,1, el 0,5, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10%. Normalmente, los detergentes están presentes a concentraciones de desde el 0,01% hasta el 1%, tal como el 0,01%, el 0,02%, el 0,03%, el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9% o el 1%.

Los agentes de bloqueo de ácido nucleico pueden incluir, ARNt de levadura, ADN homopolimérico, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, ADN de esperma de arenque, ADN humano total, ADN de COT1, etc. Los ácidos nucleicos de bloqueo pueden estar presentes a concentraciones de 0,05 mg/ml a 100 mg/ml. Sin embargo, las composiciones y los métodos de la invención muestran sorprendentemente niveles de fondo reducidos significativamente sin necesidad de agentes de bloqueo, y sin necesidad de hibridación durante la noche en tampones que contienen formamida.

Existe una gran variación en la bibliografía respecto a las disoluciones de hibridación tradicionales. Por ejemplo, una disolución de hibridación tradicional puede comprender SSC 5x o 6x, EDTA 0,01 M, disolución de Dernhardt 5x, SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado, sometido a cizalladura 100 mg/ml. Otra disolución de hibridación tradicional puede comprender HEPES 50 mM, NaCl 0,5 M y EDTA 0,2 mM. Una disolución de hibridación típica para FISH en muestras biológicas para la detección de ARN puede comprender, por ejemplo, SSC 2x, sulfato de dextrano al 10%, complejo de vanadilo-ribonucleósido 2 mM, formamida al 50%, BSA libre de ARN al 0,02% y ARNt de *E. coli* 1 mg/ml. Una disolución de hibridación típica para FISH en muestras biológicas para detección de ADN puede comprender, por ejemplo, SSC 2x, sulfato de dextrano al 10%, formamida al 50%, y por ejemplo, ADN de esperma de salmón 0,3 mg/ml o ADN de COT1 0,1 mg/ml. Otras disoluciones de hibridación típicas pueden comprender formamida al 40%, sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, Alu-ANP (ANP de bloqueo) o ADN de COT-1, y en algunos casos ADN humano total 0,1 µg/µl (THD).

Las composiciones de la invención pueden comprender una disolución de hibridación que comprende cualquiera de los componentes de las disoluciones de hibridación tradicionales citados anteriormente en combinación con al menos un disolvente aprótico polar. Los componentes tradicionales pueden estar presentes a las mismas concentraciones tal como se usa en las disoluciones de hibridación tradicionales, o pueden estar presentes a concentraciones superiores o inferiores, o pueden omitirse completamente.

Por ejemplo, si las composiciones de la invención comprenden sales tales como NaCl y/o tampón fosfato, las sales pueden estar presentes a concentraciones de 0-1200 mM de NaCl y/o 0-200 mM de tampón fosfato. En algunas realizaciones, las concentraciones de sales pueden ser de, por ejemplo, NaCl 300 mM y/o tampón fosfato 5 mM, o NaCl 600 mM y/o tampón fosfato 10 mM.

Si las composiciones de la invención comprenden agentes acelerantes tales como sulfato de dextrano o glicol, el

sulfato de dextrano puede estar presente a concentraciones de desde el 5% hasta el 40% y el glicol puede estar presente a concentraciones de desde el 0,1% hasta el 10%. En algunas realizaciones, la concentración de sulfato de dextrano puede ser del 10% o del 20% y la concentración de etilenglicol, 1,3-propanodiol, o glicerol puede ser del 1% al 10%. En algunas realizaciones, la composición acuosa no comprende formamida como agente acelerante, o comprende formamida con la condición de que la composición contenga menos del 50%, o menos del 25%, o menos del 10%, o menos del 5%, o menos del 2%, o menos del 1%, o menos del 0,5%, o menos del 0,1%, o menos del 0,05%, o menos del 0,01%.

Si las composiciones de la invención comprenden ácido cítrico, las concentraciones pueden oscilar entre 1 mM y 50 mM y el pH puede oscilar entre 5,0 y 8,0. En algunas realizaciones, la concentración de ácido cítrico puede ser de 10 mM y el pH puede ser de 6,2.

Las composiciones de la invención pueden comprender agentes que reducen la unión no específica a, por ejemplo, la membrana celular, tal como esperma de salmón o pequeñas cantidades de ADN humano total o, por ejemplo, pueden comprender agentes de bloqueo para bloquear la unión de, por ejemplo, secuencias de repetición a la diana tal como cantidades mayores de ADN humano total o ADN enriquecido en repeticiones o agentes de bloqueo específicos tales como fragmentos y secuencias de ANP o ANB. Estos agentes pueden estar presentes a concentraciones de desde 0,01-100 μg/μl o 0,01-100 μM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, estos agentes serán ADN humano total 0,1 μg/μl o ADN no humano 0,1 μg/μl, tal como esperma de arenque, esperma de salmón, o ADN de timo de ternero, o ANP de bloqueo 5 μM. Sin embargo, las composiciones y los métodos de la invención muestran sorprendentemente niveles de fondo significativamente reducidos sin necesidad de agentes de bloqueo, y sin necesidad de hibridación durante la noche en tampones que contienen formamida.

Un aspecto de la invención es una composición o disolución para su uso en hibridación. Las composiciones para su uso en la invención incluyen una composición acuosa que comprende una secuencia de ácido nucleico y al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos bicatenarios. Una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos bicatenarios es una cantidad que permite la hibridación. Por ejemplo, una manera de someter a prueba si la cantidad de disolvente aprótico polar es eficaz para permitir la hibridación es determinar si el disolvente aprótico polar, cuando se usa en las composiciones y los métodos de hibridación descritos en el presente documento, tal como en el ejemplo 1, produce una señal detectable y/o un producto de ácido nucleico amplificado.

Los ejemplos no limitativos de cantidades eficaces de disolventes apróticos polares incluyen, por ejemplo, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 95% (v/v). En algunas realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 5% al 60% (v/v). En otras realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 10% al 60% (v/v). Todavía en otras realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 30% al 50% (v/v). También son adecuadas concentraciones del 1% al 5%, del 5% al 10%, del 10%, del 10% al 20%, del 20% al 30%, del 30% al 40%, del 40% al 50% o del 50% a 60% (v/v). En algunas realizaciones, el disolvente aprótico polar estará presente a una concentración del 0,1%, el 0,25%, el 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4% o el 5% (v/v). En otras realizaciones, el disolvente aprótico polar estará presente a una concentración del 7%, el 7,5%, el 8%, el 8,5%, el 9%, el 9,5%, el 10%, el 10,5%, el 11%, el 11,5%, el 12%, el 12,5%, el 13%, el 13,5%, el 14%, el 14,5%, el 15%, el 15,5%, el 16%, el 16,5%, el 17%, el 17,5%, el 18%, el 18,5%, el 19%, el 19,5% o el 20% (v/v).

Si las composiciones dadas a conocer se usan en un ensayo de hibridación, pueden comprender además una o más sondas de ácido nucleico. Las sondas pueden marcarse directa o indirectamente con compuestos detectables tales como enzimas, cromóforos, fluorocromos y haptenos. Las sondas de ADN pueden estar presentes a concentraciones de 0,1 a 100 ng/μl. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas pueden estar presentes a concentraciones de 1 a 10 ng/μl. Las sondas de ANP pueden estar presentes a concentraciones de 0,5 a 5000 nM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas pueden estar presentes a concentraciones de 5 a 1000 nM.

En una realización, una composición dada a conocer comprende una mezcla de disolvente aprótico polar al 40% (v/v) (por ejemplo, carbonato de etileno, “EC”), sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM y sonda 1-10 ng/μl. Otra composición a modo de ejemplo comprende una mezcla de EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM y ADN humano total 0,1 μg/μl. Aún otra composición a modo de ejemplo comprende EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, ácido cítrico 10 mM pH 6,2, y ADN no humano 0,1 μg/μl (por ejemplo, esperma de arenque, esperma de salmón o timo de ternero) O formamida al 0,5% O glicol (por ejemplo, etilenglicol, 1,3 propanodiol o glicerol) al 1%. Una composición a modo de ejemplo adicional comprende EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, tampón citrato 10 mM pH 6,2.

(2) Disolvente(s) aprótico(s) polar(es)

Disolventes apróticos polares diferentes pueden conferir propiedades diferentes a las composiciones dadas a conocer. Por ejemplo, la elección del disolvente aprótico polar puede contribuir a la estabilidad de la composición, puesto que determinados disolventes apróticos polares pueden degradarse a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el disolvente aprótico polar, carbonato de etileno, se descompone en etilenglicol, que es una molécula relativamente estable, y dióxido de carbono, que puede interaccionar con agua para formar ácido carbónico, alterando la acidez de las composiciones de la invención. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que el cambio en el pH tras la

descomposición del carbonato de etileno y el daño en el ADN a partir de un largo almacenamiento hacen que las composiciones de la invención sean menos eficaces para hibridación. Sin embargo, la estabilidad puede mejorarse reduciendo el pH de la composición, añadiendo ácido cítrico como tampón a pH 6,2 en lugar del tampón fosfato tradicional, que se usa normalmente a aproximadamente pH 7,4, y/o añadiendo etilenglicol a concentraciones, por ejemplo, de entre el 0,1% y el 10%, o entre el 0,5% y el 5%, tal como, por ejemplo, el 1%, el 2%, el 3%, etc. Por ejemplo, con tampón citrato 10 mM, las composiciones dadas a conocer son estables a 2-8ºC durante aproximadamente 8 meses. La estabilidad también puede mejorarse si las composiciones se almacenan a bajas temperaturas (por ejemplo, -20ºC).

Además, determinados disolventes apróticos polares pueden hacer que las composiciones dadas a conocer se separen en sistemas de múltiples fases en determinadas condiciones. Las condiciones en las que se obtienen sistemas de múltiples fases pueden ser diferentes para disolventes apróticos polares diferentes. Generalmente, sin embargo, a medida que aumenta la concentración de disolvente aprótico polar, aumenta el número de fases. Por ejemplo, las composiciones que comprenden bajas concentraciones de carbonato de etileno (es decir, menos del 20%) pueden existir como una fase, mientras que las composiciones que comprenden concentraciones superiores de carbonato de etileno pueden separarse en dos, o incluso tres fases. Por ejemplo, las composiciones que comprenden carbonato de etileno al 15% existen como una única fase a temperatura ambiente, mientras que las composiciones que comprenden carbonato de etileno al 40% consisten en una fase inferior viscosa (aproximadamente el 25% del volumen total) y una fase superior menos viscosa (aproximadamente el 75% del volumen total) a temperatura ambiente.

Por otra parte, algunos disolventes apróticos polares pueden existir en dos fases a temperatura ambiente incluso a bajas concentraciones. Por ejemplo, sulfolano, γ-butirolactona, tritiocarbonato de etileno, sulfito de glicol y carbonato de propileno existen como dos fases a concentraciones del 10, el 15, el 20 o el 25% (sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, tampón citrato 10 mM) a temperatura ambiente.

También puede ser posible alterar el número de fases ajustando la temperatura de las composiciones dadas a conocer. Generalmente, a medida que aumenta la temperatura, disminuye el número de fases. Por ejemplo, a 2-8ºC, las composiciones que comprenden carbonato de etileno al 40% pueden separarse en un sistema de tres fases.

También puede ser posible alterar el número de fases ajustando la concentración de sulfato de dextrano y/o sal en la composición. En general, disminuir la concentración de sulfato de dextrano (la concentración tradicional es del 10%) y/o la concentración de sal puede reducir el número de fases. Sin embargo, dependiendo del disolvente aprótico polar particular y de su concentración en la composición, pueden producirse fases únicas incluso con concentraciones superiores de sal y sulfato de dextrano. Por ejemplo, una composición que comprende bajas cantidades de EC *(*por ejemplo, el 15%, el 10% o el 5%) puede funcionar bien aumentando las concentraciones de sulfato de dextrano y sal, mientras que todavía se mantiene un sistema de una fase. En una realización particular, las composiciones que comprenden una sonda de ADN de gen HER2, una sonda de ANP de CEN7, EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM y tampón fosfato 10 mM se congelan a -20ºC. En otras realizaciones, las composiciones son líquidas a -20ºC.

Algunos disolventes apróticos polares pueden producir señales más fuertes en una fase u otra. Por ejemplo, el sulfito de glicol al 40% produce fuertes señales en la fase inferior y no produce señales en la fase superior. De manera similar, determinados tipos de sondas pueden producir señales más fuertes en una fase u otra. Por ejemplo, las sondas de ANP tienden a mostrar señales más fuertes en la fase inferior que en la fase superior.

Por consiguiente, los sistemas de múltiples fases dados a conocer pueden usarse para examinar convenientemente diferentes aspectos de una muestra. Por ejemplo, un sistema de dos fases podría usarse para separar muestras marcadas con sondas de ANP a partir de muestras marcadas con sondas de ADN. Otros usos incluyen aislamiento de una fase específica que muestra, por ejemplo, determinadas ventajas tales como que la fase aislada puede usarse como sistema de fase única. La sonda y/o la muestra pueden añadirse antes de, o tras el aislamiento de una fase particular.

Las aplicaciones de hibridación pueden realizarse con una composición de una fase dada a conocer, con fases individuales de las composiciones de múltiples fases dadas a conocer, o con mezclas de una cualquiera o más de las fases en una composición de múltiples fases dada a conocer. Por ejemplo, en un sistema de una fase, puede extraerse un volumen de la muestra para su uso en la hibridación. En un sistema de múltiples fases, puede extraerse un volumen de muestra de la fase de interés (por ejemplo, la fase superior, inferior o media) para su uso en la hibridación. Alternativamente, las fases en un sistema de múltiples fases pueden mezclarse antes de extraer un volumen de la muestra mezclada para su uso en la hibridación. Sin embargo, el sistema de múltiples fases puede producir tinción de fondo local fuerte e irregular en la composición. Aunque la adición de pequeñas cantidades de formamida reducirá el fondo en un sistema de una fase, tiene poco efecto en un sistema de múltiples fases con altas concentraciones *(*por ejemplo, el 40%) de un disolvente aprótico polar. Además, a medida que aumenta la concentración de formamida, se requieren concentraciones superiores de sonda y/o tiempos de hibridación más largos para mantener la intensidad de señal fuerte.

(3) Optimización para aplicaciones particulares

Las composiciones dadas a conocer pueden variarse con el fin de optimizar los resultados para una aplicación particular. Por ejemplo, la concentración de disolvente aprótico polar, sal, agente acelerante, agente de bloqueo y/o iones hidrógeno *(*es decir pH) puede variarse con el fin de mejorar los resultados para una aplicación particular.

Por ejemplo, la concentración de disolvente aprótico polar puede variarse con el fin de mejorar la intensidad de señal y la tinción de fondo. Generalmente, a medida que aumenta la concentración de disolvente aprótico polar, aumenta la intensidad de señal y disminuye la tinción de fondo. Por ejemplo, las composiciones que comprenden EC al 15% tienen a mostrar señales más fuertes y menos fondo que las composiciones que comprenden EC al 5%. Sin embargo, la intensidad de señal puede mejorarse para composiciones que tienen bajas concentraciones de disolvente aprótico polar (por ejemplo, del 0% al 20%) si se aumentan las concentraciones de sal y/o sulfato de dextrano. Por ejemplo, pueden observarse señales fuertes con EC del 5% al 10% a medida que la concentración de sal se eleva de aproximadamente 3 a 4 veces por encima de las concentraciones de sal tradicionales (es decir, aproximadamente NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM; las concentraciones de sal tradicionales son de aproximadamente NaCl 300 mM). Asimismo, cuando se usan concentraciones inferiores de disolvente aprótico polar, generalmente se requieren concentraciones superiores de sulfato de dextrano para mantener buena señal e intensidad de fondo.

Por consiguiente, las concentraciones de sal y sulfato de dextrano también pueden variarse con el fin de mejorar la intensidad de señal y la tinción de fondo. Generalmente, a medida que aumentan las concentraciones de sal y sulfato de dextrano, aumenta la intensidad de señal y disminuye el fondo. Por ejemplo, concentraciones de sal que son aproximadamente de dos a cuatro veces las concentraciones tradicionales (es decir, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM) producen señales fuertes y bajo fondo. Sorprendentemente, sin embargo, se produce hibridación usando las composiciones de la invención incluso en ausencia completa de sal. Las intensidades de señal pueden mejorarse en condiciones sin sal aumentando las concentraciones de agente acelerante y/o disolvente aprótico polar.

Asimismo, la intensidad de señal aumenta a medida que aumenta la concentración de sulfato de dextrano desde el 0% hasta el 20%. Sin embargo, pueden observarse incluso buenas señales a concentraciones de sulfato de dextrano del 0%. La intensidad de señal puede mejorarse con concentraciones de sulfato de dextrano bajas aumentando las concentraciones de disolvente aprótico polar y/o de sal.

Además, los tipos de sondas usadas en las composiciones dadas a conocer pueden variarse para mejorar los resultados. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, combinaciones de sondas de ADN/ADN pueden mostrar menos fondo que combinaciones de sondas de ADN/ANP en las composiciones dadas a conocer o viceversa. Por otra parte, las sondas de ANP tienen a mostrar señales más fuertes que las sondas de ADN con bajas concentraciones de sal y/o bajas concentraciones de disolvente aprótico polar. De hecho, las sondas de ANP también muestras señales cuando no está presente disolvente aprótico polar, mientras que las sondas de ADN muestran señales débiles o ausencia de las mismas sin disolvente aprótico polar.

D. Aplicaciones, métodos y usos

(1) Muestras analíticas

Los métodos de la invención pueden usarse completa o parcialmente en todos los tipos de aplicaciones de hibridación en los campos de citología, histología o biología molecular. Según una realización, la primera o la segunda secuencia de ácido nucleico en los métodos de la invención está presente en una muestra biológica. Los ejemplos de tales muestras incluyen, por ejemplo, muestras tisulares, preparaciones de células, preparaciones de fragmentos de células y preparaciones de componentes celulares aislados o enriquecidos. La muestra puede originarse a partir de diversos tejidos tales como, por ejemplo, de mama, de pulmón, colorrectal, de próstata, de pulmón, de cabeza y cuello, de estómago, de páncreas, de esófago, de hígado y de vejiga, u otros tejidos relevantes y neoplasia de los mismos, cualquier suspensión celular, muestra de sangre, aspiración con aguja fina, líquido ascítico, esputo, lavado peritoneal, lavado pulmonar, orina, heces, raspado de células, frotis de células, células sometidas a Cytospin o Cytoprep.

La muestra puede aislarse y procesarse usando protocolos convencionales. Por ejemplo, pueden obtenerse preparaciones de fragmentos celulares mediante homogeneización de células, tratamiento de congelación-descongelación o lisado celular. La muestra aislada puede tratarse de muchas formas diferentes dependiendo de la finalidad de obtención de la muestra y dependiendo de la rutina en el centro. La muestra se trata a menudo con diversos reactivos para conservar el tejido para el análisis posterior de la muestra, alternativamente la muestra puede analizarse directamente. Ejemplos de métodos usados ampliamente para conservar muestras son fijación con formalina seguida por inclusión en parafina y crioconservación.

Para las extensiones en metafase, los cultivos celulares generalmente se tratan con colcemida, u otro agente de alteración del polo del huso adecuado, para detener el ciclo celular en metafase. Entonces se fijan las células y se colocan sobre portaobjetos de microscopio, se tratan con formaldehído, se lavan y se deshidratan en etanol. Entonces se añaden sondas y se analizan las muestras mediante cualquiera de las técnicas comentadas a continuación.

La citología implica el examen de células individuales y/o extensiones cromosómicas a partir de una muestra biológica. El examen citológico de una muestra comienza obteniendo una muestra de células, que normalmente puede realizarse mediante rascado, lavado o cepillado de una zona, como en el caso de las muestras de cuello uterino, o recogiendo líquidos corporales, tales como los obtenidos de la cavidad torácica, la vejiga o la columna vertebral, o mediante aspiración con aguja fina o biopsia con aguja fina, como en el caso de tumores internos. En una preparación citológica manual convencional, la muestra se transfiere a un material de suspensión líquido y las células en el líquido se transfieren entonces directamente o mediante etapas de procesamiento basadas en centrifugación a un portaobjetos de vidrio de microscopio para su visualización. En una preparación citológica automatizada típica, se coloca un conjunto de filtro en la suspensión líquida y el conjunto de filtro tanto dispersa las células como captura las células sobre el filtro. Entonces se retira el filtro y se coloca en contacto con un portaobjetos de microscopio. Entonces se fijan las células sobre el portaobjetos de microscopio antes del análisis mediante cualquiera de las técnicas comentadas a continuación.

En un experimento de hibridación de ADN tradicional que usa una muestra citológica, se sumergen portaobjetos que contienen la muestra en un tampón de formaldehído, se lavan y entonces se deshidratan en etanol. Entonces se añaden las sondas y se cubre la muestra con un cubreobjetos. El portaobjetos se incuba opcionalmente a una temperatura suficiente para desnaturalizar cualquier ácido nucleico bicatenario en la muestra (por ejemplo, 5 minutos a 82ºC) y entonces se incuba a una temperatura suficiente para permitir la hibridación (por ejemplo, durante la noche a 45ºC). Tras la hibridación, se retiran los cubreobjetos y se someten las muestras a un lavado en condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, 10 minutos a 65ºC) seguido por una serie de lavados en condiciones de baja rigurosidad (por ejemplo, 2 x 3 minutos a temperatura ambiente). Entonces se deshidratan las muestras y se montan para su análisis.

En un experimento de hibridación de ARN tradicional que usa muestras citológicas, las células se equilibran en formamida al 40%, SSC 1x y fosfato de sodio 10 mM durante 5 min, se incuban a 37ºC durante la noche en reacciones de hibridación que contienen 20 ng de sonda de oligonucleótido (por ejemplo, mezcla de oligonucleótidos de 50 pb marcados), SSC 1x, formamida al 40%, sulfato de dextrano al 10%, BSA al 0,4%, complejo de ribonucleótido-vanadilo 20 mM, ADN de testículos de salmón (10 mg/ml), ARNt de *E. coli* (10 mg/ml) y fosfato de sodio 10 mM. Entonces se lava dos veces con SSC 4x/formamida al 40% y de nuevo dos veces con SSC 2x/formamida al 40%, ambas a 37ºC, y luego con SSC 2x tres veces a temperatura ambiente. Entonces pueden detectarse por ejemplo sondas marcadas con digoxigenina usando un anticuerpo monoclonal frente a digoxigenina conjugado con Cy3. Entonces pueden detectarse por ejemplo sondas marcadas con biotina usando estreptavidina-Cy5. La detección puede ser mediante fluorescencia o CISH.

La histología implica el examen de células en cortes finos de tejido. Para preparar una muestra de tejido para el examen histológico, se fijan fragmentos del tejido en un agente de fijación adecuado, normalmente un aldehído tal como formaldehído o glutaraldehído, y entonces se incluyen en cera de parafina fundida. Entonces se corta el bloque de cera que contiene la muestra de tejido en un micrótomo para producir cortes finos de parafina que contienen el tejido, normalmente de desde 2 hasta 10 micrómetros de grosor. Entonces se aplica el corte de muestra a un portaobjetos de microscopio, se seca al aire y se calienta para hacer que la muestra se adhiera al portaobjetos de vidrio. Entonces se disuelve la parafina residual con un disolvente adecuado, normalmente xileno, tolueno u otros. Entonces se retiran estos disolventes denominados de desparafinación con un reactivo de tipo lavado-deshidratación antes del análisis de la muestra mediante cualquiera de las técnicas comentadas a continuación. Alternativamente, pueden prepararse cortes a partir de muestras congeladas, fijarse brevemente en formalina al 10% u otro agente de fijación adecuado, y luego infundirse con reactivo de deshidratación antes del análisis de la muestra.

En un experimento de hibridación de ADN tradicional que usa una muestra histológica, se cortan muestras de tejido incluidos en parafina fijados con formalina en cortes de 2-6 μm y se recogen sobre portaobjetos. La parafina se funde *(*por ejemplo, 30-60 minutos a 60ºC) y entonces se retira (se desparafina) lavando con xileno (o un sustituto de xileno), por ejemplo, 2 x 5 minutos. Las muestras vuelven a hidratarse, se lavan y entonces se pretratan (por ejemplo, 10 minutos a 95-100ºC). Se lavan los portaobjetos y luego se tratan con pepsina u otro permeabilizador adecuado, por ejemplo, 3-15 minutos a 37ºC. Se lavan los portaobjetos (por ejemplo, 2 x 3 minutos), se deshidratan y se aplica una sonda. Se cubren las muestras con un cubreobjetos y se incuba opcionalmente el portaobjetos a una temperatura suficiente para desnaturalizar cualquier ácido nucleico bicatenario en la muestra (por ejemplo 5 minutos a 82ºC), seguido por incubación a una temperatura suficiente para permitir la hibridación *(*por ejemplo, durante la noche a 45ºC). Tras la hibridación, se retiran los cubreobjetos y se someten las muestras a lavado en condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, 10 minutos a 65ºC) seguido por una serie de lavados en condiciones de baja rigurosidad (por ejemplo, 2 x 3 minutos a temperatura ambiente). Entonces se deshidratan las muestras y se montan para su análisis.

En un experimento de hibridación de ARN tradicional que usa una muestra histológica, se desparafinan portaobjetos con cortes de tejido FFPE en xileno durante 2 x 5 min, se sumergen en etanol al 99% 2 x 3 min, en etanol al 96% 2 x 3 min y luego en agua pura durante 3 min. Se colocan los portaobjetos en una cámara de humedad. Se añade proteinasa K y se incuban los portaobjetos a TA durante 5 min- 15 min. Se sumergen los portaobjetos en agua pura durante 2 x 3 min, se sumergen en etanol al 96% durante 10 s y se secan al aire durante 5 min. Se añaden sondas al corte tisular y se cubren con cubreobjetos. Se incuban los portaobjetos a 55ºC en una cámara de humedad

durante 90 min. Tras la incubación, se sumergen los portaobjetos en una disolución de lavado en condiciones de rigurosidad a 55ºC durante 25 min, y entonces se sumergen en TBS durante 10 s. Se incuban los portaobjetos en una cámara de humedad con anticuerpos durante 30 min. Se sumergen los portaobjetos en TBS durante 2 x 3 min, luego en agua pura durante 2 x 1 min, y entonces se colocan en una cámara de humedad. Entonces se incuban los portaobjetos con sustrato durante 60 min y se sumergen en agua corriente durante 5 min.

En un experimento de transferencia de tipo Northern tradicional, se desnaturaliza la muestra diana de ARN durante 10 minutos a 65ºC en tampón de carga de ARN y se coloca inmediatamente en hielo. Se cargan los geles y se someten a electroforesis con tampón MOPS 1x (MOPS 10X contiene ácido morfolinopropanosulfónico 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) a 25 V durante la noche. Entonces se preequilibra el gel en SSC 20x durante 10 min y se transfiere el ARN a una membrana de nailon usando SSC 20x estéril como tampón de transferencia. Entonces se fijan los ácidos nucleicos sobre la membrana usando, por ejemplo, reticulación por UV a 120 mJ o calentamiento en estufa durante 30 min a 120ºC. Entonces se lava la membrana en agua y se seca al aire. Se coloca la membrana en una bolsa de plástico sellable y se somete a prehibridación sin sonda durante 30 min a 68ºC. Se desnaturaliza la sonda durante 5 min a 100ºC y se coloca inmediatamente en hielo. Se añade tampón de hibridación (calentado previamente hasta 68ºC) y se hibrida la sonda a 68ºC durante la noche. Entonces se retira la membrana de la bolsa y se lava dos veces durante 5 min cada una con agitación en un tampón de lavado en condiciones de baja rigurosidad (por ejemplo, SSC 2x, SDS al 0,1%) a temperatura ambiente. Entonces se lava la membrana dos veces durante 15 min cada una en un tampón de lavado en condiciones de alta rigurosidad calentado previamente (por ejemplo, SSC 0,1x, SDS al 0,1%) a 68ºC. Entonces puede almacenarse la membrana o puede revelarse inmediatamente para la detección.

Pueden encontrarse ejemplos adicionales de técnicas de hibridación tradicionales, por ejemplo, en Sambrook *et al*., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) en las secciones 1.90-1.104, 2.108-2.117, 4.40-4.41, 7.37-7.57, 8.46-10.38, 11.7-11.8, 11.12-11.19, 11.38 y 11.45-11.57; y en Ausubel *et al*., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1998) en las secciones 2.9.1-2.9.6, 2.10.4-2.10.5, 2.10.11-2.10.16, 4.6.5-4.6.9, 4.7.2-4.7.3, 4.9.7-4.9.15, 5.9.18, 6.2-6.5, 6.3, 6.4, 6.3.3-6.4.9, 5.9.12-5.9.13, 7.0.9, 8.1.3, 14.3.1-14.3.4, 14.9, 15.0.3-15.0.4, 15.1.1-15.1.8 y 20.1.24-20.1.25.

(2) Técnicas de hibridación

Los métodos de la presente invención pueden usarse completa o parcialmente en todos los tipos de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica para muestras citológicas e histológicas. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* fluorescente (FISH; incluyendo FISH multicolor, FISH de fibra, etc.), hibridación *in situ* cromogénica (CISH), hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación genómica comparativa (CGH), sondas cromosómicas y alineamientos *in situ.* Las composiciones dadas a conocer mejorarán la eficacia de las técnicas de hibridación tradicionales, por ejemplo, eliminando la necesidad de una etapa de desnaturalización. Se describen sondas moleculares que son adecuadas para su uso en las hibridaciones de la invención por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0266459. En general, pueden prepararse sondas mediante síntesis química, PCR o amplificando una secuencia de ADN específica mediante clonación, insertando el ADN en un vector y amplificando en el vector un inserto en células huésped apropiadas. Los vectores usados comúnmente incluyen plásmidos bacterianos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales derivados del fago PI (PAC) o cromosomas artificiales derivados de levaduras (YAC). Entonces se extrae el ADN amplificado y se purifica para su uso como una sonda. Se conocen en la técnica métodos para preparar y/o sintetizar sondas, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento PCT/US02/30573.

En general, el tipo de sonda determina el tipo de característica que puede detectarse en un ensayo de hibridación. Por ejemplo, pueden usarse sondas de ADN nucleares o genómicas totales como sonda específica de especie. Las sondas cromosómicas son conjuntos de secuencias de ADN derivadas de un único tipo de cromosoma y pueden identificar a ese tipo de cromosoma específico en núcleos en metafase e interfase, contar el número de un determinado cromosoma, mostrar translocaciones o identificar fragmentos extracromosómicos de cromatina. Los diferentes tipos de cromosomas también tienen secuencias repetidas únicas que pueden seleccionarse como diana para la hibridación con sonda, para detectar y contar cromosomas específicos. Pueden usarse sondas de inserción grandes para seleccionar como diana secuencias únicas de una sola copia. Con estas sondas grandes, la eficacia de hibridación es inversamente proporcional al tamaño de la sonda. También pueden usarse sondas más pequeñas para detectar aberraciones tales como deleciones, amplificaciones, inversiones, duplicaciones y aneuploidía. Por ejemplo, pueden usarse sondas específicas de locus coloreadas de modo diferente para detectar translocaciones a través de hibridación *in situ* de señal dividida.

En general, la capacidad para discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas es inversamente proporcional a la longitud de la sonda de hibridación porque disminuye la diferencia en la estabilidad térmica entre el tipo silvestre y complejos mutantes a medida que aumenta la longitud de la sonda. Generalmente se requieren sondas de una longitud mayor de 10 pb para obtener la diversidad de secuencia necesaria para identificar correctamente un organismo único o un estado clínico de interés. Por otra parte, diferencias de secuencia tan sutiles como una única base (mutación puntual) en oligómeros muy cortos (<10 pares de bases) pueden ser suficientes para permitir la discriminación de la hibridación para secuencias diana de ácido nucleico en comparación con

secuencias no diana.

En una realización, al menos un conjunto de las sondas de hibridación *in situ* puede comprender una o más sondas de ANP, tal como se definió anteriormente y tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.105.294. Se describen métodos para sintetizar sondas de ANP en el documento PCT/US02/30573. Alternativamente, o además, al menos un conjunto de las sondas de hibridación en cualquiera de las técnicas comentadas anteriormente puede comprender una o más sondas de ácido nucleico bloqueado (ANB), tal como se describe en el documento WO99/14226. Debido a la unión en puente adicional entre carbonos en 2' y 4', la estructura principal de ANB está previamente organizada para la hibridación. Las interacciones ANB/ADN y ANB/ARN son más fuertes que las interacciones ADN/ADN y ADN/ARN correspondientes, tal como se indica por una temperatura de fusión superior. Por tanto, las composiciones y los métodos de la invención, que disminuyen la energía requerida para la hibridación, son particularmente útiles para hibridaciones con sondas de ANB.

En una realización, las sondas pueden comprender un marcador detectable (una molécula que proporciona una señal identificable analíticamente que permite la detección del híbrido sonda-diana), tal como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0266459. Las sondas pueden marcarse para hacer posible la identificación del híbrido sonda-diana mediante el uso, por ejemplo, de un microscopio/escáner de fluorescencia o campo brillante. En algunas realizaciones, la sonda puede marcarse usando marcadores radiactivos tales como ^{31}P, ^{33}P o ^{32}S, marcadores no radiactivos tales como digoxigenina y biotina o marcadores fluorescentes. El marcador detectable puede unirse directamente a una sonda o puede unirse indirectamente a una sonda, por ejemplo, mediante el uso de un ligador. Puede usarse cualquier método de marcaje conocido por los expertos en la técnica, incluyendo procedimientos enzimáticos y químicos, para marcar las sondas usadas en los métodos y las composiciones de la invención. En otras realizaciones, las sondas no se marcan.

En general, las técnicas de hibridación *in situ* tales como CGH, FISH, CISH y SISH, emplean grandes sondas de ácido nucleico, principalmente sin especificar, que se hibridan con diversas condiciones de rigurosidad con genes o fragmentos de genes en los cromosomas de las células. El uso de sondas grandes hace que la técnica de hibridación *in situ* sea más sensible. Sin embargo, el uso satisfactorio de las sondas genómicas grandes en los ensayos de hibridación tradicionales depende del bloqueo de la tinción de fondo no deseada derivada de, por ejemplo, secuencias repetitivas que están presentes por todo el genoma. Los métodos tradicionales para disminuir la unión de sonda no específica incluyen saturar los sitios de unión en proteínas y tejido mediante la incubación del tejido con disoluciones de prehibridación que contienen ficoll, albúmina sérica bovina (BSA), polivinilpirrolidona y ácidos nucleicos. Tales etapas de bloqueo llevan mucho tiempo y son caras. Ventajosamente, los métodos y las composiciones de la invención reducen y/o eliminan la necesidad de tales etapas de bloqueo, y muestran niveles de fondo reducidos significativamente sin necesidad de agentes de bloqueo y sin necesidad de hibridación durante la noche en tampones que contienen formamida. Sin embargo, en una realización, pueden suprimirse las secuencias repetitivas según los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento PCT/US02/30573.

Pueden detectarse sondas unidas en muestras citológicas e histológicas o bien directamente o bien indirectamente con fluorocromos *(*por ejemplo, FISH), cromógenos orgánicos *(*por ejemplo, CISH), partículas de plata *(*por ejemplo, SISH) u otras partículas metálicas *(*por ejemplo, hibridación *in situ* de fluorescencia facilitada por oro, GOLDFISH). Por tanto, dependiendo del método de detección, las poblaciones de células obtenidas de una muestra que va a someterse a prueba pueden visualizarse a través de microscopía de fluorescencia o microscopía óptica de campo brillante convencional.

Los ensayos de hibridación en muestras citológicas e histológicas son herramientas importantes para determinar el número, el tamaño y/o la ubicación de secuencias de ADN específicas. Por ejemplo, en la CGH, se tiñen genomas completos y se comparan con genomas de referencia normales para la detección de regiones con un número de copias aberrante. Normalmente, se marca el ADN de tejido objeto y de tejido de control normal con diferentes sondas de color. Se mezclan los conjuntos de ADN y se añaden a una extensión en metafase de cromosomas normales (o a un chip de microalineamiento, para la CGH de matriz o alineamiento). Entonces se comparan las razones de colores para identificar regiones con número de copias aberrante.

Normalmente se usa FISH cuando se requiere la obtención de imágenes de múltiples colores y/o cuando el protocolo exige la cuantificación de señales. La técnica generalmente implica preparar una muestra citológica, marcar sondas, desnaturalizar cromosomas diana y la sonda, hibridar la sonda con la secuencia diana y detectar la señal. Normalmente, la reacción de hibridación tiñe de manera fluorescente las secuencias seleccionadas como diana de modo que puede determinarse su ubicación, tamaño o número usando microscopía de fluorescencia, citometría de flujo u otra instrumentación adecuada. Pueden estudiarse secuencias de ADN que oscilan desde genomas completos hasta varias kilobases usando FISH. Con técnicas de microscopía de fluorescencia mejoradas, tales como, por ejemplo, desconvolución, puede detectarse incluso una sola molécula de ARNm. También puede usarse FISH en extensiones en metafase y núcleos en interfase.

Se ha usado FISH satisfactoriamente para mapear secuencias de ADN repetitivas y de una sola copia en cromosomas en metafase, núcleos en interfase, fibras de cromatina y moléculas de ADN desnudo, y para la identificación de cromosomas y el análisis de cariotipo a través de la localización de grandes familias repetidas,

normalmente los ADN ribosómicos y familias de alineamiento en tándem. Una de las aplicaciones más importantes para FISH ha sido en la detección de secuencias de ADN de una sola copia, en particular de genes relacionados con enfermedades en seres humanos y otras especies eucariotas modelo, y en la detección de agentes infecciosos. FISH puede usarse para detectar, por ejemplo, aneuploidía cromosómica en diagnósticos prenatales, cánceres hematológicos y tumores sólidos; anomalías génicas tales como amplificaciones de oncogenes, deleciones de genes o fusiones de genes; anomalías estructurales cromosómicas tales como translocaciones, duplicaciones, inserciones, o inversiones; síndromes de genes contiguos tales como síndrome de microdeleción; los efectos genéticos de diversas terapias; ácidos nucleicos virales en células somáticas y sitios de integración virales en cromosomas; etc. En la FISH multicolor, se tiñe cada cromosoma con un color independiente, lo que permite determinar los cromosomas normales de los que se derivan cromosomas anómalos. Tales técnicas incluyen FISH múltiple (m-FISH), cariotipado espectral (SKY), marcaje de ratio binario combinado (COBRA), cariotipado por cambio de color, bandeo de colores entre especies, bandeo multicolor de alta resolución, FISH múltiple de telómeros (TM-FISH), FISH de señal dividida (ssFISH) y FISH de señal de fusión.

Pueden usarse CISH y SISH para muchas de las mismas aplicaciones que FISH, y tienen la ventaja adicional de permitir el análisis de la morfología tisular subyacente, por ejemplo en aplicaciones de histopatología. Si se realiza FISH, la mezcla de hibridación puede contener conjuntos de pares de sondas distintos y equilibrados, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.730.474. Para CISH, la mezcla de hibridación puede contener al menos un conjunto de sondas configurado para la detección con uno o más cromógenos orgánicos convencionales, y para SISH, la mezcla de hibridación puede contener al menos un conjunto de sondas configurado para su detección con partículas de plata, tal como se describe en Powell RD *et al*., "Metallographic *in situ* hibridation", Hum. Pathol., 38:1145-59 (2007).

Las composiciones dadas a conocer en la solicitud también pueden usarse completa o parcialmente en todos los tipos de técnicas de biología molecular que implican hibridación, incluyendo transferencia y sondaje (por ejemplo, de tipo Southern, de tipo Northern, etc.), alineamientos, y técnicas de amplificación incluyendo PCR tradicional, RT-PCR, PCR para mutación, PCR asimétrica, PCR de inicio en caliente, PCR inversa, PCR múltiple, PCR anidada, PCR cuantitativa y PCR *in situ*. La PCR *in situ* es una reacción en cadena de la polimerasa que tiene lugar dentro de una célula en un portaobjetos, por ejemplo, las muestras de citología e histología descritas antes. Normalmente, tras adherir la muestra a un portaobjetos de microscopio, se rehidratan y permeabilizan las células y luego se combinan con una mezcla apropiada de reactivos de PCR incluyendo polimerasa, dNTP y cebadores. La PCR puede llevarse a cabo en un instrumento especializado, tal como el sistema GeneAmp *In situ* PCR System 1000 (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA) usando ciclos de temperatura y tiempo de desnaturalización/renaturalización/amplificación convencionales, y el producto amplificado puede detectarse usando sondas marcadas o incorporando dNTP marcados durante la amplificación. En algunas realizaciones, los métodos de la invención son útiles para aplicaciones de hibridación de ácidos nucleicos, con la condición de que tales aplicaciones no incluyan la amplificación del ácido nucleico tal como, por ejemplo, mediante PCR, PCR *in situ*, etc.

(3) Condiciones de hibridación

El método de la presente invención implica el uso de disolventes apróticos polares en la hibridación de cadenas de ácido nucleico. Las composiciones dadas a conocer en la presente solicitud son particularmente útiles para eliminar la etapa de desnaturalización en dichos métodos inventivos.

Los métodos de hibridación que usan las composiciones dadas a conocer pueden implicar aplicar las composiciones a una muestra que comprende una secuencia diana de ácido nucleico, lo más probablemente en forma bicatenaria. El disolvente aprótico polar interacciona con los ácidos nucleicos bicatenarios y facilita su desnaturalización. Por tanto, los disolventes apróticos polares eliminan la necesidad de una etapa de desnaturalización independiente en los métodos de hibridación. Como resultado, los disolventes apróticos polares especificados en la presente invención reducen la evaporación de disolventes, conservan la morfología de la muestra, reducen el fondo, simplifican los procedimientos de hibridación y hacen el procedimiento de hibridación considerablemente más fácil de automatizar.

Las hibridaciones que usan las composiciones dadas a conocer pueden realizarse usando la misma metodología de ensayo que para las hibridaciones realizadas con composiciones tradicionales. Por ejemplo, las etapas de pretratamiento térmico, digestión, hibridación, lavado y montaje pueden usar las mismas condiciones en lo que se refiere a volúmenes, temperaturas, reactivos y tiempos de incubación que para las composiciones tradicionales. Sin embargo, las composiciones dadas a conocer permiten la eliminación de la etapa de desnaturalización. Adicionalmente, las composiciones dadas a conocer permiten la reducción del tiempo de hibridación en métodos que comprenden sondas de hibridación más largas o fragmentos de sondas de hibridación, por ejemplo, sondas de hibridación o fragmentos de sondas de hibridación que comprenden de 40 a 500 nucleótidos, sondas de hibridación o fragmentos de sondas de hibridación que comprenden de 50 a 500 nucleótidos, o sondas de hibridación o fragmentos de sondas de hibridación que comprenden de 50 a 200 nucleótidos. Existe una gran variación en los protocolos de hibridación tradicionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, algunos protocolos especifican una etapa de desnaturalización independiente de nucleótidos bicatenarios potenciales sin sonda presente, antes de la siguiente etapa de hibridación, mientras que otros protocolos desnaturalizarán la sonda y la muestra juntas. Las composiciones dadas a conocer pueden usarse en cualquiera de los protocolos de hibridación tradicionales

conocidos en la técnica.

Alternativamente, los ensayos que usan las composiciones dadas a conocer pueden cambiarse y optimizarse a partir de metodologías tradicionales, por ejemplo, disminuyendo el tiempo de hibridación, disminuyendo las temperaturas de hibridación y/o disminuyendo los volúmenes de hibridación.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones dadas a conocer producirán señales fuertes cuando la temperatura de desnaturalización es de desde 60ºC hasta 100ºC y la temperatura de hibridación es de desde 20ºC hasta 60ºC. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer producirán señales fuertes cuando la temperatura de desnaturalización es de desde 60ºC hasta 65ºC, desde 65ºC hasta 70ºC, desde 70ºC hasta 75ºC, desde 75ºC hasta 80ºC o desde 80ºC hasta 85ºC, y la temperatura de hibridación es de desde 20ºC hasta 30ºC, desde 30ºC hasta 40ºC, desde 40ºC hasta 50ºC o desde 50ºC hasta 60ºC. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer producirán señales fuertes cuando la temperatura de desnaturalización es de 62ºC, 67ºC, 72ºC u 82ºC, y la temperatura de hibridación es de 37ºC, 40ºC, 45ºC, 50ºC o 55ºC.

En determinadas divulgaciones, las composiciones dadas a conocer en la solicitud producirán señales fuertes cuando el tiempo de desnaturalización es de desde 0 hasta 15 minutos y el tiempo de hibridación es de desde 0 minutos hasta 24 horas. En otras divulgaciones, las composiciones producirán señales fuertes cuando el tiempo de desnaturalización es de desde 0 hasta 10 minutos y el tiempo de hibridación es de desde 0 minutos hasta 8 horas. En otras divulgaciones, las composiciones producirán señales fuertes cuando el tiempo de desnaturalización es de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 minutos, y el tiempo de hibridación es de 0 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 180 minutos o 240 minutos. Los expertos en la técnica entenderán que en algunos casos, por ejemplo, detección de ARN, no se requiere una etapa de desnaturalización con tampones tradicionales. Se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones dadas a conocer también eliminan la necesidad de una etapa de desnaturalización y/o reducen la temperatura requerida para la desnaturalización de otros tipos de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ADN. Por tanto, en una realización, el tiempo de desnaturalización es de 0 minutos, es decir, se elimina completamente la etapa de desnaturalización requerida con tampones de la técnica anterior.

Por consiguiente, pueden realizarse hibridaciones usando las composiciones dadas a conocer en menos de 8 horas. En otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en menos de 6 horas. Todavía en otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 4 horas. En otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 3 horas. Aún en otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 2 horas. En otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 1 hora. Todavía en otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 30 minutos. En otras realizaciones, la etapa de hibridación puede tener lugar en el plazo de 15 minutos. La etapa de hibridación puede tener lugar incluso en el plazo de 10 minutos o en menos de 5 minutos. Las figuras 1 y 2 ilustran un transcurso de tiempo típico para aplicaciones de hibridación realizadas en muestras histológicas y citológicas, respectivamente, que usan las composiciones de la invención en comparación con aplicaciones de hibridación que usan composiciones tradicionales.

Además, las composiciones dadas a conocer permiten hibridaciones rápidas usando sondas o fragmentos de sondas más largos, por ejemplo, sondas o fragmentos de sondas que comprenden 40-500 nucleótidos, sondas o fragmentos de sondas que comprenden 50-500 nucleótidos, o sondas o fragmentos de sondas que comprenden 50-200 nucleótidos. En algunas realizaciones, pueden realizarse hibridaciones en menos de 8 horas. En otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en menos de 6 horas. Todavía en otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 4 horas. En otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 3 horas. Aún en otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 2 horas. En otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 1 hora. Todavía en otras realizaciones, la etapa de hibridación se realiza en el plazo de 30 minutos. En otras realizaciones, la etapa de hibridación puede tener lugar en el plazo de 15 minutos. La etapa de hibridación puede tener lugar incluso en el plazo de 10 minutos o en menos de 5 minutos.

A medida que cambia el tiempo de hibridación, también puede variarse la concentración de sonda con el fin de producir señales fuertes y/o reducir el fondo. Por ejemplo, a medida que disminuye el tiempo de hibridación, puede aumentarse la cantidad de sonda con el fin de mejorar la intensidad de señal. Por otra parte, a medida que disminuye el tiempo de hibridación, puede disminuirse la cantidad de sonda con el fin de mejorar la tinción de fondo.

Las composiciones dadas a conocer también eliminan la necesidad de una etapa de bloqueo durante aplicaciones de hibridación mejorando la señal y la intensidad de fondo mediante el bloqueo de, por ejemplo, secuencias repetitivas para el ADN diana. Por tanto, no hay necesidad de usar ADN humano total, ANP de bloqueo, ADN de COT-1 o ADN de cualquier otra fuente como agente de bloqueo. Además, los métodos de la invención y las composiciones dadas a conocer muestran sorprendentemente niveles de fondo reducidos significativamente sin necesidad de hibridación durante la noche en tampones que contienen formamida. Sin embargo, los niveles de fondo pueden reducirse adicionalmente añadiendo agentes que reducen la unión no específica, tal como a la membrana celular, tal como pequeñas cantidades de ADN humano total o ADN de origen no humano *(*por ejemplo, ADN de esperma de salmón) a una reacción de hibridación usando las composiciones de la invención.

Las composiciones acuosas dadas a conocer en la solicitud proporcionan además la posibilidad para reducir considerablemente la concentración de secuencias de ácido nucleico incluidas en la composición. Generalmente, la

concentración de sondas puede reducirse desde 2 hasta 8 veces en comparación con concentraciones tradicionales. Por ejemplo, si se usan sondas de ADN de HER2 y sondas de ANP de CEN 17 en las composiciones de la invención, sus concentraciones pueden reducirse en ¼ y ½, respectivamente, en comparación con sus concentraciones en las composiciones de hibridación tradicionales. Esta característica, junto con la ausencia de cualquier necesidad de ADN de bloqueo, tal como COT1 o ANP de bloqueo, permite un volumen de sonda aumentado en sistemas de instrumento automatizado en comparación con el volumen de 10 μl tradicional usado en los sistemas de composiciones tradicionales, lo que reduce la pérdida debida a evaporación, tal como se comenta en más detalle a continuación.

La reducción de la concentración de sonda también reduce el fondo. Sin embargo, la reducción de la concentración de sonda está inversamente relacionada con el tiempo de hibridación, es decir, cuanto menor es la concentración, mayor es el tiempo de hibridación requerido. No obstante, aunque se usan concentraciones extremadamente bajas de sonda con las composiciones acuosas de la invención, el tiempo de hibridación es todavía más corto que con las composiciones tradicionales.

Las composiciones dadas a conocer a menudo permiten mejores relaciones señal-ruido que las composiciones de hibridación tradicionales. Por ejemplo, con determinadas sondas, una hibridación de una hora con las composiciones de la invención producirá un fondo similar y señales más fuertes que una hibridación durante la noche en las composiciones tradicionales. No se observan fondos cuando no se añade sonda.

También pueden cambiarse y optimizarse los métodos de ensayo tradicionales cuando se usan las composiciones dadas a conocer dependiendo de si el sistema es manual, semiautomatizado o automatizado. Por ejemplo, un sistema semiautomatizado o uno completamente automatizado se beneficiará de la eliminación de una etapa de desnaturalización que es posible con las composiciones de la invención. Estos cambios con respecto a los métodos de hibridación tradicionales pueden reducir las dificultades encontradas cuando se usan las composiciones tradicionales en tales sistemas. Por ejemplo, un problema con los sistemas semiautomatizados y completamente automatizados es que puede producirse evaporación significativa de la muestra durante la hibridación, puesto que tales sistemas requieren pequeños volúmenes de muestra (por ejemplo, 10-150 μl), temperaturas de desnaturalización elevadas, y tiempos de hibridación prolongados (por ejemplo, 14 horas). Por tanto, son bastante invariables las proporciones de los componentes en las composiciones de hibridación tradicionales. Sin embargo, puesto que las composiciones dadas a conocer permiten la eliminación de una etapa de desnaturalización, se reduce la evaporación, permitiendo la flexibilidad aumentada en las proporciones de los componentes en las composiciones de hibridación usadas en sistemas semiautomatizados y completamente automatizados.

Por ejemplo, se han usado dos instrumentos automatizados para realizar hibridaciones usando las composiciones dadas a conocer en aplicaciones de hibridación que tienen una etapa de desnaturalización tradicional. Se han usado composiciones que comprenden carbonato de etileno al 40% (v/v) en el aparato dado a conocer en la solicitud PCT DK2008/000430, y se han usado composiciones que comprenden carbonato de etileno al 15% (v/v) en el instrumento HYBRIMASTER HS-300 (Aloka CO. LTD, Japón). Cuando las composiciones de la invención se usan en el instrumento HYBRIMASTER HS-300, el instrumento puede realizar una hibridación FISH rápida con agua en lugar de la mezcla de formamida tóxica tradicional, mejorando así la seguridad y reduciendo la evaporación. Si se adhieren tiras humedecidas con agua a la tapa en la parte interior de la unidad de reacción del instrumento de Aloka (cámara de hibridación), por ejemplo, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/031.514, la evaporación se reduce incluso más.

Otros problemas con el análisis de obtención de imágenes automatizado son el número de imágenes necesarias, la enorme cantidad de sitio de almacenamiento requerido y el tiempo requerido para tomar las imágenes. Las composiciones de la invención abordan este problema produciendo señales muy fuertes en comparación con las composiciones tradicionales. Debido a las señales muy fuertes producidas por las composiciones dadas a conocer, la obtención de imágenes puede realizarse a menor ampliación que la requerida para las composiciones tradicionales y todavía puede detectarse y analizarse, por ejemplo, mediante algoritmos. Puesto que el plano focal se vuelve más amplio con menor ampliación, las composiciones de la invención reducen o eliminan la necesidad de realizar cortes en serie de una muestra. Como resultado, la obtención de imágenes global es mucho más rápida, puesto que las composiciones dadas a conocer requieren menos cortes o no requiere cortes en serie y cada imagen cubre un área mucho mayor. Además, el tiempo global para el análisis es más rápido, puesto que los archivos de imágenes totales son mucho más pequeños.

Por tanto, los métodos de la invención resuelven muchos de los problemas asociados con las composiciones y los métodos de hibridación tradicionales.

La divulgación puede entenderse más claramente con la ayuda de los ejemplos no limitativos que siguen, que constituyen realizaciones preferidas de las composiciones según la divulgación. Aparte de en los ejemplos, o donde se indique de otra manera, ha de entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, etc., usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente.” Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que busca obtenerse en el presente documento. Como

mínimo, y sin intentar limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y enfoques de redondeo ordinarios.

Pese a que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el amplio alcance son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en el ejemplo específico se notifican de la manera más precisa posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene de manera inherente determinados errores necesarios que resultan de la desviación estándar encontrada en sus mediciones de prueba respectivas. Los ejemplos que siguen ilustran la presente invención.

Ejemplos

Ahora se hará referencia en detalle a realizaciones específicas de la invención. Aunque la invención se describirá conjuntamente con estas realizaciones, se entenderá que no se pretende limitar la invención a esas realizaciones. Al contrario, se pretende que la invención cubra alternativas, modificaciones y equivalentes que pueden incluirse dentro de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Los reactivos usados en los siguientes ejemplos son del kit Histology FISH Accessory (K5599) y el kit Cytology FISH Accessory (K5499) de Dako (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca). Los kits contienen todos los reactivos clave, excepto la sonda, requeridos para completar un procedimiento de FISH para muestras de corte tisular incluidas en parafina, fijadas con formalina. Todas las muestras se prepararon según la descripción del fabricante. Se usó el dispositivo de hibridación de Dako (S2451, Dako) para las etapas de digestión, desnaturalización e hibridación.

Se realizó la evaluación de portaobjetos de FISH en el plazo de una semana tras la hibridación usando un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B, equipado con filtros individuales de DAPI, FITC, rojo Texas y filtros dobles de FITC/rojo Texas con un objetivo con aceite 10x, 20x, 40x y 100x.

Se realizó la evaluación de portaobjetos de CISH usando un microscopio óptico Olympus BX51 con un objetivo 4x, 10x, 20x, 40x y 60x.

En los ejemplos que siguen, “sulfato de dextrano” se refiere a la sal de sodio de sulfato de dextrano (D8906, Sigma) que tiene un peso molecular Mw > 500.000. Todas las concentraciones de disolventes apróticos polares se facilitan como porcentajes en v/v. Tampón fosfato se refiere a una disolución tamponada con fosfato que contiene NaH_2PO_4, $2H_2O$ (fosfato de sodio dibásico dihidratado) y Na_2HPO_4, H_2O (fosfato de sodio monobásico monohidratado). Tampón citrato se refiere a una disolución tamponada con citrato que contiene citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7$, $2H_2O$; 1.06448, Merck) y ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7$, H_2O; 1.00244, Merck).

Procedimiento de FISH/CISH de histología general para los ejemplos 1-20

Se calentaron en estufa los portaobjetos con cortes de alineamiento tisular múltiple incluidos en parafina fijados con formalina (FFPE) cortados de seres humanos (amígdalas, carcinoma de mama, riñón y colon) a 60ºC durante 30-60 min, se desparafinaron en baños de xileno, se rehidrataron en baños de etanol y luego se transfirieron a tampón de lavado. Entonces se pretrataron las muestras en disolución de pretratamiento a un mínimo de 95ºC durante 10 min y se lavaron 2 x 3 min. Entonces se digirieron las muestras con pepsina RTU a 37ºC durante 3 min, se lavaron 2 x 3 min, se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Entonces se incubaron las muestras con 10 µl de sonda de FISH tal como se describe en los experimentos individuales. Entonces se lavaron las muestras mediante lavado en condiciones de rigurosidad a 65ºC 10 min, luego se lavaron 2 x 3 min, luego se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Finalmente, se montaron los portaobjetos con 15 µl de medio de montaje Antifade. Cuando se completó la tinción, observadores capacitados para evaluar la intensidad de señal, la morfología y el fondo de los portaobjetos teñidos realizaron la puntuación.

Procedimiento de FISH de citología general para los ejemplos 21-22

Se fijaron portaobjetos con preparaciones en metafase en formaldehído al 3,7% durante 2 min, se lavaron 2 x 5 min, se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Entonces se incubaron las muestras con 10 µl de sonda de FISH tal como se describe en los experimentos individuales. Entonces se lavaron las muestras mediante lavado en condiciones rigurosas a 65ºC 10 min, luego se lavaron 2 x 3 min, luego se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Finalmente, se montaron los portaobjetos con 15 µl de medio de montaje Antifade. Cuando se completó la tinción, observadores capacitados para evaluar la intensidad de señal y el fondo de los portaobjetos teñidos realizaron la puntuación tal como se describe en las directrices de puntuación para cortes tisulares.

Procedimiento de FISH/CISH de histología general para los ejemplos 23-29 y 31-32

Se calentaron en estufa portaobjetos con cortes de alineamiento tisular múltiple incluidos en parafina fijados con formalina (FFPE) cortados de seres humanos (amígdalas, carcinoma de mama, riñón y colon) a 60ºC durante 30-60 min, se desparafinaron en baños de xileno, se rehidrataron en baños de etanol y luego se transfirieron a tampón de lavado. Entonces se pretrataron las muestras en disolución de pretratamiento a un mínimo de 95ºC durante 10 min y

se lavaron 2 x 3 min. Entonces se digirieron las muestras con pepsina RTU a 37ºC durante 3 min, se lavaron 2 x 3 min, se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Entonces se incubaron las muestras con 10 µl de sonda de FISH tal como se describe en los experimentos individuales. Entonces se lavaron las muestras con tampón de lavado en condiciones de rigurosidad a 65ºC 10 min, luego se lavaron en tampón de lavado durante 2 x 3 min, luego se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Finalmente, se montaron los portaobjetos con 15 µl de medio de montaje Antifade. Cuando se completó la tinción, observadores capacitados para evaluar la intensidad de señal, la morfología y el fondo de los portaobjetos teñidos realizaron la puntuación.

Procedimiento de FISH de citología general para el ejemplo 30

Se fijaron portaobjetos con preparaciones en metafase en formaldehído al 3,7% durante 2 min, se lavaron 2 x 5 min. Para el ejemplo 32, se digirieron algunas de las muestras con pepsina (vial 2, K5599, Dako) a 37ºC durante 2 min y se lavaron 2 x 5 min. Se deshidrataron todas las muestras en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Entonces se incubaron las muestras con 10 µl de sonda de FISH tal como se describe en los experimentos individuales. Entonces se lavaron las muestras en tampón de lavado en condiciones de rigurosidad a 65ºC 10 min, luego se lavaron en tampón de lavado 2 x 3 min, luego se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Finalmente, se montaron los portaobjetos con 15 µl de medio de montaje Antifade. Cuando se completó la tinción, observadores capacitados para evaluar la intensidad de señal y el fondo de los portaobjetos teñidos realizaron la puntuación tal como se describe en las directrices de puntuación para cortes tisulares.

Directrices de puntuación para cortes tisulares

Se evaluaron las intensidades de señal en una escala de 0-3 significando 0 ausencia de señal y equivaliendo 3 a una señal fuerte. Se evaluaron las estructuras celulares/tisulares en una escala de 0-3 significando 0 sin estructura y sin límites de núcleos y equivaliendo 3 a estructura intacta y límites de núcleos claros. Entre 0 y 3 hay grados adicionales de 0,5 a partir de los cuales el observador puede evaluar la intensidad de señal, la estructura tisular y el fondo.

La intensidad de señal se puntúa a partir de un sistema graduado en una escala de 0-3.

0 No se observa señal.

1 La intensidad de señal es débil.

2 La intensidad de señal es moderada.

3 La intensidad de señal es fuerte.

El sistema de puntuación permite el uso de ½ grados.

La estructura tisular y nuclear se puntúa a partir de un sistema graduado en una escala de 0-3.

0 Las estructuras tisulares y los límites nucleares están completamente destruidos.

1 Las estructuras tisulares y/o los límites nucleares son escasos. Este grado incluye situaciones en las que algunas zonas tienen núcleos vacíos.

2 Se observan estructuras tisulares y/o límites nucleares, pero los límites nucleares no están claros. Este grado incluye situaciones donde algunos núcleos están vacíos.

3 Las estructuras tisulares y los límites nucleares están intactos y son claros.

El sistema de puntuación permite el uso de ½ grados.

El fondo se puntúa a partir de un sistema graduado en una escala de 0-3.

0 Se observa poco o ningún fondo.

1 Algo de fondo.

2 Fondo moderado.

3 Alto fondo.

El sistema de puntuación permite el uso de ½ grados.

Ejemplo 1

Este ejemplo compara la intensidad de señal y la morfología celular de muestras tratadas con las composiciones

dadas a conocer o disoluciones de hibridación tradicionales en función de la temperatura de desnaturalización.

Composición I de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, formamida al 40% (15515-026, Invitrogen), ANP de bloqueo 5 µM (véase Kirsten Vang Nielsen *et al.*, PNA Suppression Method Combined with Fluorescence *In situ* Hybridisation (FISH) Technique inPRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation, capítulo 10 (ed. Franck Pellestor) (Nova Science Publishers, Inc. 2006)), sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (RP11-1143E20, tamaño 192 kb).

Composición II de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40% (03519, Fluka), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (RP11-1143E20, tamaño 192 kb).

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Se desnaturalizaron las sondas de FISH tal como se indica durante 5 min y se hibridaron a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Señal		Morfología celular	
	(I) Formamida	(II) EC	Formamida	EC
72ºC	0	2	Buena	Buena
82ºC	½	3	Buena	Buena
92ºC	½	3	No buena	No buena

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20.

Ejemplo 2

Este ejemplo compara la intensidad de señal y la tinción de fondo de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer o disoluciones de hibridación tradicionales en función del tiempo de hibridación.

Composición I de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, formamida al 40%, ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición II de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40%, ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 14 horas, 4 horas, 2 horas, 60 minutos, 30 minutos, 15 minutos, 0 minutos.

Resultados:

Tiempo de hibridación	Señal		Tinción de fondo	
	(I) Formamida	(II) EC	Formamida	EC
14 horas	3	3	+½	+2
4 horas	1	3	+½	+1
2 horas	½	3	+0	+1
60 min.	½	3	+0	+1
30 min.	0	2 ½	+0	+1
15 min.	0	2	+0	+1
0 min.	0	1	+0	+½

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20.

Ejemplo 3

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer que tienen diferentes disolventes apróticos polares o disoluciones de hibridación tradicionales.

Composición I de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, formamida al 40%, ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición II de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40% (EC), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición III de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de propileno al 40% (PC) (540013, Aldrich), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición IV de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, sulfolano al 40% (SL) (T22209, Aldrich), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición V de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, acetato de nitrilo al 40% (AN) (C02CIIX, Lab-Scan), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición VI de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, γ-butirolactona al 40% (GBL) (B103608. Aldrich), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 7,5 ng/µl.

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

Señal					
(I) Formamida	(II) EC	(III) PC	(IV) SL	(V) AN	(VI) GBL
½	3	3	3	2	3

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20.

Ejemplo 4

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer que tienen diferentes concentraciones de disolvente aprótico polar.

Composiciones de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 10-60% (tal como se indica), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de gen de ADN constante para IGK marcada con rojo Texas 7,5 ng/µl ((CTD- 3050E15, RP11-1083E8; tamaño 227 kb) y sonda de ADN de gen variable para IGK marcada con FITC 7,5 ng/µl (CTD-2575M21, RP11-122B6, RP11-316G9; tamaño 350 y 429 kb).

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

		Carbonato de etileno (EC)				
		10%	20%	30%	40%	60%
Intensidad de señal	rojo Texas	1 ½	2	3	3	2
	FITC	1	1 ½	2	2 ½	2

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20

Ejemplo 5

Este ejemplo compara la intensidad de señal y la intensidad de fondo de muestras tratadas con las composiciones con y sin bloqueo de ANP.

Composiciones de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40%, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 7,5 ng/µl.

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

	Carbonato de etileno (EC)	
	Bloqueo de ANP	Sin bloqueo de ANP
Intensidad de señal	3	3
Intensidad de fondo	½ +	½ +

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20

Ejemplo 6

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer en función de la concentración de la sonda y el tiempo de hibridación.

Composiciones de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de

etileno al 40%, y sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10, 7,5, 5 o 2,5 ng/µl (tal como se indica).

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 3 horas, 2 horas y 1 hora.

Resultados:

Tiempo de hibridación	Intensidad de señal			
	(I) 10 ng/µl	(II) 7,5ng/µl	(III) 5 ng/µl	(IV) 2,5 ng/µl
3 horas	3	3	3	3
2 horas	3	3	3	1
1 hora	3	3	3	½

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20

Ejemplo 7

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer en función de las concentraciones de tampón, fosfato y sal.

Composiciones de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, ([NaCl], [tampón fosfato], [tampón TRIS] tal como se indica en los resultados), carbonato de etileno al 40%, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 7,5 ng/µl.

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

	[NaCl]		
	300 mM	100 mM	0 mM
Intensidad de señal fosfato [0 mM]	2	1	½
Intensidad de señal fosfato [5 mM]	3	2½	½
Intensidad de señal fosfato [35 mM]	-	-	3
Intensidad de señal TRIS [40 mM]	-	-	2

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20.

Ejemplo 8

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer en función de la concentración de sulfato de dextrano.

Composiciones de sonda de FISH: 0, 1, 2, 5, o sulfato de dextrano al 10% (tal como se indica), NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40%, sonda de ADN de gen SIL-TAL1 marcada con rojo Texas 5 ng/µl (RP1-278O13; tamaño 67 kb) y FITC SIL-TAL1 6 ng/µl (ICRFc112-112C1794, RP11-184J23, RP11-8J9, CTD-2007B18, 133B9; tamaño 560 kb).

Se mezclaron, si estaban presentes, fases de diferente viscosidad antes de su uso. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

% de sulfato de dextrano	Intensidad de señal	
	Sonda de rojo Texas	Sonda de FITC
0%	1	1
1%	1	1
2%	1½	1½
5%	2	2½
10%	2	2½

NOTA: este experimento no produjo resultados que puntuaron como "3" porque la sonda marcada con rojo Texas de SIL-TAL1 es de solamente 67 kb y fue a partir de una preparación no optimizada.

Ejemplo 9

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer en función de las concentraciones disolvente aprótico polar, fosfato, sal y sulfato de dextrano.

Composición Ia de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 34%, NaCl 0 mM, tampón fosfato 0 mM, carbonato de etileno al 0%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición Ib de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 34%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 0%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición Ic de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 34%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, carbonato de etileno al 0%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IIa de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 32%, NaCl 0 mM, tampón fosfato 0 mM, carbonato de etileno al 5%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IIb de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 32%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 5%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IIc de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 32%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, carbonato de etileno al 5%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IIIa de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 30%, NaCl 0 mM, tampón fosfato 0 mM, carbonato de etileno al 10%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IIIb de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 30%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 10%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IIIc de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 30%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, carbonato de etileno al 10%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IVa de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 28%, NaCl 0 mM, tampón fosfato 0 mM, carbonato de etileno al 15%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IVb de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 28%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 15%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Composición IVc de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 28%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, carbonato de etileno al 15%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl (tamaño 218 kb) y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM.

Referencia V de sonda de FISH: vial de venta convencional de mezcla de sondas PharmDx de HER2 (K5331, Dako) que contiene ANP de bloqueo. Hibridación durante la noche durante 20 horas.

Todas las composiciones estuvieron presentes como fase única. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos sin bloqueo, excepto para la referencia V de sonda de FISH, que tenía bloqueo de ANP y se hibridó durante 20 horas.

Resultados:

	Intensidad de señal	
	Sondas de ADN	Sondas de ANP
Composición Ia	0	½
Composición Ib	0	½
Composición Ic	½	2 ½
Composición IIa	½	3
Composición IIb	1	2
Composición IIc	½	3

Composición IIIa	1	2 ½
Composición IIIb	1 ½	2 ½
Composición IIIc	2	3
Composición IVa	2 ½ - 3	3
Composición IVb	3	3
Composición IVc	3	3
Referencia V	2	2 ½

NOTA: La composición IVa produjo fuertes señales de ADN sin sal. Esto no es posible con composiciones de FISH convencionales, donde la unión al ADN es dependiente de la sal.

Ejemplo 10

Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer en función de la concentración de sulfato de dextrano y disolvente aprótico polar en condiciones altas de sal (normal x4).

Composición I de sonda de FISH: carbonato de etileno al 0%, sulfato de dextrano al 29%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM. La composición fue una única fase.

Composición II de sonda de FISH: carbonato de etileno al 5%, sulfato de dextrano al 27%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM. La composición fue una única fase.

Composición III de sonda de FISH: carbonato de etileno al 10%, sulfato de dextrano al 25%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM. La composición fue una única fase.

Composición IV de sonda de FISH (no sometida a prueba): carbonato de etileno al 20%, sulfato de dextrano al 21%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 10 ng/µl y sonda de ANP de CEN-7 marcada con FITC 50 nM. La composición tuvo dos fases.

Resultados:

	Intensidad de señal	
	Sondas de ADN	Sondas de ANP
Composición I	½	3
Composición II	2	2 ½
Composición III	3	3
Composición IV	-	-

Nota: La composición II produjo buenas señales de ADN con solamente EC al 5% y fuertes señales de ADN con EC al 10%.

Ejemplo 11

Este ejemplo compara la intensidad de señal y de fondo de muestras tratadas con diferentes fases de las composiciones dadas a conocer.

Composición de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40%, sonda de ADN de gen HER2 marcada con rojo Texas 8 ng/µl y sonda de ANP de CEN-17 marcada con FITC 600 nM. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

	Intensidad de señal		
	Sonda de ADN	Sonda de ANP	Fondo
Fase superior	3	1 ½	+2
Fase inferior	3	2 ½	+1
Mezcla de las fases superior e inferior	2 ½	3	+½

NOTA: la fase superior tuvo más fondo que la fase inferior en estos experimentos.

Ejemplo 12

Este ejemplo es similar al ejemplo previo, pero usa una sonda diferente de ADN y GBL en lugar de EC.

Composición de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, GBL al 40%,

sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl y sonda de ANP de CEN-17 marcada con FITC 600 nM.

Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

	Intensidad de señal		Fondo
	Sonda de ADN	Sonda de ANP	
Fase de arriba	3	0 - ½	+1 ½
Fase de abajo	2	½	+3
Fases mezcladas	2 ½	½	+2 ½

Ejemplo 13

Este ejemplo examina el número de fases en las composiciones dadas a conocer en función de la concentración de sulfato de dextrano y disolvente aprótico polar.

Composiciones de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10 o al 20%; NaCl 300 mM; tampón fosfato 5 mM; EC al 0, al 5, al 10, al 15, al 20, al 25, al 30%; sonda 10 ng/µl.

Resultados:

% de EC	Número de fases dextrano al 10%	Número de fases dextrano al 20%
0	1	1
5	1	1
10	1	1
15	1	1
20	2	2
25	2	2
30	2	2

NOTA: EC al 15%, sulfato de dextrano al 20% producen las mejores intensidades de señal altas de la disolución de una fase anterior. EC al 20% de dos fases tiene incluso densidades de señal más altas que al 15%. (Datos no mostrados).

Ejemplo 14

Este ejemplo compara la intensidad de señal y de fondo de muestras tratadas con diferentes composiciones dadas a conocer en función de la concentración de la sonda y el tiempo de hibridación.

Composición I de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con RojoTx de HER2 10 ng/µl (concentración convencional) y concentración convencional de sonda de ANP marcada con FITC de CEN7 (50 nM); EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM.

Composición II de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con RojoTx de HER2 5 ng/µl (½ de la concentración convencional) y concentración convencional (50 nM) de sondas de ANP de CEN7 marcadas con FITC; EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM.

Composición III de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con RojoTx de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (25 nM) de sondas de ANP de CEN7; EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM.

Las composiciones I-III existieron como única fase. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 3 horas, 2 horas y 1 hora.

Resultados:

Tiempo de hibridación	Intensidad de señal								
	I			II			III		
	ADN	ANP	B.G.	ADN	ANP	B.G.	ADN	ANP	B.G.
3 horas	3	3	+3	3	3	+2,5	3	3	+1,5
2 horas	2,5	2,5	+3	3	3	+3	3	3	+1,5
1 hora	2,5	2,5	+3	3	3	+1,5	2,5	3	+1

Las señales que puntuaron como "3" fueron claramente visibles en un objetivo x20.

Ejemplo 15

Este ejemplo compara la intensidad de señal y de bloqueo de muestras tratadas con las composiciones dadas a conocer en función del agente de bloqueo.

Composiciones de sonda de FISH: EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM; sonda de ADN marcada con RojoTx de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) sonda de ANP de CEN 17 marcada con FITC. Se bloquearon las muestras con: (a) nada; (b) COT1 0,1 mg/µl (15279-011, Invitrogen); (c) COT1 0,3 mg/µl; o (d) ADN humano total 0,1 mg/µl antes de la hibridación usando las composiciones de la invención.

Todas las muestras estuvieron presentes como única fase. Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

Agente de bloqueo	Fondo	Intensidad de señal	
		ADN	ANP
Nada	+1-1,5	3	2,5
COT1 0,1 mg/µl	+1	3	2,5
COT1 0,3 mg/µl	+1,5	3	2,5
ADN humano total 0,1 mg/µl	+½	3	2,5

NOTA: Los niveles de fondo sin bloqueo son significativamente inferiores que los que se observan normalmente mediante FISH convencional sin bloqueo. En cambio, si una composición de FISH convencional no contiene un agente de bloqueo, las señales no pueden leerse normalmente.

Ejemplo 16

Este experimento compara diferentes formas de retirar la tinción de fondo usando las composiciones dadas a conocer.

Todas las composiciones contenían EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, sondas de ADN de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional), sonda de ANP de CEN 17 300 nM (1/2 de la concentración convencional), y uno de los siguientes agentes reductores de fondo:

A) ANP de bloqueo 5 µM (véase Kirsten Vang Nielsen *et al.*, PNA Suppression Method Combined with Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) Technique inPRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation, capítulo 10 (ed. Franck Pellestor) (Nova Science Publishers, Inc. 2006))

B) ADN de COT-1 0,1 µg/µl

C) ADN humano total 0,1 µg/µl (THD) (THD sin marcar sonicado)

D) ADN de esperma de salmón sometido a cizalladura 0,1 µg/µl (AM9680, Ambion)

E) ADN de timo de ternero 0,1 µg/µl (D8661, Sigma)

F) ADN de esperma de arenque 0,1 µg/µl (D7290, Sigma)

G) formamida al 0,5%

H) formamida al 2%

I) etilenglicol al 1% (1,09621, Merck)

J) glicerol al 1% (1,04095, Merck) *B.G.: Back ground.*

K) 1,3-Propanodiol al 1%(533734, Aldrich)

L) H_2O al 1%(control)

Todas las muestras estuvieron presentes como única fase. Las sondas se incubaron a 82ºC durante 5 minutos y luego a 45ºC en cortes tisulares FFPE durante 60 y 120 minutos.

Resultados:

Bloqueo de fondo	Hibridación/min	Fondo	Intensidad de señal	
			ADN	ANP
ANP de bloqueo	60	+1	3	2,5
ANP de bloqueo	120	+1-1 ½	3	2,5
COT-1	60	+½	3	2,5

COT-1	120	+0-½	3	2,5
THD	60	+0	3	3
THD	120	+½	3	2,5
Esperma de ADN de salmón	60	+0	3	3
Esperma de ADN de salmón	120	+0	3	3
ADN de timo de ternero	60	+0	2,5	3
ADN de timo de ternero	120	+½	3	2,5
ADN de esperma de arenque	60	+0	3	3
ADN de esperma de arenque	120	+½	2,5	3
Formamida al 0,5%	60	+0	2,5	3
Formamida al 0,5%	120	+0	3	3
Formamida al 2%	60	+½	2,5	3
Formamida al 2%	120	+½	3	3
Etilenglicol al 1%	60	+½	2,5	3
Etilenglicol al 1%	120	+1 ½	3	2,5
Glicerol al 1%	60	+½	0,5	3
Glicerol al 1%	120	+1	3	2,5
1,3-Propanodiol al 1%	60	+0	3	2,5
1,3-Propanodiol al 1%	120	+1	3	2,5
Nada	60	+1	2,5	2,5
Nada	120	+1 ½	3	2,5

NOTA: todos los reactivos reductores de fondo, excepto ANP de bloqueo, mostraron un efecto en la reducción de fondo. Por tanto, no se requiere bloqueo específico frente a secuencias de ADN repetitivas.

Ejemplo 17

Este experimento compara la intensidad de señal de las fases superior e inferior usando dos disolventes apróticos polares diferentes.

Composición I de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, tritiocarbonato de etileno al 40% (ET) (E27750, Aldrich), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Composición II de sonda de FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, sulfito de glicol al 40% (GS) (G7208, Aldrich), ANP de bloqueo 5 µM, sonda de ADN de gen CCND1 marcada con rojo Texas 10 ng/µl.

Las sondas de FISH se incubaron a 82ºC durante 5 min y luego a 45ºC durante 60 minutos.

Resultados:

	Intensidad de señal	
	I (ET)	II (GS)
Fase superior 1	½	0
Fase inferior	0	3
Mezcla de las fases superior e inferior	2 ½	3

Ejemplo 18.

Este experimento examina la capacidad de diversos disolventes apróticos polares para formar un sistema de una fase.

Todas las composiciones contenían: sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, y o bien el 10, el 15, el 20 o bien el 25% de uno de los siguientes disolventes apróticos polares:

Sulfolano

γ-Butirolactona

Tritiocarbonato de etileno

Sulfito de glicol

Carbonato de propileno

Resultados: todos los disolventes apróticos polares a todas las concentraciones examinadas produjeron al menos un sistema de dos fases en las composiciones usadas. Sin embargo, esto no excluye que estos compuestos puedan producir un sistema de una fase en otras condiciones de composición.

Ejemplo 19

Este experimento examina el uso de las composiciones dadas a conocer en análisis de hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en cortes tisulares FFPE múltiples.

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN de gen marcada con FITC de TCRAD 4,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) (RP11-654A2, RP11-246A2, CTP-2355L21, RP11-158G6, RP11-780M2, RP11-481C14; tamaño 1018 kb); EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II: sonda de ADN de gen marcada con FITC de TCRAD 4,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) (tamaño 1018 kb); EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0; ADN de esperma de salmón sometido a cizallamiento 0,1 ug/ul.

Composición de sonda de FISH III: 300 nM de cada sonda individual de CEN 17 de ANP marcada con FITC (1/2 de la concentración convencional); EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Todas las muestras se analizaron usando el protocolo DuoCISH de Dako (SK108) y composiciones para sondas divididas con la excepción de que el lavado en condiciones de rigurosidad se llevó a cabo durante 20 minutos en lugar de 10 minutos, y sin usar la etapa de cromógeno rojo DuoCISH.

Resultados:

	Intensidad de señal	
Composición	ADN con FITC	ANP con FITC
I	3	-
II	3	-
III	-	3

Nota: Las intensidades de señal fueron muy fuertes. Debido a los altos niveles de fondo, no fue posible distinguir si la adición de ADN de esperma de salmón en la composición II redujo el fondo. Las señales fueron claramente visibles usando un objetivo x10 en, por ejemplo, amígdalas, que en general tenían menos fondo. Si los tejidos poseían fondo altos, las señales fueron claramente visibles usando un objetivo x20.

Ejemplo 20

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de cortes tisulares FFPE tratados con las composiciones dadas a conocer con dos sondas de ADN.

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN de gen marcada con FITC de IGH 9 ng/µl (RP11-151B17, RP11-112H5, RP11-101G24, RP11-12F16, RP11-47P23, CTP-3087C18; tamaño 612 kb); sonda de ADN marcada con rojo Tx MYC 6,4 ng/µl (CTD-2106F24, CTD-2151C21, CTD-2267H22; tamaño 418 kb); EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II: sonda de ADN de gen marcada con FITC IGH 9 ng/µl; sonda de ADN marcada con rojo Tx MYC 6,4 ng; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0; ADN de esperma de salmón sometido a cizallamiento 0,1 ug/ul.

	Intensidad de señal		
ADN de salmón	Sonda de FITC	Sonda de rojo Texas	Fondo
-	2 ½	2 ½	+2,5
+	3	3	+1,5

NOTA: el fondo alto se debió probablemente al hecho de que se usaron concentraciones de sonda convencionales.

Ejemplo 21

Este experimento examina el uso de las composiciones dadas a conocer en muestras citológicas.

Composición de sonda de FISH: EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM; sonda de ADN marcada con rojo Tx de HER2 5 ng/µl (1/2 de la concentración convencional) y ½ de la concentración

convencional de CEN7 (25 nM).

Las sondas de FISH se incubaron sobre extensiones cromosómicas en metafase a 82ºC durante 5 minutos, luego a 45ºC durante 30 minutos, todo sin bloqueo.

Resultados:

Intensidad de señal		Fondo
Sonda de ADN	Sonda de ANP	
3	3	+1

No se observó bandeo cromosómico (patrón de bandeo R) con las composiciones de la invención, a diferencia de con las disoluciones de ISH tradicionales, que normalmente muestran bandeo R. Se observó una baja tinción de fondo roja homogénea de los cromosomas en metafase y núcleos en interfase.

Ejemplo 22

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de sondas de ADN en muestras citológicas, extensiones en metafase, con y sin bloqueo.

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN de gen marcada con rojo Texas de TCRAD 6 ng/μl (concentración convencional) (CTP- 31666K20, CTP-2373N7; tamaño 301 kb) y sonda de ADN de gen marcada con FITC 4,5 ng/μl (1/4 de la concentración convencional); EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II: sonda de ADN de gen marcada con rojo Texas TCRAD 6 ng/μl (concentración convencional) (tamaño 301 kb) y sonda de ADN de gen marcada con FITC 4,5 ng/μl (1/4 de la concentración convencional); EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0; ADN de esperma de salmón sometido a cizallamiento 0,1 ug/ul.

Las sondas de FISH se incubaron sobre extensiones en metafase a 82ºC durante 5 min, luego a 45ºC durante 60 min.

Resultados:

Agente de bloqueo	Fondo	Intensidad de señal	
		Rojo Tx	FITC
Nada	+0	3	3
ADN de salmón 0,1 μg/μl	+0	3	3

De nuevo, no se observó bandeo cromosómico (patrón de bandeo R) con las composiciones de la invención. Además, no se observó tinción de fondo de los cromosomas en metafase o núcleos en interfase.

Ejemplo comparativo 23

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo en función de la desnaturalización a temperaturas y tiempos diferentes.

Composición de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con rojo Tx de HER2 2,5 ng/μl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Los portaobjetos se desnaturalizaron tal como se indica en la tabla y se hibridaron a 45ºC durante 60 min.

Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Tiempo de desnaturalización	Fondo	Intensidad de señal	
			ADN	ANP
82ºC	5 min	+3	3	3
82ºC	10 min	+2 ½	3	3
72ºC	10 min	+1½	3	3
62ºC	10 min	+½	2½ - 3	3

Estos resultados muestran que el fondo fue significativamente menor cuando se desnaturalizaron las muestras a 72ºC y 62ºC durante 10 min, en comparación con 82ºC durante 5 y 10 min Por tanto, las composiciones de la invención producen señales fuertes con fondo mejorado a temperaturas de desnaturalización más bajas.

Ejemplo comparativo 24

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo en función de la desnaturalización a temperaturas y tiempos diferentes.

Composición de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con rojo Tx de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Los portaobjetos se desnaturalizaron tal como se indica en la tabla y se hibridaron a 45ºC durante 60 min.

Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Tiempo de desnaturalización	Fondo	Intensidad de señal	
			ADN	ANP
82ºC	5 min	+2½	3	3
72ºC	10 min	+1	3	3
67ºC	10 min	+½	3	3
62ºC	10 min	+1	3	3

Estos resultados muestran que el fondo fue significativamente menor cuando las muestras se desnaturalizaron a 72, 67 y 62ºC durante 10 min, en comparación con 82ºC durante 5 min Por tanto, las composiciones de la invención producen señales fuertes con fondo mejorado a temperaturas de desnaturalización más bajas.

Ejemplo comparativo 25

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo en función de la desnaturalización a temperaturas y tiempos diferentes.

Composición de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con rojo Tx de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Los portaobjetos se desnaturalizaron tal como se indica en la tabla y se hibridaron a 45ºC durante 60 min.

Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Tiempo de desnaturalización	Fondo	Intensidad de señal	
			ADN	ANP
82ºC	5 min	+2	3	3
72ºC	15 min	+1	3	2 ½
67ºC	15 min	+3	3	2 ½
62ºC	15 min	+3	3	3

Estos resultados muestran que el fondo fue más alto cuando las muestras se desnaturalizaron a 67 y 62ºC durante 15 min. Sin embargo, el tipo de fondo observado (líneas verdes a lo largo del tejido en contraposición al fondo rojizo más normal), sugirió que la morfología de la muestra empezó a sufrir la desnaturalización de 15 minutos. Este tipo de fondo puede reducirse usando pretratamiento térmico más suave y/o condiciones de digestión con pepsina.

En general, temperaturas de desnaturalización más bajas reducen los niveles de fondo significativamente. Además, bajando la temperatura de desnaturalización, pero manteniendo el tiempo de 5 min, se reduce la intensidad de señal de la sonda de ADN (datos no mostrados).

Ejemplo comparativo 26

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo en función de la hibridación a diferentes temperaturas cuando las muestras se desnaturalizan a 82ºC durante 5 min.

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN marcada con rojo Tx de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II: EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0

Los portaobjetos se desnaturalizaron con composiciones de sonda de FISH a 82ºC durante 5 min y se hibridaron tal como se indica en la tabla durante 60 min.

Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Composición de sonda de FISH	Fondo	Intensidad de señal	
			ADN	ANP
45ºC	I	+1 - 2	2½ - 3	2½
50ºC	I	+1 - 1½	3	2½
55ºC	I	+1 ½ - 2	2 - 2½	2½
45ºC	II	+0	0	0

Estos resultados muestran que las señales más altas se observaron a hibridación de 50ºC. El control sin sonda no mostró tinción de fondo. La morfología empezó a sufrir cuando se hibridó a 55ºC. Sin embargo, este efecto en la morfología puede reducirse usando pretratamiento térmico más suave y/o condiciones de digestión con pepsina.

Ejemplo comparativo 27

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo en función de la hibridación a diferentes temperaturas cuando las muestras se desnaturalizan a 67ºC durante 10 min.

Composición de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con rojo Tx de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Los portaobjetos se desnaturalizaron con la composición de sonda de FISH a 67ºC durante 10 min y se hibridaron durante 60 min.

Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Fondo	Intensidad de señal	
		ADN	ANP
45ºC	+1 - 1½	3	2½
50ºC	+1 - 2	3	3
55ºC	+1 - 2	3	2½

Estos resultados muestran que las señales más altas se observaron a hibridación de 50ºC. La morfología empezó a sufrir cuando se hibridó a 55ºC. Sin embargo, este efecto en la morfología puede reducirse usando pretratamiento térmico más suave y/o condiciones de digestión con pepsina.

Ejemplo 28

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de la hibridación a 45ºC y a temperatura ambiente (TA, 21ºC) sin desnaturalizar la sonda y el tejido.

Composición de sonda de FISH: sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Se hibridaron las sondas de FISH y el tejido (no desnaturalizados) a TA en una cámara de humedad o en un dispositivo de hibridación Dako (S2450, Dako) a 45ºC durante la noche.

Resultados:

Desnaturalización	Temperatura de hibridación	Tejido	Fondo	Intensidad de señal	
				ADN	ANP
no	TA	Mama	+0	0	2½
no	TA	Amígdalas	+0	0	2½
no	45ºC	Mama	+0-1½	3	3
no	45ºC	Amígdalas	+0	3	3

Estos resultados muestran que el tampón puede usarse sin desnaturalizar o bien la muestra o la composición de sonda. Obsérvese que la sonda no se calentó por encima de la TA en ningún momento antes de o durante este experimento, aparte de la etapa de hibridación.

Ejemplo 29

Este ejemplo compara la intensidad de señal y de fondo de la hibridación a 45 y 50ºC (durante 1 h y durante la noche) sin desnaturalización del corte tisular, y con o sin desnaturalización de la sonda de FISH (ejemplo comparativo en la medida en que tuvo lugar la desnaturalización).

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 3,3 ng/µl (1/3 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC

al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II (mezcla de sonda de HER2 PharmDx, K5331, Dako): sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 10 ng/μl y (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC, formamida al 45%, sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, ANP de bloqueo sin marcar 5 μM.

Se pretrataron los portaobjetos tal como se describe anteriormente en el protocolo FISH de Dako convencional hasta después de la etapa de deshidratación (K5599, Dako). La sonda de FISH o bien no se desnaturalizó con calor, o bien se desnaturalizó con calor en un bloque térmico en tubos de centrífuga de 1,5 ml a 67ºC durante 1 min o a 82ºC durante 5 min y se puso en hilo. Se pretrataron las muestras, se deshidrataron y se secaron al aire. Se añadieron a la muestra diez µl de sonda de FISH no desnaturalizada con calor o desnaturalizada con calor, se cubrió con un cubreobjetos y se selló, y se hibridó a 45ºC durante 60 min. Entonces se siguió el procedimiento FISH de Dako convencional. La sonda no se calentó por encima de la TA en ningún momento antes del experimento.

Resultados:

Sonda	Temp./tiempo de desnaturalización de la sonda	Temp. de hibridación	Tiempo de hibridación	Fondo	Intensidad de señal ADN	Intensidad de señal ANP
I	-	45ºC	1 h	+0-½	2	3
II	-	45ºC	1 h	0	0	3
I	-	45ºC	durante la noche*	+1-2	3	2-2½
II	-	45ºC	durante la noche	+0	½	2½
I	-	50ºC	1 h	+½	2½	3
II	-	50ºC	1 h	+0	0	3
I	-	50ºC	durante la noche*	+2-3	3	1½
II	-	50ºC	durante la noche	+0	½	2
I	67ºC/1 min	45ºC	1 h	+½	2½-3	3
II	67ºC/1 min	45ºC	1 h	0	0	3
I	67ºC/1 min	45ºC	durante la noche*	+2	3	2
II	67ºC/1 min	45ºC	durante la noche	+0	1½-2	2-2½
I	67ºC/1 min	50ºC	1 h	+1	2½-3	3
II	67ºC/1 min	50ºC	1 h	+0	0	2½
I	67ºC/1 min	50ºC	durante la noche*	+2	3	2
II	67ºC/1 min	50ºC	durante la noche	+1	1	2½
I	82ºC/5 min	45ºC	1 h	+½-1	2-2½	3
II	82ºC/5 min	45ºC	1 h	0	0	2
I	82ºC/5 min	45ºC	durante la noche*	+2-3	3	1½
II	82ºC/5 min	45ºC	durante la noche	+0	1	2
I	82ºC/5 min	50ºC	1 h	+1-1½	3	2-2½
n	82ºC/5 min	50ºC	1 h	0	0	2
I	82ºC/5 min	50ºC	durante la noche*	+3	2	1
II	82ºC/5 min	50ºC	durante la noche	0	1	3

*Se secaron los portaobjetos con composición de sonda de FISH I tras la hibridación durante la noche.

Estos resultados muestran que las sondas a base de ADN y ANP no requieren la desnaturalización de la muestra de tejido o la sonda con composición de sonda de FISH I. Sin embargo, si la composición de sonda de FISH I se desnaturalizó a 67ºC durante 1 min o a 82ºC durante 5 min antes de la hibridación, se obtuvieron señales más fuertes. Las composiciones de la invención mostraron señales de ADN mejoradas sin desnaturalización de la muestra con o sin desnaturalización de la sonda, en comparación con tampones que contienen formamida. Obsérvese que para la composición de sonda de FISH II (formamida), las puntuaciones para la sonda a base de ADN eran todas cero a una incubación con hibridación durante 60 min. Por tanto, las composiciones de la invención

mostraron señales en hibridaciones de una hora sin desnaturalización.

Ejemplo 30

El ejemplo compara la intensidad de señal en muestras citológicas (extensiones en metafase) de la hibridación a 45ºC sin desnaturalizar la sonda y el tejido.

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 2,5 ng/µl (1/4 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II (mezcla de sonda de HER2 PharmDx, K5331, Dako): sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 10 ng/µl y (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC, formamida al 45%, sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, ANP de bloqueo sin marcar 5 µM.

Tras la fijación en formaldehído, algunas de las muestras se digirieron con pepsina (vial 2, K5599) para permitir un mejor acceso para la sonda no calentada a la diana no calentada. Se aplicó pepsina a 37ºC durante 2 min, entonces se lavó 2 x 5 min con tampón de lavado, antes de realizar la etapa de deshidratación. Se hibridaron las sondas de FISH y las extensiones en metafase (no desnaturalizadas) a 45ºC durante 180 min. Se desnaturalizó la muestra de control a 82ºC durante 5 min, seguido por hibridación a 45ºC durante 180 min. La sonda no se calentó por encima de la TA en ningún momento antes del experimento.

Resultados:

Sonda	Pepsina	Desnaturalización	Intensidad de señal	
			ADN	ANP
I	-	-	½	1
I	+	-	1½	2
I	-	+	2½	2½
II	-	-	0	0
II	+	-	0	½
II	-	+	1	3

Estos resultados muestran que las composiciones de la invención (composición I) producen señales más fuertes que las composiciones que contienen formamida tradicionales (composición II) cuando la muestra y la sonda no están desnaturalizadas, y cuando las muestras se digieren con pepsina. Además, las composiciones de la invención producen señales más fuertes para sondas de ADN que las composiciones que contienen formamida tradicionales incluso cuando se realiza una etapa de desnaturalización.

Obsérvese que el experimento anterior implicaba una hibridación de 3 horas. En otros experimentos, la hibridación durante la noche de muestras en metafase creó una alta tinción de fondo, y la hibridación de 60 min mostró señales débiles (datos no mostrados). Obsérvese también que la estructura de los cromosomas en las extensiones en metafase que no se habían desnaturalizado estaba mejor conservada que en aquellas que se habían desnaturalizado. Esto era cierto para la composición tanto I como II.

Ejemplo 31

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de la hibridación de sondas de FISH en cortes tisulares FFPE hibridados a 50ºC durante 120 min o desnaturalizados a 82ºC durante 5 min e hibridados a 45ºC durante 60 min (ejemplo comparativo en la medida en que tuvo lugar la desnaturalización).

Composición de sonda de FISH I: sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 3,3 ng/µl (1/3 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

Composición de sonda de FISH II: sonda de ADN marcada con rojo TX de TOP2A 3 ng/µl (1/3 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

La sonda no se calentó por encima de la TA en ningún momento antes del experimento.

Resultados:

Sonda	Temp./tiempo de desnaturalización	Temp./tiempo de hibridación	Muestra*	Fondo**	Intensidad de señal	
					ADN	ANP

HER2 (I)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+0	2½-3	2½-3
HER2 (I)	-	50ºC/120 min	Amígdalas	+0	2-3	3
HER2 (I)	-	50ºC/120 min	Riñón	+½	2	2½
HER2 (I)	-	50ºC/120 min	Colon	+0	1½-2	2-2½
TOP2A (II)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+0	2½	3
TOP2A (II)	-	50ºC/120 min	Amígdalas	+0	2-2½	3
TOP2A (II)	-	50ºC/120 min	Riñón	+2½	1½-2	2-2½
TOP2A (II)	-	50ºC/120 min	Colon	+0	1½	2-2½
HER2 (I)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+2½	2½	2½
HER2 (I)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Amígdalas	+2½	2½	2
HER2 (I)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Riñón	+2½	1½-2	1½-2
HER2 (I)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Colon	+2½	1½-2	1½-2
TOP2A (II)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+1	2½	3
TOP2A (II)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Amígdalas	+1	2½-3	2
TOP2A (II)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Riñón	+1½	1½-2	1½-2
TOP2A (II)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Colon	+1	1½-2	2-2½

El colon y el riñón proporcionaron señales más débiles que el carcinoma de mama y las amígdalas. Se observa en (F)ISH que tejidos como, por ejemplo, colon y riñón, pueden requerir un pretratamiento más largo que, por ejemplo, carcinoma de mama y amígdalas para obtener señales fuertes, por ejemplo, mediante incubación con digestión con pepsina más larga, debido a ambas características específicas del tejido y lo más importante un tiempo de fijación del tejido a menudo más largo *(*es decir, un pretratamiento más riguroso). Obsérvese que la intensidad de señal del colon y el riñón sin desnaturalización es equivalente al tejido y la sonda desnaturalizados. Por tanto, estos resultados ilustran sorprendentemente que las composiciones de la invención eliminan la necesidad de una etapa de desnaturalización con calor para las muestras tisulares.

Ejemplo 32

Este ejemplo la intensidad de señal y de fondo de hibridaciones realizadas con sulfolano, carbonato de propileno, γ-butirolactona con y sin desnaturalización (ejemplo comparativo en la medida en que tuvo lugar la desnaturalización).

Composición de sonda de FISH I: SL al 40% (T22209, Aldrich), sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y la concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH II: SL al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y la concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH III: PC al 40% (540013, Aldrich), sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y la concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH IV: PC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y la concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH V: GBL al 40% (B103608, Aldrich), sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y la concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH VI: GBL al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y la

concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH VII: EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 3,3 ng/µl (1/3 de la concentración convencional) y ½ de la concentración convencional (300 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Composición de sonda de FISH VIII: formamida (FM) al 15% (15515-026, Invitrogen), sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0, sonda de ADN marcada con rojo TX de HER2 5 ng/µl (1/2 de la concentración convencional) y la concentración convencional (600 nM) de sondas de ANP de CEN17 marcadas con FITC.

Las composiciones de FISH I-VI tenían dos fases a temperatura ambiente. Para las composiciones al 40% (I, III y V), sólo se usó la fase de arriba de las dos fases. Las composiciones al 15% que presentaron fases de diferente viscosidad (II, IV, VI) se mezclaron antes de su uso. Las composiciones VII y VIII tenían una fase.

Resultados:

Sonda	Temp./tiempo de desnaturalización	Temp./tiempo de hibridación	Muestra*	Fondo**	Intensidad de señal	
					ADN	ANP
SL 40% (I)*	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+2½	2-2½	½
			Amígdalas	+2½	1½-2½	½
SL 40% (I)*	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+2	2-2½	½
			Amígdalas	+2	1-1½	½
SL 15% (II)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+2	2-2½	2-2½
			Amígdalas	+1	3	2½-3
SL 15% (II)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+1	2-2½	2-2½
			Amígdalas	+0	3	2-2½
PC 40% (III)*	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+1-1½	2½	2-2½
			Amígdalas	+0-3	3	3
PC 40% (III)*	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+0-3	½-1	2
			Amígdalas	+0	½	1½
PC 15% (IV)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+1	1-2	3
			Amígdalas	+0	½	3
PC 15% (IV)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+2-3	2-2½	2-2½
			Amígdalas	+1-2	2½	2
GBL 40% (V)*	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+3	½-1	½
			Amígdalas	+2	1½-2	½
GBL 40% (V)*	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+3	2-2½	½
			Amígdalas	+2	2-2½	½
GBL 15% (VI)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+2	1½-2½	1½-2½
			Amígdalas	+1	1-1½	2
GBL 15% (VI)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+0-1½	2-2½	2
			Amígdalas	+0	2½-3	½
EC 15% (VII)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+0	2½-3	2
			Amígdalas	+0	3	2½
EC 15% (VII)	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma de mama	+2½	2½	2½
			Amígdalas	+1	3	2½
FM 15% (VIII)	-	50ºC/120 min	Carcinoma de mama	+0	0-½	2
			Amígdalas	+0	0-½	2
FM 15%	82ºC/5 min	45ºC/60 min	Carcinoma	+0	½	2½-3

(VIII)			de mama Amígdalas	+0	½	1½

*Se usó la fase de arriba.

Estos resultados muestran que EC, PC, SL y GBL eliminan la necesidad de una desnaturalización convencional de la sonda y el ADN de muestra. Además, estos disolventes apróticos polares posibilitan hibridaciones más rápidas que el tampón de hibridación de referencia de gran tradición que contiene formamida (composición de sonda de FISH VIII).

REIVINDICACIONES

1. Método de hibridación de secuencias de ácido nucleico *in situ* en una muestra en un portaobjetos sin una etapa de desnaturalización y en un sistema automatizado que comprende:

- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico,

- proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico,

- proporcionar una composición de hibridación que comprende una cantidad eficaz de al menos un disolvente aprótico polar, y

- combinar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda y la composición de hibridación en el sistema automatizado durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda,

en el que el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

2. Método de hibridación de secuencias de ácido nucleico *in situ* en una muestra en un portaobjetos sin una etapa de desnaturalización y en un sistema automatizado que comprende:

- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico, y

- aplicar una composición de hibridación que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico y una cantidad eficaz de al menos un disolvente aprótico polar durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda,

en el que el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la primera secuencia de ácido nucleico está en una muestra biológica.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia monocatenaria y la segunda secuencia de ácido nucleico es una secuencia bicatenaria o en el que la primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia bicatenaria en una muestra biológica y la segunda secuencia de ácido nucleico es una secuencia monocatenaria.

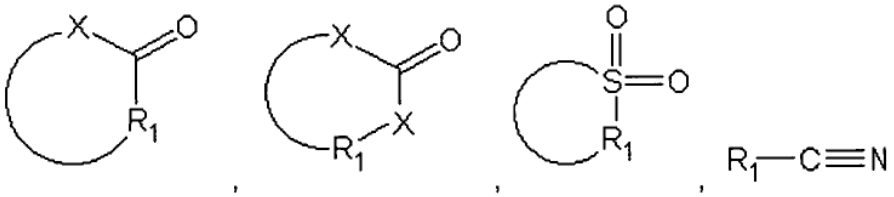
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se proporciona una cantidad de energía suficiente para hibridar los ácidos nucleicos primero y segundo.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la etapa de hibridación dura menos de 8 horas, por ejemplo menos de 1 hora, o por ejemplo menos de 30 minutos, o por ejemplo menos de 15 minutos, o por ejemplo menos de 5 minutos.

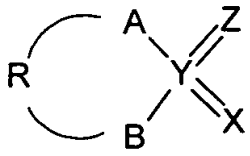
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la concentración de disolvente aprótico polar es del 5% al 10% (v/v) o del 10% al 20% (v/v).

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el disolvente aprótico polar en la composición de hibridación tiene un parámetro de solubilidad en dispersión de entre 17,7 y 22,0 $MPa^{1/2}$, un parámetro de solubilidad polar de entre 13 y 23 $MPa^{1/2}$, y un parámetro de solubilidad por puente de hidrógeno de entre 3 y 13 $MPa^{1/2}$.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el disolvente aprótico polar en la composición de hibridación se selecciona del grupo que consiste en:



donde X es O y R1 es alquildiílo, y



donde X es opcional y si está presente, se elige de O o S,

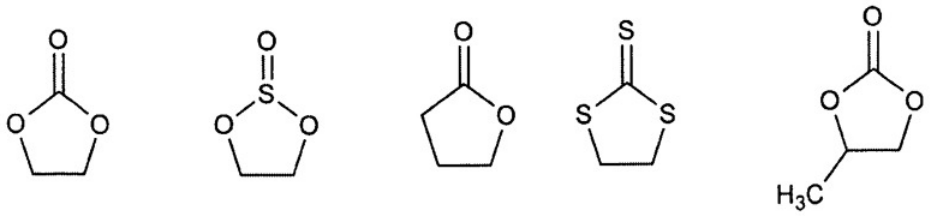
donde Z es opcional y si está presente, se elige de O o S,

donde A y B son independientemente O o N o S o parte del alquildiílo o una amina primaria,

donde R es alquildiílo, y

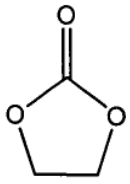
donde Y es O o S o C.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el disolvente aprótico polar en la composición de hibridación se selecciona del grupo que consiste en:



, , , , y

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el disolvente aprótico polar en la composición de hibridación es:



.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el disolvente aprótico polar en la composición de hibridación se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, sulfolano, gamma-butirolactona, carbonato de propileno, tritiocarbonato de etileno, sulfito de glicol/sulfito de etileno, delta-valerolactama (2-piperidona) y 1-óxido de tetrahidrotiofeno.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición de hibridación comprende sulfato de dextrano y NaCl y/o tampón fosfato.

14. Método según la reivindicación 13, en el que el sulfato de dextrano está presente a una concentración del 5% al 40%, el NaCl está presente a una concentración de 0 mM a 1200 mM, y/o el tampón fosfato está presente a una concentración de 0 mM a 50 mM.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición de hibridación comprende el 15% de al menos un disolvente aprótico polar, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, y tampón fosfato 10 mM o la composición de hibridación comprende el 15% de al menos un disolvente aprótico polar, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM y tampón ácido cítrico 10 mM, pH 6,2.

Figura 1

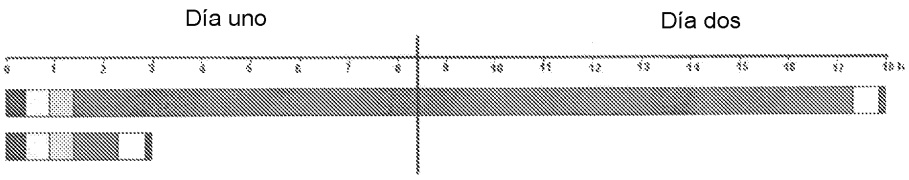
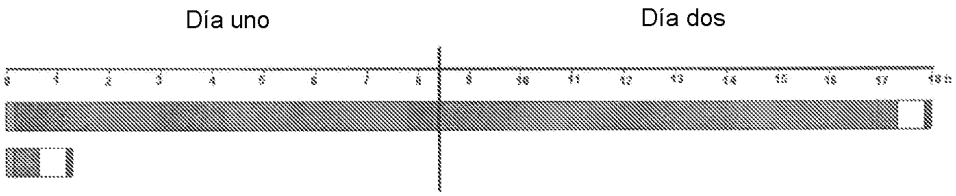



Figura 2