

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 012**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2011 PCT/US2011/026151**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11106583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11748106 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2539355**

54 Título: **Hibridación in situ con sondas PolyTag**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 308670 P

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

17.03.2017

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**FARRELL, MICHAEL;
JIANG, ZEYU y
DAY, JR., WILLIAM A.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 606 012 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hibridación *in situ* con sondas PolyTag

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona sondas y sistemas de sondas para detección de ácidos nucleicos, y en particular sondas y sistemas de sondas que comprenden sondas de ácido nucleico diana que comprenden una pluralidad de secuencias diana de detección y sondas de ácido nucleico de detección que hibridan con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana y que comprenden además una pluralidad de restos detectables, tales como haptenos.

Antecedentes de la invención

15 Las técnicas citogenéticas moleculares, tales como hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH) e hibridación de plata *in situ* (SISH), combinan la evaluación visual de cromosomas (análisis cariotípico) con técnicas moleculares. Los métodos de citogenética molecular se basan en la hibridación de una sonda de ácido nucleico con su ácido nucleico complementario dentro de una célula. Una sonda para una región cromosómica específica reconocerá e hibridará con su secuencia complementaria en un cromosoma en metafase o dentro de un núcleo en interfase (por ejemplo en una muestra tisular). Se han desarrollado sondas para una diversidad de fines de diagnóstico e investigación. Por ejemplo, ciertas sondas producen un patrón de bandas cromosómicas que imitan los procedimientos de tinción citogenética tradicionales y permiten la identificación de cromosomas individuales para análisis cariotípico. Otras sondas derivan de un único cromosoma y cuando se marcan pueden usarse como "pinturas cromosómicas" para identificar cromosomas específicos dentro de una célula. 20 Otras sondas más identifican estructuras cromosómicas particulares, tales como los centrómeros o telómeros de cromosomas.

Sondas de secuencia única hibridan con secuencias de ADN de una única copia en una región cromosómica o un gen específico. Estas son las sondas usadas para identificar la región cromosómica crítica o el gen asociado con un síndrome o afección de interés. En cromosomas en metafase, dichas sondas hibridan con cada cromátida, habitualmente proporcionando dos señales pequeñas, discretas, por cromosoma.

La hibridación de sondas de secuencia única ha hecho posible la detección de anomalías cromosómicas asociadas con numerosas enfermedades y síndromes, incluyendo anomalías genéticas constitutivas, tales como síndromes de microdelección, translocaciones cromosómicas, síndromes de amplificación génica y aneuploidía, enfermedades neoplásicas así como infecciones patógenas. Más habitualmente estas técnicas se aplican a preparaciones citogenéticas convencionales en portaobjetos de microscopio. Además, estos procedimientos pueden usarse en portaobjetos de tejido fijado en formalina, sangre o frotis de médula ósea, y células directamente fijadas u otros aislados nucleares.

Por ejemplo, estas técnicas se usan frecuentemente para caracterizar células tumorales tanto para diagnóstico como para pronóstico de cáncer. Numerosas anomalías cromosómicas se han asociado con el desarrollo de cáncer (por ejemplo, aneuploidías tales como trisomía del 8 asociada con ciertos trastornos mieloides, translocaciones tales como el reordenamiento de BCR/ABL en leucemia mielógena crónica; y amplificaciones de secuencias de ácido nucleico específicas asociadas con transformación neoplásica). Las técnicas moleculares pueden potenciar el ensayo citogenético convencional en la detección y caracterización de dichas anomalías cromosómicas adquiridas. Por ejemplo, se ha usado FISH para buscar recaída temprana y enfermedad residual en células no en división. Se ha combinado la detección inmunocitoquímica de células cancerosas y técnicas de FISH para estudiar anomalías cromosómicas en poblaciones celulares definidas.

50 El documento WO 2008/069884 A2 desvela sistemas de amplificación en dos estadios con una primera acumulación no enzimática de un oligómero de amplificación que es el sustrato diana para una segunda amplificación nucleica o ensayo. Los sistemas de amplificación de dos estadios incluyen uno o más primeros soportes sólidos para capturar ácidos nucleicos de interés en el primer estadio y un segundo soporte sólido para capturar denominados oligómeros de amplificación, que resultan de la amplificación del primer estadio, como diana aportada para el segundo estadio.

El documento WO 2007/001986 A2 desvela la detección de dianas de ácido nucleico en células fijadas mediante un método de marcaje indirecto. En el enfoque de marcaje indirecto, la molécula diana de ácido nucleico captura la sonda marcadora con un resto generador de señal mediante sondas de captura. En cada sonda de captura, hay al menos una sección complementaria de una sección en la molécula diana, y otra sección complementaria de una sección en la sonda marcadora.

El documento WO 2005/049848 A2 desvela un método para hibridar ADN bicatenario con una única sonda de captura monocatenaria en una microplaca, en el que un extremo del ADN se desestabiliza en presencia de uracilo-ADN glucosilasa para crear una sección monocatenaria que pueda hibridar con la sonda de captura inmovilizada. El documento WO 2005/049848 A2 desvela además varios métodos de amplificación en microplaca para generar una

señal mayor y más detectable, comprendiendo los métodos una o más etapas de amplificación de círculo rodante posteriores partiendo del otro extremo del ADN capturado.

5 El documento US 7.005.268 desvela un método para detectar la presencia de moléculas diana unidas a un electrodo en funcionamiento. En particular, el documento US 7.005.268 desvela la unión de una secuencia de ácido nucleico diana con una sonda inmovilizada en un sustrato, y la unión de una molécula nucleica de marcaje con un resto de separación por carga fotoinducible con el ácido nucleico diana unido mediante secuencias complementarias tanto en el ácido nucleico diana como en el ácido nucleico de marcaje.

10 El documento WO 01/94632 A2 desvela un método para detección *in situ* de un analito de ácido nucleico de una secuencia conocida, en el que se hibridan células con un conjunto de sondas oligonucleotídicas específicas de analito ("sondas diana"), seguido de hibridación con una serie de sondas oligonucleotídicas para amplificación de señal. Cada serie de oligonucleótidos consiste en una sonda preamplificadora, que hibrida con la sonda diana, una sonda oligonucleotídica amplificadora, que hibrida con otra parte de la sonda preamplificadora, y con la que, en la
15 última etapa de la serie, hibrida una sonda marcadora, es decir, cuando el analito de ácido nucleico está presente en la muestra, el método del documento WO 01/94632 A2 da como resultado un complejo de analito-sonda diana-sonda preamplificadora-sonda amplificadora-sonda marcadora. La presente divulgación proporciona sondas mejoradas y métodos para producir dichas sondas para uso en aplicaciones de diagnóstico e investigación de hibridación *in situ*.

20 Sumario de la invención

25 Se desvelan en el presente documento sondas y sistemas de sonda para detección de ácidos nucleicos, y en particular sondas y sistemas de sonda que comprenden sondas de ácido nucleico diana que comprenden una pluralidad de secuencias diana de detección y sondas de ácido nucleico de detección que hibridan con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana y que comprenden además una pluralidad de restos detectables, tales como haptenos. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden: una parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana; y

30 una parte diana de detección que comprende una pluralidad de secuencias que son complementarias de al menos una secuencia de sonda de detección y no complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana, estando la parte de sonda y la parte de detección en asociación operativa. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARN y ADN. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico comprende análogos de ácido nucleico seleccionados del grupo que consiste en LNA y PNA. En algunas realizaciones, la pluralidad de secuencias que son complementarias de al menos una secuencia de sonda de detección son secuencias repetidas que son sustancialmente idénticas. En algunas realizaciones, la parte diana de detección comprende más de aproximadamente 5 secuencias repetidas que son sustancialmente idénticas. En algunas realizaciones, la parte diana de detección comprende más de aproximadamente 10 secuencias repetidas que son sustancialmente idénticas. En algunas realizaciones, las
40 secuencias repetidas que son sustancialmente idénticas son de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana es de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana es más del 99 % complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es secuencia de ácido nucleico diana celular. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una parte de una secuencia de sonda primaria. En algunas realizaciones, la secuencia de sonda primaria comprende una parte complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana celular y la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico es complementaria de la parte adaptadora.

50 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona sistemas para detección de una primera secuencia de ácido nucleico diana que comprende: una primera molécula de ácido nucleico que comprende una primera parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de la primera secuencia de ácido nucleico diana y

55 una primera parte diana de detección que comprende una pluralidad de primeras secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección y no complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana, y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una primera parte de sonda de detección complementaria de las secuencias diana de detección en la parte diana de detección de la primera molécula de ácido nucleico y una primera parte de resto detectable que comprende al menos un primer resto detectable bien 5' o bien 3' de la parte de sonda de detección. En algunas realizaciones, la parte de resto detectable de la segunda molécula de ácido nucleico comprende una pluralidad de restos detectables, en los que los restos detectables se incorporan en la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el resto detectable es directamente detectable. En algunas realizaciones, el resto detectable es indirectamente detectable. En algunas realizaciones, el resto detectable se selecciona del grupo que consiste en un resto de generación de señal y un primer miembro de un par de restos de unión. En algunas realizaciones, el resto de generación de señal se selecciona de grupo que consiste en un punto cuántico, un fluoróforo, una proteína fluorescente, una enzima y oro coloidal. En algunas realizaciones, el primer miembro de un par de restos de unión es un hapteno. En algunas

realizaciones, el hapteno se selecciona de grupo que consiste en biotina, 2,4-Dinitrofenol (DNP), derivados de Fluoresceína, Digoxigenina (DIG), 5-Nitro-3-pirazolocarbamida (nitropirazol, NP), 4,5-Dimetoxi-2-nitrocinamida (nitrocinamida, NCA), 2-(3,4-Dimetoxifenil)-quinolina-4-carbamida (fenilquinolona, DPQ), 2,1,3-Benzoxadiazol-5-carbamida (benzofurazano, BF), 3-Hidroxi-2-quinoxalincarbamida (hidroxiquinoxalina, HQ), 4-(Dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (DABSIL), Rotenona isoxazolina (Rot), (E)-2-(2-(2-oxo-2,3-dihidro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-4-il)fenoxi)acetamida (benzodiazepina, BD), ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (cumarina 343, CDO), 2-Acetamido-4-metil-5-tiazolosulfonamida (tiazolosulfonamida, TS) y p-Metoxifenilpirazopodofilamida (Podo). En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico comprende al menos 5 restos detectables. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 restos detectables. En algunas realizaciones, los sistemas comprenden además un agente de unión específico que se une con el primer miembro de un par de restos de unión. En algunas realizaciones, el agente de unión específico comprende un resto de unión específico que se une con el primer miembro de un par de restos de unión y comprende un resto generador de señal. En algunas realizaciones, el resto de unión específico se selecciona de grupo que consiste en avidina y una molécula de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo se une con un hapteno. En algunas realizaciones, el agente de unión específico comprende un resto generador de señal seleccionado del grupo que consiste en un punto cuántico, un fluoróforo, una proteína fluorescente, una enzima y oro coloidal. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARN y ADN. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico comprende análogos de ácido nucleico seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos de LNA y PNA. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico diana celular. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una parte de una primera secuencia de sonda primaria. En algunas realizaciones, la primera secuencia de sonda primaria comprende una parte complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana celular y la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico es complementaria de la parte adaptadora. En algunas realizaciones, los sistemas comprenden además al menos tercera y cuarta moléculas de ácido nucleico, comprendiendo la tercera molécula de ácido nucleico una segunda parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de una segunda secuencia de ácido nucleico diana y una segunda parte diana de detección que comprende una pluralidad de segundas secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección y no complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana y la cuarta molécula de ácido nucleico que comprende una segunda parte de sonda de detección complementaria de las segundas secuencias diana de detección en la segunda parte de detección de la tercera molécula de ácido nucleico y una segunda parte de resto detectable que comprende al menos un segundo resto detectable bien 5' o bien 3' de la parte de sonda de detección. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de ácido nucleico diana es una segunda secuencia de ácido nucleico diana celular. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de ácido nucleico diana es una parte de una segunda secuencia de sonda primaria. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de sonda primaria comprende una parte complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana celular y la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico es complementaria de la parte adaptadora.

La presente invención proporciona métodos de acuerdo con la reivindicación 1, para detectar una primera secuencia de ácido nucleico diana en una muestra que comprende: poner en contacto la muestra con una primera molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de la primera secuencia de ácido nucleico diana y una parte de diana de detección que comprende una pluralidad de primeras secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección y no complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana, en condiciones en las que la parte diana de detección de la primera molécula de ácido nucleico hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; poner en contacto la primera molécula de ácido nucleico con una pluralidad de segundas moléculas de ácido nucleico comprendiendo cada una una parte de sonda de detección complementaria de las secuencias diana de detección de la primera molécula de ácido nucleico y una parte de resto detectable que comprende al menos un primer resto detectable bien 5' o bien 3' de la parte de sonda de detección, en condiciones tales que la parte de sonda de detección de la segunda molécula de ácido nucleico hibride con las primeras secuencias diana de detección de la primera molécula de ácido nucleico; y detectar el al menos un primer resto detectable. En algunas realizaciones, la detección es detección directa. En algunas realizaciones, la detección es detección indirecta. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra tisular, una muestra de organismo, una muestra en un sustrato sólido y muestra en una placa de microtitulación y una muestra en una partícula magnética. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en ADN genómico, ADN nuclear, ARN, ARNm y ácido nucleico citoplasmático. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana se aísla de un tejido u organismo. En algunas realizaciones, la detección comprende detección seleccionada del grupo que consiste en detección colorimétrica, radiométrica, fluorométrica y microscópica. En algunas realizaciones, la detección comprende poner en contacto la muestra con un agente de unión específico que se une con el al menos un resto detectable en la segunda molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana de la primera molécula de ácido nucleico y la secuencia de ácido nucleico diana y la parte de sonda de detección del segundo ácido nucleico y las secuencias diana de detección de la primera molécula de ácido nucleico tienen puntos de fusión con una diferencia de aproximadamente 10 grados Celsius. En algunas

realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico diana celular. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una parte de una secuencia de sonda primaria. En algunas realizaciones, la secuencia de sonda primaria comprende una parte complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana celular y la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico es complementaria de la parte adaptadora. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además poner en contacto la muestra con una tercera molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de una segunda secuencia de ácido nucleico diana y una parte diana de detección que comprende una pluralidad de segundas secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección y no complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana, en condiciones en las que la parte de sonda diana de la primera molécula de ácido nucleico hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; poner en contacto la tercera molécula de ácido nucleico con una pluralidad de cuartas moléculas de ácido nucleico comprendiendo cada una una parte de sonda de detección complementaria de las secuencias diana de detección de la tercera molécula de ácido nucleico y una parte de resto detectable que comprende al menos un segundo resto detectable bien 5' o bien 3' de la parte de sonda de detección, en condiciones tales que la parte de sonda de detección de la cuarta molécula de ácido nucleico hibride con las segundas secuencias diana de detección de la tercera molécula de ácido nucleico; y detectar el al menos un segundo resto detectable. En algunas realizaciones, las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana son parte de la misma molécula. En algunas realizaciones, los primer y segundo restos detectables son iguales. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de ácido nucleico diana es una segunda secuencia de ácido nucleico diana celular. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de ácido nucleico diana es una parte de una segunda secuencia de sonda primaria. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de sonda primaria comprende una parte complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana celular y la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico es complementaria de la parte adaptadora.

Se desvelan en el presente documento también kits que comprenden: una primera molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana y una parte diana de detección aproximadamente mayor de 200 nucleótidos de longitud que comprende una pluralidad de secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección y no complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda de detección complementaria de las secuencias diana de detección en la parte de detección de la primera molécula de ácido nucleico y una parte de resto detectable que comprende al menos un resto detectable bien 5' o bien 3' de la parte de sonda de detección. En algunas realizaciones, los kits comprenden además un agente de unión específico que se une con el al menos un resto detectable. En algunas realizaciones, el agente de unión específico comprende un resto de unión específico conjugado con un resto generador de señal. En algunas realizaciones, los kits comprenden además al menos una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una segunda parte de sonda diana y segunda parte diana de detección. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico diana celular. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una parte de una secuencia de sonda primaria. En algunas realizaciones, la secuencia de sonda primaria comprende una parte complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana celular y la parte de sonda diana de la molécula de ácido nucleico es complementaria de la parte adaptadora.

Descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una representación esquemática de una realización de la invención.
 La Figura 2 es una tinción de transferencia puntual para detección de ARNr 18s con tres ribosondas PolyTag diferentes.
 Las Figuras 3a y 3b son microfotografías de fluorescencia de detección de ARNm de actina.
 La Figura 4 es una microfotografía de detección del centrómero del cromosoma 17.
 Las Figuras 5 y 5b son microfotografías de los resultados de un ensayo de SISH para detectar el gen de PTEN con sondas de PolyTag de ADNmc de cinco copias (5a) o diez copias (5b).
 La Figura 6 es una microfotografía de los resultados de un ensayo de SISH para detectar el gen de PTEN con una sonda primaria seguido de hibridación con sondas PolyTag.

Definiciones

A no ser que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Pueden encontrarse definiciones de términos habituales en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos singulares “un”, “una”, y “el” y “la” incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. De forma similar, se entiende que la palabra “o” incluye “y” a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. El término “pluralidad” se usa de forma sinónima con la expresión “más de uno”, es decir, dos o más. Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para descripción. El término “comprende” significa “incluye”. La abreviatura “e.g.” deriva del Latín *exempli gratia*, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto, la abreviatura “e.g.” es sinónima de la expresión “por ejemplo”. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Anticuerpo: “Anticuerpo” se refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina (incluyendo por ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente con una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés altamente similares) excluyendo sustancialmente la unión con otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es de al menos $10^3 M^{-1}$ mayor, al menos $10^4 M^{-1}$ mayor o al menos $10^5 M^{-1}$ mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica.

De forma más particular, “anticuerpo” se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une con un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos están compuestos de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada la región pesada variable (V_H) y la región ligera variable (V_L). Juntas, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión del antígeno reconocido por el anticuerpo.

Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y partes de las mismas bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de anticuerpo proteolíticos [tales como fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab' , fragmentos Fab' -SH y fragmentos Fab como se conocen en la técnica], fragmentos de anticuerpo recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos $F(ab')_2$, proteínas Fv monocatenarias (“scFv”), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro (“dsFv”), diacuerpos y triacuerpos (como se conocen en la técnica) y anticuerpos de camélidos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 6.015.695; 6.005.079-5.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador, mientras que en dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas modificadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Típicamente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se conocen como “dominios”). En combinación, las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen específicamente con el antígeno. Las regiones variables de cadena pesada y ligera contienen una región “marco conservada” interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. El alcance de la región marco conservada y CDR se han definido (véase, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat se mantiene ahora en línea. Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco conservada de un anticuerpo, que es la región marco conservada combinada de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para situar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión con un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del extremo N terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por lo tanto, una CDR3 V_H se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une con RET tendrá una región V_H específica y la secuencia de región V_L , y por lo tanto secuencias de CDR

específicas. Anticuerpos con diferentes especificidades (es decir diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían entre anticuerpos, solamente un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están implicados directamente en la unión a antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan restos determinantes de especificidad (SDR).

La "unión o unión estable" se refiere a la asociación entre dos sustancias o moléculas, tal como la hibridación de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una región de unión) con otra (o consigo misma) (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico diana). Una molécula de ácido nucleico se une o se une de forma estable con una molécula de ácido nucleico diana si una cantidad suficiente de la molécula de ácido nucleico forma pares de bases o se hibrida con su molécula de ácido nucleico diana para permitir la detección de esa unión.

Un "región de unión" es un segmento o parte de una molécula de ácido nucleico diana que es única de la molécula diana, y en algunos ejemplos está libre o sustancialmente libre de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras indeseadas). La secuencia de ácido nucleico de una región de unión y su molécula de ácido nucleico diana correspondiente tienen suficiente complementariedad de secuencia de ácido nucleico de modo que cuando las dos se incuban en condiciones de hibridación apropiadas, las dos moléculas se hibridarán para formar un complejo detectable. Una molécula de ácido nucleico diana puede contener múltiples regiones de unión diferentes, tales como al menos 10, al menos 50, al menos 100 o al menos 1000 regiones de unión únicas. En ejemplos particulares, una región de unión es típicamente de varios cientos a varios miles de pares de bases de longitud. Sin embargo, en algunos ejemplos una región de unión es más corta, tal como de 50 a 200 pares de bases de longitud. Cuando se obtienen regiones de unión de una secuencia de ácido nucleico diana, la secuencia diana puede obtenerse en su forma nativa en una célula, tal como una célula de mamífero, o en una forma clonada (por ejemplo, en un vector).

Se dice que una molécula de ácido nucleico es "complementaria" con otra molécula de ácido nucleico si las dos moléculas comparten un número suficiente de nucleótidos complementarios para formar una doble cadena o triple cadena estable cuando las cadenas se unen (se hibridan) entre sí, por ejemplo formando pares de bases de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso. Se produce unión estable cuando una molécula de ácido nucleico permanece unida de forma detectable con una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) en las condiciones requeridas.

La complementariedad es el grado en el que bases en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, sonda de ácido nucleico diana) forman pares de bases con las bases en una segunda molécula de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica). La complementariedad se describe convenientemente por el porcentaje, es decir, la proporción de nucleótidos que forman pares de bases entre dos moléculas o dentro de una región específica o dominio de dos moléculas.

En la presente divulgación, "complementariedad suficiente" significa que existe un número suficiente de pares de bases entre una molécula de ácido nucleico o región de la misma y una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) para conseguir unión detectable. Se proporciona un tratamiento exhaustivo de las consideraciones cualitativas y cuantitativas en el establecimiento de condiciones de unión en Beltz *et al.* *Methods Enzymol.* 100: 266-285, 1983, y en Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Un "algoritmo implementado por ordenador" es un algoritmo o programa (conjunto de código ejecutable en un medio leíble por ordenador) que se realiza o se ejecuta por un dispositivo informático a la orden de un usuario. En el contexto de la presente divulgación, pueden usarse algoritmos implementados por ordenador para facilitar (por ejemplo, "automatizar") la selección de secuencias polinucleotídicas con características particulares, tales como identificación de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras indeseadas, por ejemplo, productoras de fondo) o regiones de unión únicas de una secuencia de ácido nucleico diana. Típicamente, un usuario inicia la ejecución del algoritmo introduciendo un comando, y ajustando uno o más criterios de selección, en un ordenador, que es capaz de acceder a una base de datos de secuencias. La base de datos de secuencias puede estar incluida dentro del medio de almacenamiento del ordenador o puede almacenarse de forma remota y accederse a ella mediante una conexión entre el ordenador y un medio de almacenamiento en una localización cercana o remota mediante una intranet o Internet. Después del inicio del algoritmo, el algoritmo o programa se ejecuta por el ordenador, por ejemplo, para seleccionar una o más secuencias polinucleotídicas que satisfagan los criterios de selección. Más habitualmente, las secuencias polinucleotídicas seleccionadas se presentan después (por ejemplo, en una pantalla) o se producen (por ejemplo, en formato impreso o en un medio leíble por ordenador).

Los términos "conjugado, unir, enlazar o ligar" se refieren a ligar covalentemente una molécula con otra molécula para realizar una molécula mayor. Por ejemplo, formando con dos polipéptidos una molécula polipeptídica contigua, o uniendo covalentemente un hapteno u otra molécula con un polipéptido, tal como un anticuerpo scFv. En el contexto específico, los términos incluyen la referencia a unión con una molécula de unión específica tal como un anticuerpo con un resto generador de señal, tal como un punto cuántico. El enlace puede ser por medio químico o recombinante. "Medio químico" se refiere a una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora de modo que se forme un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

5 El término “acoplado”, cuando se aplica a un primer átomo o molécula que se “acopla” con un segundo átomo o molécula puede tanto acoplarse directamente como acoplarse indirectamente. Un anticuerpo secundario proporciona un ejemplo de acoplamiento indirecto. Un ejemplo específico de acoplamiento indirecto es un anticuerpo primario anti-hapteno de conejo que se une con un anticuerpo de ratón anti-IgG de conejo, que a su vez se une con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón que se une covalentemente con un marcador detectable.

10 El término “correspondiente” en referencia a un primer y segundo ácido nucleico (por ejemplo, una región de unión y una secuencia de ácido nucleico diana) indica que el primer y segundo ácido nucleico comparten identidad o complementariedad de secuencia sustancial sobre al menos una parte de la secuencia total del primer y/o segundo ácido nucleico. Por lo tanto, una región de unión corresponde a una secuencia de ácido nucleico diana si la región de unión posee identidad o complementariedad de secuencia sustancial (por ejemplo, complementariedad inversa) con (por ejemplo, si es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o incluso 100 % idéntica o complementaria de) al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región de unión puede corresponder a una secuencia de ácido nucleico diana si la región de unión posee identidad de secuencia sustancial con una cadena de una secuencia de ácido nucleico diana bicatenaria (por ejemplo, secuencia de ADN diana genómica) o si la región de unión es sustancialmente complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria (por ejemplo ARN o un genoma viral de ARN).

20 Un “genoma” es los constituyentes genéticos totales de un organismo. En el caso de organismos eucariotas, el genoma está contenido en un conjunto haploide de cromosomas de una célula. En el caso de organismos procariotas, el genoma está contenido en un único cromosoma, y en algunos casos uno o más elementos genéticos extracromosómicos, tales como episomas (por ejemplo, plásmidos). Un genoma viral puede tomar la forma de una o más moléculas de ADN o ARN mono o bicatenarias dependiendo del virus particular.

25 El término “hapteno” se refiere a una molécula, típicamente a una molécula pequeña que puede combinarse específicamente con un anticuerpo, pero típicamente es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica excepto en combinación con una molécula vehículo.

30 El término “aislado” en referencia a un componente biológico (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula), se refiere a un componente biológico que se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula del organismo, o el órgano en sí mismo, en el que el componente aparece de forma natural, tal como otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas, células y orgánulos. Las moléculas de ácido nucleico que se han “aislado” incluyen moléculas de ácido nucleico purificadas por métodos de purificación convencionales. El término también abarca ácidos nucleicos preparados por amplificación o clonación así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

40 Un “marcador” es un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula para facilitar la detección de esa molécula. Los ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores incluyen restos fluorescentes y fluorogénicos, restos cromogénicos, haptenos, marcadores de afinidad e isótopos radiactivos. El marcador puede ser directamente detectable (por ejemplo, ópticamente detectable) o indirectamente detectable (por ejemplo, mediante interacción con una o más moléculas adicionales que son a su vez detectables). Se describen posteriormente marcadores ejemplares en el contexto de las sondas desveladas en el presente documento. Se analizan métodos para marcar ácidos nucleicos y orientación sobre la elección de marcadores útiles para diversos fines, por ejemplo, en Sambrook y Russell, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) y Ausubel *et al.*, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987, e incluyendo actualizaciones).

50 El término “múltiple” se refiere a realizaciones que permiten detectar múltiples dianas en una muestra sustancialmente de forma simultánea, o secuencialmente, según se desee, usando múltiples conjugados diferentes. La multiplexación puede incluir identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos en general, ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto individualmente como en todas y cada una de las combinaciones. La multiplexación también puede incluir detectar dos o más de un gen, un mensajero y una proteína en una célula en su contexto anatómico.

55 Un “ácido nucleico” es un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma mono o bicatenaria y a no ser que se limite de otro modo, abarca análogos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a nucleótidos de origen natural. El término “nucleótido” incluye, pero sin limitación, un monómero que incluye una base (tal como una pirimidina, purina o análogos sintéticos de las mismas) unida a un azúcar (tal como ribosa, desoxirribosa o análogos sintéticos de las mismas), o una base unida a un aminoácido, como en un ácido nucleico peptídico (PNA). Un nucleótido es un monómero en un polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos se refiere a la secuencia de bases en un polinucleótido.

60 Un “segmento” de ácido nucleico es una subporción o subsecuencia de una molécula de ácido nucleico diana. Un segmento de ácido nucleico puede derivar hipotéticamente o de hecho de una molécula de ácido nucleico diana de diversas maneras. Por ejemplo, un segmento de una molécula de ácido nucleico diana (tal como una molécula de ácido nucleico diana genómica) puede obtenerse por digestión con una o más enzimas de restricción para producir un segmento de ácido nucleico que es un fragmento de restricción. También pueden producirse segmentos de ácido

nucleico a partir de una molécula de ácido nucleico diana por amplificación, por hibridación (por ejemplo, hibridación sustractiva), por síntesis artificial, o por cualquier otro procedimiento que produzca uno o más ácidos nucleicos que correspondan en secuencia a una molécula de ácido nucleico diana. Un ejemplo particular de un segmento de ácido nucleico es una región de unión.

5 Una "sonda" o una "sonda de ácido nucleico" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, molécula de ácido nucleico diana genómica) y, cuando hibrida con la diana, puede detectarse directa o indirectamente. Por lo tanto las sondas permiten la detección y en algunos ejemplos cuantificación, de una molécula de ácido nucleico diana. En ejemplos particulares una sonda incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, que incluyen regiones de unión derivadas de la molécula de ácido nucleico diana y son por lo tanto capaces de hibridar específicamente con al menos una parte de la molécula de ácido nucleico diana. Una sonda puede denominarse "sonda de ácido nucleico marcada", lo que indica que la sonda se acopla directa o indirectamente con un resto detectable o "marcador" que hace a la sonda detectable.

15 La expresión "punto cuántico" se refiere a una partícula de nanoescala que muestra propiedades electrónicas y ópticas dependientes del tamaño debidas al confinamiento cuántico. Se han construido puntos cuánticos, por ejemplo, de materiales semiconductores (por ejemplo, selenuro de cadmio y sulfuro de plomo) y de cristallitos (que han crecido mediante epitaxia de haz molecular), etc. Está disponible en el mercado una diversidad de puntos cuánticos que tienen diversas químicas de superficie y características de fluorescencia de Invitrogen Corporation, Eugene, Oreg. (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138. También están disponibles en el mercado puntos cuánticos de Evident Technologies (Troy, N.Y.). Otros puntos cuánticos incluyen puntos cuánticos de aleaciones tales como puntos cuánticos de ZnSSe, ZnSeTe, ZnSTe, CdSSe, CdSeTe, ScSTe, HgSSe, HgSeTe, HgSTe, ZnCdS, ZnCdSe, ZnCdTe, ZnHgS, ZnHgSe, ZnHgTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, ZnCdSSe, ZnHgSSe, ZnCdSeTe, ZnHgSeTe, CdHgSSe, Cd-HgSeTe, InGaAs, GaAlAs e InGaN (se desvelan puntos cuánticos de aleaciones y métodos para prepararlos, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos n.º 2005/0012182 y Publicación de PCT WO 2005/001889).

20 Una "muestra" es una muestra de ensayo biológica que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína o combinaciones de los mismos, obtenidos de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, preparaciones cromosómicas, sangre periférica, orina, saliva, biopsia tisular, muestra de ensayo quirúrgica, médula ósea, muestras de amniocentesis y material de autopsia. En un ejemplo, una muestra incluye ADN genómico o ARN. En algunos ejemplos, la muestra es una preparación citogenética, por ejemplo que puede colocarse en portaobjetos de microscopio. En ejemplos particulares, las muestras se usan directamente, o pueden manipularse antes de su uso, por ejemplo, mediante fijación (por ejemplo, usando formalina).

35 La expresión "resto generador de señal" se refiere a una composición o molécula que genera una señal que es detectable por un ensayo.

40 La expresión "resto de unión específico" se refiere a un miembro de un par de unión. Los pares de unión específicos son pares de moléculas que se caracterizan por que se unen entre sí excluyendo sustancialmente la unión con otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específicos pueden tener una constante de unión que es al menos $10^3 M^{-1}$ mayor, $10^4 M^{-1}$ mayor o $10^5 M^{-1}$ mayor que una constante de unión para uno de los dos miembros del par de unión con otras moléculas en una muestra biológica). Los ejemplos particulares de restos de unión específicos incluyen proteínas de unión específicas (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, avidinas tales como estreptavidinas y proteína A), secuencias de ácido nucleico y proteína-ácidos nucleicos. Los restos de unión específicos también pueden incluir las moléculas (o parte de las mismas) que se unen específicamente con dichas proteínas de unión específicas.

45 La expresión "agente de unión específico" se refiere a una molécula que comprende un resto de unión específico conjugado con un resto generador de señal.

50 Un "sujeto" incluye cualquier organismo vertebrado multicelular, tal como ser humano y mamíferos no humanos (por ejemplo, sujetos veterinarios).

55 Una "secuencia de ácido nucleico o molécula diana" es una región definida o secuencia particular de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo un genoma (tal como un gen o una región de ADN genómico de mamífero que contiene un gen de interés) o una secuencia de ARN. En un ejemplo en el que la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica diana, dicha diana puede definirse por su posición en un cromosoma (por ejemplo, en una célula normal), por ejemplo, de acuerdo con la nomenclatura citogenética por referencia a una localización particular en un cromosoma; por referencia a su localización en un mapa genético; por referencia a un contig hipotético o ensamblado; por su secuencia o función específica; por su nombre génico o proteico o por cualquier otro medio que la identifique de forma única de entre otras secuencias genéticas de un genoma. En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana es secuencia genómica de mamífero o viral. En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ARN.

60 Una "secuencia de ácido nucleico diana celular" es una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ADN genómica o secuencia de ARN) que está presente en o se extrae de una célula procariota, célula eucariota,

tejido, virus u otra entidad biológica. Las secuencias de ácido nucleico diana también pueden estar presentes dentro de una secuencia de sonda (por ejemplo, una secuencia de sonda primaria que tiene una parte que se une con una secuencia de ácido nucleico diana celular) u otras secuencias de ácido nucleico que se sintetizan para su uso en ensayos.

5 En algunos ejemplos, las alteraciones de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómica), se “asocian con” una enfermedad o afección. Es decir, la detección de la secuencia de ácido nucleico diana puede usarse para inferir el estado de una muestra con respecto a la enfermedad o afección. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana puede existir en dos (o más) formas distinguibles, de modo que una primera forma se correlacione con ausencia de una enfermedad o afección y una segunda (o diferente) forma se correlacione con la presencia de la enfermedad o afección. Las dos formas diferentes pueden ser distinguibles cualitativamente, tal como por polimorfismos de polinucleótidos, y/o las dos formas diferentes pueden ser distinguibles cuantitativamente, tal como por el número de copias de la secuencia de ácido nucleico diana que están presentes en una célula.

15 Un “vector” es cualquier ácido nucleico que actúe como un vehículo para otras secuencias de ácido nucleico (“ajenas”) que no son nativas del vector. Cuando se introduce en una célula hospedadora apropiada un vector puede replicarse (y, por lo tanto, replicar la secuencia de ácido nucleico ajena) o expresar al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico ajena. En un contexto, un vector es un ácido nucleico lineal o circular en el que se introduce una secuencia de ácido nucleico diana de interés (por ejemplo, clonada) para el fin de replicación (por ejemplo, producción) y/o manipulación usando técnicas de ácido nucleico recombinantes convencionales (por ejemplo, digestión de restricción). Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicar en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores habituales incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales (por ejemplo, BAC, PAC, HAC, YAC) e híbridos que incorporan características de más de uno de estos tipos de vectores. Típicamente, un vector incluye uno o más sitios de restricción únicos (y en algunos casos un sitio de multiclonación) para facilitar la inserción de una secuencia de ácido nucleico diana.

30 Descripción detallada de la invención

Se desvela en el presente documento sistemas de sonda para uso en la detección de una biomolécula diana en una muestra biológica que contiene biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hormonas, etc. En realizaciones preferidas, las sondas y sistemas de sonda se usan para detectar ácidos nucleicos diana tales como ADN y ARN en una muestra biológica. En realizaciones preferidas adicionales, las sondas y sistemas de sondas se utilizan para procedimientos de hibridación *in situ*, por ejemplo, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación colorimétrica *in situ* (CISH) e hibridación de plata *in situ* (SISH). En algunas realizaciones, la muestra biológica incluye una sección tisular (tal como obtenida por biopsia) o una muestra de citología (tal como un frotis de Papanicolaou o frotis sanguíneo). Otros tipos de ensayos en los que los conjugados desvelados pueden usarse son fácilmente evidentes para los expertos en la materia, y se analizan posteriormente ejemplos particulares.

Se describe una realización no limitante de la presente invención en la Figura 1. En referencia a la Figura 1, una muestra contiene un ácido nucleico diana 1. Una sonda de ácido nucleico diana 5 de la presente invención comprende una parte de sonda diana 10 y una parte de secuencia de detección 15 que comprende una pluralidad de secuencias diana de detección 20. La parte de sonda diana 10 de la sonda de ácido nucleico diana 5 es complementaria de una región del ácido nucleico diana 1 e hibrida con ácido nucleico diana 1 en condiciones apropiadas. Las secuencias diana de detección 20 preferentemente tienen la misma secuencia de modo que la parte de secuencia de detección 15 comprenda una pluralidad de secuencias repetidas que son las secuencias diana de detección 20. En algunas realizaciones, el sistema comprende además sondas de detección 25 que comprenden una parte de sonda de detección 30 y parte de resto detectable 35. La parte de sonda de detección 30 preferentemente comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de las secuencias diana de detección 20 de la sonda de ácido nucleico diana 5 de modo que la parte de sonda de detección 30 hibride con las secuencias diana de detección 20 en condiciones apropiadas. La parte de resto detectable 35 preferentemente comprende una pluralidad de restos detectables 40. Por ejemplo, en la realización representada, los restos detectables 40 son preferentemente haptenos. Aún en referencia a la Figura 1, en algunas realizaciones, los sistemas de la presente invención comprenden además un agente de unión específico 45 que se une con los restos detectables 40. En algunas realizaciones, el agente de unión específico 45 comprende un resto generador de señal 50 que produce una señal detectable, por ejemplo, el resto generador de señal puede ser preferentemente un compuesto fluorescente o punto cuántico.

60 Las sondas y los sistemas de sonda de la presente invención se describen en más detalle posteriormente.

A. Sistema de sondas Polytag

65 Se desvelan en el presente documento sondas y sistemas de sondas para detección de ácidos nucleicos, y en particular sondas y sistemas de sondas que comprenden sondas de ácido nucleico diana que comprenden una

pluralidad de secuencias diana de detección y sondas de ácido nucleico de detección que hibridan con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana y que comprenden además una pluralidad de restos detectables, tales como haptenos. Las sondas y los sistemas de sonda desvelados en el presente documento pueden usarse para detectar una secuencia de ácido nucleico diana, tal como una secuencia de ácido nucleico diana genómica asociada con enfermedad o asociada con un patógeno, o una secuencia de ácido nucleico diana de ARN. Por ejemplo, las sondas pueden usarse en procedimientos de hibridación *in situ* que incluyen hibridación de las sondas con preparaciones de cromosomas, tales como núcleos en metafase o interfase o secciones tisulares.

1. Sondas de ácido nucleico diana

Se desvela en el presente documento una sonda de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico diana es una molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda diana y una parte diana de detección.

En algunas realizaciones, la parte de sonda diana comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana celular o una secuencia de ácido nucleico artificial tal como una sonda). En algunas realizaciones, la parte de sonda diana hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones adecuadas para hibridación, tales como condiciones adecuadas para hibridación *in situ*, transferencia de Southern o transferencia de Northern. Preferentemente, la parte de sonda diana comprende cualquier ácido nucleico adecuado, tal como ARN (ácido Ribonucleico), ADN (ácido Desoxirribonucleico), LNA (Ácido Nucleico Bloqueado), PNA (Ácido Nucleico Peptídico) o combinaciones de los mismos, y puede comprender tanto nucleótidos convencionales tales como ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos como análogos de nucleótidos. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana de la sonda de ácido nucleico diana es complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular. En estas realizaciones, la sonda de ácido nucleico diana hibrida directamente con la secuencia de ácido nucleico diana celular. En otras realizaciones, la parte de sonda diana de la sonda de ácido nucleico diana es complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana artificial, tal como una sonda primaria. En estas realizaciones, una sonda primaria que comprende una parte de sonda diana celular que es complementaria de una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana celular. La sonda de ácido nucleico diana preferentemente comprende una parte de sonda diana (la parte de sonda diana de sonda primaria) que es complementaria de y puede hibridar con la parte adaptadora de la sonda primaria. Por lo tanto, la sonda primaria hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana celular y después la sonda de ácido nucleico diana hibrida con la sonda primaria. Estas realizaciones permiten el diseño flexible de sistemas de sonda para detección de una secuencia de ácido nucleico diana deseada. En realizaciones en las que se utiliza una sonda primaria, la parte adaptadora de la sonda primaria permite el uso de un conjunto de sondas de ácido nucleico diana convencionales que son específicas para partes adaptadoras definidas. Las sondas primarias se sintetizan con una parte específica para una secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte adaptadora que es específica de una sonda de ácido nucleico diana normalizada particular. Este sistema permite la multiplexación usando sondas primarias con partes adaptadoras definidas y un conjunto de sondas de ácido nucleico diana que son específicas para cada una de las partes adaptadora definidas.

En algunas realizaciones, la parte de sonda diana es más del 80 % complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, preferentemente más del 90 % complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, más preferentemente más del 99 % complementaria de la secuencia de ácido nucleico y más preferentemente aproximadamente 100 % complementaria de la secuencia de ácido nucleico. La longitud de la parte de sonda diana puede variar. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana comprende una secuencia que es complementaria del ácido nucleico diana de aproximadamente 10, 20, 50, 100 o 200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana que es complementaria del ácido nucleico diana es de hasta aproximadamente 20, 50, 100, 200, 1000 o 5000 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la parte de sonda diana que es complementaria del ácido nucleico diana es de aproximadamente 10 a aproximadamente 500, de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En general, el diseño de esta parte de sonda diana se consigue usando prácticas que son convencionales en la técnica. Por ejemplo, en general se evitan secuencias que tengan autocomplementariedad, de modo que las sondas resultantes se plegarían sobre sí mismas, o hibridarían entre sí en lugar de unirse con el ácido nucleico diana.

Una consideración al elegir una longitud para la parte de sonda diana es la complejidad de la muestra que contiene el ácido nucleico diana. Por ejemplo, el genoma humano es de aproximadamente 3×10^9 pares de bases de longitud. Cualquier secuencia de 10 nucleótidos aparecerá con una frecuencia de aproximadamente 2.861 veces en 3 mil millones de pares de bases. Una parte de sonda diana de esta longitud tendría una escasa probabilidad de unirse únicamente con una región de 10 nucleótidos dentro de una diana que tenga una secuencia del tamaño del genoma humano. Si la secuencia diana estuviera dentro de un plásmido de 3 kb, sin embargo, dicho oligonucleótido podría tener una probabilidad muy razonable de unirse de forma única. Por este mismo cálculo puede verse que un oligonucleótido de 16 nucleótidos (es decir, un 16mero) es la longitud mínima de una secuencia que es matemáticamente probable que aparezca una vez en 3×10^9 pares de bases. Este nivel de especificidad también puede proporcionarse por dos o más secuencias de ácido nucleico más cortas si se configuran para unirse de una

manera cooperativa (es decir, de modo que puedan producir el complejo pretendido solamente si ambas o todas están unidas con sus secuencias diana pretendidas), en la que la combinación de las secuencias cortas proporciona la especificidad deseada.

5 Una segunda consideración al elegir la longitud de parte de sonda diana es el intervalo de temperatura en el que se espera que la parte de sonda diana funcione. Un 16mero de contenido de bases promedio (50 % de bases G-C) tendrá una T_m calculada de aproximadamente 41 °C, dependiendo, entre otras cosas, de la concentración de la sonda y su diana, el contenido de sal de la reacción y el orden preciso de los nucleótidos. De forma práctica, se eligen habitualmente partes de sonda diana más largas para potenciar la especificidad de hibridación. Por ejemplo, pueden usarse partes de sonda diana de 20 a 25 nucleótidos de longitud, ya que es altamente probable que sean específicas si se usan en reacciones realizadas a temperaturas que están cerca de su T_m (en un intervalo de aproximadamente 5 °C de la T_m).

15 En realizaciones preferidas, la parte de sonda diana de la sonda de ácido nucleico diana se diseña teniendo en cuenta estas consideraciones, de modo que la parte de sonda diana hibride con un ácido nucleico diana en condiciones adecuadas definidas por el usuario.

20 La parte de sonda diana puede seleccionarse manualmente, o con la ayuda de un algoritmo implementado por ordenador que optimiza la selección de cebadores basándose en parámetros deseados, tales como temperatura, longitud, contenido de GC, etc. Están disponibles numerosos algoritmos o programas implementados por ordenador para su uso a través de Internet o en un ordenador personal. Por ejemplo, para generar múltiples regiones de unión de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica), se identifican regiones de secuencia desprovistas de secuencia de ácido nucleico repetitiva (u otras indeseables, por ejemplo, productoras de fondo) por ejemplo, manualmente o usando un algoritmo informático. Dentro de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) que abarca de varios a varios cientos de kilobases, típicamente se identifican numerosas regiones de unión que están sustancialmente o completamente libres de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras indeseables, por ejemplo, productoras de fondo).

30 En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico diana comprende además una parte de diana de detección bien 5' o bien 3' de la parte de sonda diana, preferentemente 3' de la parte de sonda diana. En algunas realizaciones preferidas, la parte de diana de detección de la sonda de ácido nucleico diana comprende una o más secuencias diana de detección. En algunas realizaciones, la secuencia diana de detección es una secuencia que es complementaria de una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección (descrita en más detalle posteriormente) de modo que la secuencia diana de detección pueda detectarse por hibridación con una sonda de detección.

35 En algunas realizaciones, la parte de detección comprende una pluralidad de secuencias diana de detección. En algunas realizaciones, las secuencias diana de detección en una sonda de ácido nucleico diana dada son idénticas o sustancialmente idénticas de modo que las secuencias diana de detección pueden hibridar con la misma sonda de detección. En otras realizaciones, las secuencias de las secuencias diana de detección se varían de modo que las secuencias diana de detección hibriden con dos o más sondas de detección diferentes. Se entenderá que la presente invención proporciona apoyo para intervalos que queden dentro de los siguientes intervalos especificados. El número de secuencias diana de detección incluidas dentro de la parte de detección puede variar. En consecuencia, en algunas realizaciones, la parte de detección comprende más de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 45 50 o 100 secuencias diana de detección, hasta aproximadamente 100 secuencias diana de detección. En algunas realizaciones, la parte de detección comprende entre aproximadamente 5 y 30, 5 y 50, 10 y 50, 10 y 100, 10 y 200, 20 y 40, 20 y 50, 20 y 100 o 20 y 200 secuencias diana de detección. La longitud de la parte de detección puede variar. En algunas realizaciones, la longitud general de la parte de detección es de aproximadamente 20 a aproximadamente 2000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, de aproximadamente 20 a aproximadamente 500, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 200 a aproximadamente 2000, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1500, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias diana de detección puede variar. En algunas realizaciones, las secuencias diana de detección son mayores de aproximadamente 10, 20, 50 o 75 nucleótidos hasta aproximadamente 100 o 200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias diana de detección se separan por secuencias espaciadoras. En algunas realizaciones, las secuencias espaciadoras varían de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud hasta aproximadamente 20, 50 o 100 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias espaciadoras comprenden uno o más sitios de restricción para una endonucleasa de restricción.

60 Las secuencias diana de detección usan las consideraciones tales como las descritas para el diseño de la parte de sonda diana. En algunas realizaciones, las secuencias diana de detección se diseñan para hibridar eficaz y/o específicamente con una sonda de detección. En algunas realizaciones, la composición de base de las secuencias diana de detección (y secuencias de sonda de detección correspondientes) se seleccionan de modo que se produzca hibridación de la sonda de ácido nucleico diana con la secuencia de ácido nucleico diana y la hibridación

65

de la sonda de detección con las secuencias diana de detección sustancialmente en las mismas condiciones, por ejemplo, temperatura, tiempo, tampón y concentraciones salinas.

Las sondas de ácido nucleico diana pueden sintetizarse por cualquier método conocido. En algunas realizaciones, las secuencias que codifican las sondas de ácido nucleico diana se clonan en un vector de expresión plasmídico. La sonda nucleica diana se transcribe preferentemente del vector con una ARN polimerasa para proporcionar una molécula de ARN que codifica la sonda de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico diana se sintetiza químicamente, por ejemplo, usando análogos de fosforamidita. En algunas realizaciones, se sintetizan sondas de ADN por propagación, purificación y digestión de restricción de ADN plasmídico para proporcionar una molécula de ADN que codifica la sonda de ácido nucleico diana. El ADN bicatenario puede fundirse posteriormente en cadenas individuales para su uso en protocolos de hibridación. En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico diana se sintetizan por PCR asimétrica. En algunas realizaciones, un cebador podría, por ejemplo, ser un análogo de ácido nucleico (por ejemplo, LNA). Este proceso genera una sonda con la parte específica diana que contiene nucleótidos bloqueados y la parte diana de detección que se preparan a partir de dNTP convencionales. En algunas realizaciones, el cebador que contiene LNA contiene una biotina para facilitar la purificación de la cadena deseada.

2. Sondas de detección y agentes de unión específicos

Se desvela en el presente documento una sonda de detección. En algunas realizaciones, la sonda de detección es una molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda de detección y una parte de resto detectable. En algunas realizaciones, la parte de resto detectable de la sonda de detección comprende una pluralidad de restos detectables que son detectables con un agente de unión específico.

En algunas realizaciones, la parte de sonda de detección comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de la secuencia diana de detección como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de la parte de sonda de detección hibrida con una secuencia diana de detección en condiciones adecuadas para hibridación, tales como condiciones adecuadas para hibridación *in situ*, transferencia de Southern o transferencia de Northern. Preferentemente, la parte de sonda de detección comprende cualquier ácido nucleico adecuado, tal como ARN, ADN, LNA, PNA o combinaciones de los mismos, y puede comprender nucleótidos convencionales tales como un ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, así como análogos de nucleótidos. El LNA y PNA son dos ejemplos de análogos de ácidos nucleicos que forman complejos de hibridación que son más estables (es decir, tienen una T_m aumentada) que los formados entre ADN y ADN o ADN y ARN. Los análogos de LNA y PNA pueden combinarse con nucleósidos de ADN y ARN tradicionales durante la síntesis química para proporcionar moléculas de ácido nucleico híbridadas que pueden usarse como sondas. El uso de los análogos de LNA y PNA permite la modificación de parámetros de hibridación tales como la T_m del complejo de hibridación. Esto permite el diseño de sondas de detección que hibridan con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana en condiciones que son iguales o similares a las condiciones requeridas para hibridación de la parte de sonda diana con la secuencia de ácido nucleico diana.

La longitud de la parte de sonda de detección puede variar, pero se diseña para complementariedad con una secuencia diana de detección de una sonda de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, las secuencias diana de detección son mayores de aproximadamente 10, 20, 50 o 75 nucleótidos hasta aproximadamente 100 o 200 nucleótidos de longitud. La parte de sonda de detección se diseña preferentemente usando las consideraciones tales como las descritas para el diseño de la parte de sonda diana. En algunas realizaciones, la parte de sonda de detección se diseña para hibridar eficaz y/o específicamente con una secuencia diana de detección. En algunas realizaciones, la composición de base de la parte de sonda de detección (y secuencias diana de detección correspondientes) se selecciona de modo que la hibridación de la sonda de ácido nucleico diana con la secuencia de ácido nucleico diana y la hibridación de la sonda de detección con las secuencias diana de detección se produzca sustancialmente en las mismas condiciones, por ejemplo, temperatura, tiempo, tampón y concentraciones salinas.

En algunas realizaciones la parte de resto detectable comprende uno o más restos detectables. En algunas realizaciones, los restos detectables son detectables directamente, mientras que en otras realizaciones, los restos detectables son detectables indirectamente. En algunas realizaciones, los restos detectables se incorporan en la sonda de detección. En algunas realizaciones, los restos detectables son restos generadores de señal que producen una señal detectable. En algunas realizaciones, el resto detectable se conjuga con nucleótidos o análogos de nucleótidos usados en la síntesis de la sonda de detección. Por ejemplo, se usan nucleósido fosforamiditas que se conjugan con un resto detectable deseado para sintetizar una sonda de detección mediante síntesis química como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, la parte del resto detectable comprende una pluralidad de restos detectables. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la parte de resto detectable comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 restos detectables. Se reconocerá que la combinación de múltiples secuencias diana de detección en la sonda de ácido nucleico diana permite la hibridación de múltiples sondas de detección con cada sonda de ácido nucleico diana. Cuando cada sonda de detección comprende una pluralidad de restos detectables, se produce amplificación de la señal de detección.

En algunas realizaciones, el resto detectable se detecta indirectamente. En algunas realizaciones, el resto detectable es un primer miembro de un par de moléculas de unión que incluye primer y segundo miembros. En estas realizaciones, se incorporan nucleótidos conjugados con un primer miembro de un par de unión en la sonda de detección, preferentemente mediante el uso de nucleósido fosforamiditas conjugadas con el primer miembro del par de unión. Un agente de unión específico que comprende el segundo miembro del par de unión (es decir, un resto de unión específico) conjugado con un resto generador de señal se usa después para detectar la sonda de detección mediante unión con el primer miembro del par de unión. Los ejemplos de pares de moléculas de unión adecuados incluyen, pero sin limitación, avidina y biotina y hapteno y anticuerpos anti-hapteno. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la parte de resto detectable de la sonda de detección comprende una pluralidad de nucleótidos biotinilados. Estos nucleótidos biotinilados se detectan mediante el uso de compuestos que comprenden avidina conjugada con un resto detectable directamente. En otras realizaciones, la parte de resto detectable de la sonda de detección comprende una pluralidad de nucleótidos haptenilados. Estos nucleótidos haptenilados se detectan mediante el uso de compuestos que comprenden anticuerpos anti-hapteno conjugados con un resto detectable directamente.

En consecuencia, en algunas realizaciones, se desvelan en el presente documento sondas de detección que comprenden uno o más nucleótidos que se conjugan con el primer miembro de un par de moléculas de unión. En algunas realizaciones, el primer miembro del par de moléculas de unión es un hapteno. En algunas realizaciones, la parte de resto detectable de la sonda de detección es una molécula de ácido nucleico que incorpora dNTP unidos covalentemente con moléculas de hapteno (tales como compuesto nitro-aromático (por ejemplo, dinitrofelino (DNP)), biotina, fluoresceína, digoxigenina, etc.). Se conocen bien en la técnica métodos para conjugar haptenos y otros marcadores con dNTP (por ejemplo, para facilitar la incorporación en sondas marcadas). Para ejemplos de procedimientos, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.258.507, 4.772.691, 5.328.824 y 4.711.955. De hecho, están disponibles en el mercado numerosos dNTP marcados, por ejemplo de Invitrogen Detection Technologies (Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Un marcador puede unirse directa o indirectamente con un dNTP en cualquier localización del dNTP, tal como un fosfato (por ejemplo, α , β o γ fosfato) o un azúcar.

Puede usarse una diversidad de haptenos en la parte de resto detectable de la sonda de detección. Dichos haptenos incluyen, pero sin limitación, pirazoles, particularmente nitropirazoles; compuestos de nitrofenilo; benzofurazanos; triterpenos; ureas y tioureas, particularmente fenil ureas, y aún más particularmente fenil tioureas; rotenona y derivados de rotenona, también denominados en el presente documento rotenoides; oxazol y tiazoles, particularmente oxazol y tiazol sulfonamidas; cumarina y derivados de cumarina; ciclolignanos, ejemplificados por Podofilotoxina y derivados de Podofilotoxina; y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de haptenos incluyen, pero sin limitación, 2,4-Dinitrofenilo (DNP), Biotina, derivados de Fluoresceína (FITC, TAMRA, Texas Red, etc.), Digoxigenina (DIG), 5-Nitro-3-pirozolocarbamida (nitropirazol, NP), 4,5-Dimetoxi-2-nitrocinamida (nitrocinamida, NCA), 2-(3,4-Dimetoxifenil)-quinolina-4-carbamida (fenilquinolona, DPQ), 2,1,3-Benzoxadiazol-5-carbamida (benzofurazano, BF), 3-Hidroxi-2-quinoxalincarbamida (hidroxiquinoxalina, HQ), 4-(Dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (DABSYL), Rotenona isoxazolina (Rot), (E)-2-(2-(2-oxo-2,3-dihidro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-4-il)fenozil)acetamida (benzodiazepina, BD), ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (cumarina 343, CDO), 2-Acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida (tiazolsulfonamida, TS) y p-Metoxifenilpirazopodofilamida (Podo). Estos haptenos y su uso en sondas se describen en más detalle en las solicitudes del mismo propietario que la presente Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20080305497, 20080268462 y 20080057513.

En realizaciones en las que la parte de resto detectable de la sonda de detección comprende haptenos, el segundo miembro del par de moléculas de unión es preferentemente una molécula que se une con el hapteno tal como una molécula de unión a antígeno. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno adecuadas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina (incluyendo como ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab como se conocen en la técnica, fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv, fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas por disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como se conoce en la técnica) y anticuerpos de camélidos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 6.015.695; 6.005.079-5.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). En realizaciones preferidas, un resto detectable que genera una señal detectable se une, de forma covalente o de otro modo, con la molécula de unión a antígeno. Los ejemplos de segundos miembros del par de unión adecuados incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-DNP, anti-biotina, anti-FITC, anti-DIG, anti-NP, anti-NCA, anti-DPQ, anti-BF, anti-HQ, anti-DABSYL, anti-Rot, anti-BD, anti-CDO, anti-TS y anti-Podo que se conjugan con un resto detectable que genera una señal detectable. En realizaciones adicionales, el segundo miembro del par de moléculas de unión es un anticuerpo primario anti-hapteno que no comprende un resto detectable. En estas realizaciones, se utiliza un anti-anticuerpo secundario (tal como un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón) que comprende un resto detectable que genera una señal para generar una señal detectable.

Como se ha descrito anteriormente, la sonda de detección puede ser detectable directamente o detectable indirectamente. En algunas realizaciones de detección directa, la sonda de detección comprende restos detectables (por ejemplo, restos generadores de señal) que generan una señal detectable, mientras que en algunas

realizaciones de detección indirecta, se utiliza un agente de unión específico que comprende un miembro de un par de moléculas de unión (tal como un anticuerpo secundario) que se conjuga con un resto generador de señal que genera una señal detectable. En estas realizaciones, puede incorporarse una diversidad de restos generadores de señal que generan una señal detectable en la sonda de detección o conjugarse con el miembro del par de unión.

En realizaciones preferidas, el resto generador de señal puede detectarse por cualquier mecanismo conocido o aún no descubierto incluyendo absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y fotones de frecuencia ultravioleta). Los restos generadores de señal incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra) y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos.

Los ejemplos particulares de restos generadores de señal incluyen moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Se conocen por los expertos en la materia numerosos fluorocromos, y pueden seleccionarse, por ejemplo de Invitrogen, por ejemplo, véase, *The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Invitrogen Detection Technologies, Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Los ejemplos de fluoróforos particulares que pueden unirse (por ejemplo, conjugarse químicamente) con una molécula de ácido nucleico o proteína tal como una molécula de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilben-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenilnaftalimida-3,5 disulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Brilliant Yellow, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5''dibromopirogalol-sulfoneftaleína (Bromopirogalol Red); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; dietilentriamin pentaacetato; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilben-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatostilben-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y QFITC (XRITC); 2',7'-difluorofluoresceína (OREGON GREEN™); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de Malachite Green; 4-metilumbeliferona; orto cresoltaleína; nitrotirosina; pararosnilina; Fenol Red; B-ficoeritrina; oftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Reactive Red 4 (Cibacron™ Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, verde rodamina, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de roduro de sulfonilo de sulforrodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelado de terbio.

Otros fluoróforos adecuados incluyen quelados de europio sensible a tiol que emiten a aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248: 216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274: 3315-22, 1999), así como GFP, Lissamine.TM., dietilaminocumarina, clorotriazinilo de fluoresceína, naftofluoresceína, 4,7-diclororrodamina y xanteno (como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.800.996 de Lee *et al.*) y derivados de los mismos. También pueden usarse otros fluoróforos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los disponibles de Invitrogen Detection Technologies, Molecular Probes (Eugene, Oreg.) e incluyen la serie ALEXA FLUOR™ de colorantes (por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.696.157, 6.130.101 y 6.716.979), la serie BODIPY de colorantes (colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro, por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.774.339, 5.187.288, 5.248.782, 5.274.113, 5.338.854, 5.451.663 y 5.433.896), Cascade Blue (un derivado sensible a amina del pireno sulfonado descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.132.432) y Marina Blue (Patente de Estados Unidos n.º 5.830.912).

Además de los fluorocromos descritos anteriormente, un marcador fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocristal semiconductor, por ejemplo, un QUATUM DOT™ (obtenido, por ejemplo, de QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oreg.; véase también, Patentes de Estados Unidos n.º 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138). Los nanocristales semiconductores son partículas microscópicas que tienen propiedades ópticas y/o eléctricas dependientes del tamaño. Cuando se iluminan nanocristales semiconductores con una fuente de energía primaria, se produce una emisión secundaria de energía de una frecuencia que corresponde al intervalo de banda del material semiconductor usado en el nanocristal semiconductor. Esta emisión puede detectarse como luz coloreada de una longitud de onda o fluorescencia específica. Se describen nanocristales semiconductores con diferentes características espectrales, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos n.º 6.602.671. Los nanocristales semiconductores que pueden acoplarse con una diversidad de moléculas biológicas (incluyen dNTP y/o ácidos nucleicos) o sustratos por técnicas descritas, por ejemplo, en Bruchez *et al.* (1998) *Science* 281: 2013-6, Chan *et al.* (1998) *Science* 281: 2016-8 y Patente de Estados Unidos n.º 6.274.323.

Se desvela la formación de nanocristales semiconductores de diversas composiciones, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.927.069; 6.914.256; 6.855.202; 6.709.929; 6.689.338; 6.500.622; 6.306.736; 6.225.198;

6.207.392; 6.114.038; 6.048.616; 5.990.479; 5.690.807; 5.571.018; 5.505.928; 5.262.357 y en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0165951 así como la Publicación de PCR n.º 99/26299 (publicada el 27 de mayo de 1999). Pueden producirse poblaciones separadas de nanocristales semiconductores que se basan de forma identificable en sus características espectrales diferentes. Por ejemplo, pueden producirse nanocristales semiconductores que emiten luz de diferentes colores basándose en su composición, tamaño o tamaño y composición. Por ejemplo, están disponibles de Invitrogen puntos cuánticos que emiten luz a diferentes longitudes de onda basándose en el tamaño (longitudes de onda de emisión de 565 nm, 655 nm, 705 nm u 800 nm), que son adecuados como marcadores fluorescentes en las sondas desvelas en el presente documento.

Los restos generadores de señal adicionales incluyen, por ejemplo, radioisótopos (tales como ^3H , ^{35}S y ^{32}P), quelados metálicos tales como quelados DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} y liposomas.

Los restos generadores de señal también incluyen enzimas, por ejemplo peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa o β -lactamasa. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, un cromógeno, compuesto fluorogénico o compuesto luminogénico pueden usarse en combinación con la enzima para generar una señal detectable (numerosos de dichos compuestos están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Invitrogen Corporation, Eugene Oreg.). Los ejemplos particulares de compuestos cromogénicos incluyen diaminobenzidina (DAB), 4-nitrofenilfosfato (pNPP), fast red, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitro azul tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, fast red, AP Orange, AP blue, tetrametilbenzidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] ABTS), o-dianisidina, 4-cloronafthol (4-CN), nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilenediamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-.beta.-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-.beta.-D-glucurónido (X-Gluc), 3-amino-9-etil carbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

Como alternativa, puede usarse una enzima en un esquema de detección metalográfica. Por ejemplo, los procedimientos de SISH implican esquemas de detección metalográfica para identificación y localización de una secuencia de ácido nucleico diana genómica hibridada. Los métodos de detección metalográfica incluyen usar una enzima, tal como alcalina fosfatasa, en combinación con ion metálico soluble en agua y un sustrato redox-inactivo de la enzima. El sustrato se convierte a un agente redox-activo por la enzima, y el agente redox-activo reduce el ion metálico, provocando que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2005/0100976, Publicación de PCT n.º 2005/003777 y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0265922). Los métodos de detección metalográfica incluyen usar una enzima oxidoreductasa (tal como peroxidasa de rábano rusticano) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, de nuevo para formar un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.670.113).

En algunas realizaciones, un resto generador de señal es una proteína fluorescente. Las proteínas fluorescentes también pueden usarse como un vehículo, o pueden acoplarse con un vehículo, para facilitar la visualización. Por ejemplo, se aisló originalmente proteína verde fluorescente (GFP) del órgano emisor de luz de la medusa *Aequorea victoria*. Pueden expresarse fusiones de GFP quiméricas *in situ* por transferencia génica en células, y pueden localizarse en sitios particulares dentro de la célula mediante señales de dirección apropiadas. Se han generado con éxito variantes espectrales con emisiones azul, cian y verde amarillento a partir de la GFP de *Aequorea*, pero ninguna muestra máximos de emisión mayores de 529 nm. Se han aislado proteínas de tipo GFP de *Anthozoa* (animales corales) que expandieron significativamente la gama de colores disponible para aplicaciones biológicas. La familia de "proteínas de tipo GFP" depositada en bases de datos de secuencias incluye ahora aproximadamente 30 miembros significativamente diferentes. Las proteínas fluorescentes se refieren a proteínas que pueden hacerse espontáneamente fluorescentes mediante la síntesis autocatalítica de un cromóforo. Se conocen proteínas que fluorescen en longitudes de onda rojas o rojas lejanas (proteínas rojas fluorescentes o RFP). Pueden usarse RFP en combinación con otras proteínas fluorescentes que fluorescen a longitudes de onda más cortas tanto para marcaje multicolor como para experimentos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Las RFP disponibles en el mercado derivan de dos proteínas de tipo GFP de tipo silvestre. DsRed (drFP583) tiene máximos de excitación y emisión a 558 nm y 583 nm, respectivamente. Se generó una proteína fluorescente de rojo lejano mediante mutagénesis de una cromoproteína que absorbe a 571 nm. HcRed1 (Clontech) tiene máximos de excitación y emisión a 588 nm y 618 nm, respectivamente. La proteína fluorescente que emite fluorescencia a la longitud de onda más larga (sin introducir ninguna mutación) es eqFP611, clonada a partir de la anémona de mar *Entacmaea quadricolor*. La proteína absorbe a 559 nm y emite a 611 nm.

Las sondas de detección pueden sintetizarse por cualquier método de síntesis de ácido nucleico conocido adecuado. En algunas realizaciones, las sondas de detección se sintetizan químicamente usando nucleósidos de fosforamidita y/o análogos de nucleósidos de fosforamidita. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas de detección se sintetizan usando nucleósidos de fosforamidita de ARN o ADN convencionales. En algunas realizaciones, las sondas de detección se sintetizan usando fosforamiditas de LNA o fosforamiditas de PNA, solas o en combinación con nucleósidos de fosforamidita convencionales. En algunas realizaciones, los restos detectables se incorporan en la sonda de detección durante la síntesis química. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se

introducen restos detectables, tales como haptenos, en fosforamiditas básicas que contienen los restos detectables deseados. También pueden usarse otros métodos para la síntesis de sondas de detección. Por ejemplo, puede usarse un cebador hecho de análogos de LNA o una combinación de análogos de LNA y nucleótidos convencionales para transcripción del resto de la sonda. Como otro ejemplo, se utiliza un cebador que comprende restos detectables para transcripción del resto de la sonda. En otras realizaciones más, los segmentos de la sonda producidos, por ejemplo, mediante transcripción o síntesis química, pueden unirse por ligamiento enzimático o químico.

B. Uso de sondas y sistemas de sondas

La presente invención proporciona métodos para usar las sondas y los sistemas de sondas desvelados. Por ejemplo, las sondas pueden usarse para detectar una molécula de ácido nucleico diana. En un ejemplo, el método incluye poner en contacto una o más de las sondas de ácido nucleico diana desveladas con una muestra que incluye moléculas de ácido nucleico en condiciones suficientes para permitir la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico en la muestra y las sondas de ácido nucleico diana. La muestra se pone en contacto después con la sonda de detección en condiciones suficientes para permitir la hibridación entre la sonda de detección y las sondas de ácido nucleico diana. La sonda de detección se detecta después, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra con un compuesto que comprende un compañero de unión de un compuesto incorporado en la sonda de detección o ensayando la sonda de detección directamente.

Las sondas y los sistemas de sonda de la presente divulgación pueden usarse para detección de ácido nucleico, tal como procedimientos de hibridación *in situ* (por ejemplo, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH) e hibridación de plata *in situ* (SISH)). La hibridación entre moléculas de ácido nucleico complementarias está mediada mediante enlaces de hidrógeno, que incluyen enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido entre unidades de nucleótidos complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Si una unidad de nucleótido en una cierta posición de una sonda de la presente divulgación es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una unidad de nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana) entonces los oligonucleótidos son complementarios entre sí en esa posición. La sonda y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula está ocupado por unidades de nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, y por lo tanto producir unión detectable. No es necesario que una sonda sea 100 % complementaria de su secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) para ser hibridable de forma específica. Sin embargo es necesaria suficiente complementariedad para que la sonda se una, forme doble cadena o hibride solamente o sustancialmente solamente con una secuencia de ácido nucleico diana cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total).

La hibridación *in situ* implica poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) en el contexto de una preparación cromosómica en metafase o interfase (tal como una muestra celular o tisular montada en un portaobjetos) con una sonda (es decir, la sonda de ácido nucleico diana descrita anteriormente) que puede hibridar específicamente o específica para la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica). Los portaobjetos se pretratan opcionalmente, por ejemplo, para retirar la parafina u otros materiales que pueden interferir con la hibridación uniforme. La muestra cromosómica y la sonda se tratan ambas, por ejemplo, mediante calentamiento para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. La sonda (formulada en un tampón de hibridación adecuado) y la muestra se combinan, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que se produzca hibridación (típicamente hasta alcanzar el equilibrio). La preparación cromosómica se lava para retirar el exceso de sonda de ácido nucleico diana, y se realiza detección de marcaje específico de la diana cromosómica. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la detección se facilita por hibridación de una sonda de detección con la sonda de ácido nucleico diana. La sonda de detección puede detectarse por detección directa o por detección indirecta.

Por ejemplo, en algunas realizaciones de detección directa, la sonda de detección se marca con o uno más compuestos fluorescentes, y la muestra se analiza por microscopía de fluorescencia o captura de imágenes. En algunas realizaciones de detección indirecta, la sonda de detección comprende una pluralidad de restos detectables que comprenden primeros miembros de un par de unión (es decir, un hapteno o biotina) que se detectan poniendo en contacto la muestra con un compuesto que comprende un segundo miembro del par de unión (es decir, anticuerpo anti-hapteno o avidina) conjugado con un resto detectable (es decir, un fluorocromo o punto cuántico). Para una descripción general de procedimientos de hibridación *in situ*, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4.888.278. Se conocen en la técnica numerosos procedimientos para hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH) e hibridación de plata *in situ* (SISH). Por ejemplo, se describen procedimientos para realizar FISH en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.447.841, 5.472.842, 5.427.932, y por ejemplo, en Pinkel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 2934-2938, 1986; Pinkel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9138-9142, 1988, y Lichter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9664-9668, 1988. CISH se describe, por ejemplo, en Tanner *et al.*, Am. J. Pathol. 157: 1467-1472, 2000, y Patente de Estados Unidos n.º 6.942.970. Se proporcionan métodos de detección adicionales en la Patente de Estados Unidos n.º 6.280.929. Pueden encontrarse procedimientos ejemplares para detectar virus por hibridación *in situ* en Poddighe *et al.*, J. Clin. Pathol. 49: M340-M344, 1996.

Pueden emplearse numerosos reactivos y esquemas de detección junto con procedimientos de FISH, CISH y SISH para mejorar la sensibilidad, resolución u otras propiedades deseables. Como se ha analizado anteriormente, pueden detectarse ópticamente de forma directa sondas de detección marcadas con fluoróforos (incluyendo colorantes fluorescentes y QUANTUM DOTS™) cuando se realiza FISH. Como alternativa, la sonda de detección puede marcarse con una molécula no fluorescente, tal como un hapteno (tal como los siguientes ejemplos no limitantes: biotina, digoxigenina, DNP y diversos oxazoles, pirrazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenonas, cumarina, compuestos basados en cumarina, Podofilotoxina, compuestos basados en Podofilotoxina y combinaciones de los mismos), ligando u otro resto detectable de forma indirecta. Las sondas de detección marcadas con dichas moléculas no fluorescentes (y las secuencias de ácido nucleico diana con las que se unen) pueden después detectarse poniendo en contacto la muestra (por ejemplo, la muestra celular o tisular con la que se une la sonda) con un reactivo de detección marcado, tal como un anticuerpo (o receptor, u otro compañero de unión específico) específico para el hapteno o ligando elegido. El reactivo de detección puede marcarse con un fluoróforo (por ejemplo, QUANTUM DOT™) o con otro resto detectable de forma indirecta, o puede ponerse en contacto con uno o más agentes de unión específicos adicionales (por ejemplo, anticuerpos secundarios o específicos), que a su vez pueden marcarse con un fluoróforo. Opcionalmente, el marcador detectable se une directamente con el anticuerpo, receptor (u otro agente de unión específico). Como alternativa, el marcador detectable se une con el agente de unión mediante un enlazador, tal como un enlazador de tiol de hidrazida, un enlazador de polietilenglicol o cualquier otro resto de unión flexible con reactividades comparables. Por ejemplo, un agente de unión específico, tal como un anticuerpo, un receptor (u otro anti-ligando), avidina o similares puede modificarse covalentemente con un fluoróforo (u otro marcador) mediante un enlazador de polialquilenglicol heterobifuncional tal como un enlazador de polietilenglicol (PEG) heterobifuncional. Un enlazador heterobifuncional combina dos grupos reactivos diferentes seleccionados, por ejemplo, de un grupo carbonil-reactivo, un grupo amino-reactivo, un grupo tiol-reactivo y un grupo fotorreactivo, el primero de los cuales se une con el marcador y el segundo de los cuales se une con el agente de unión específico.

En otros ejemplos, la sonda de detección, o agente de unión específico (tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo primario, receptor u otro agente de unión) comprende una enzima que es capaz de convertir una composición fluorogénica o cromogénica en una señal detectable fluorescente, coloreada o detectable de otro modo (por ejemplo, como en deposición de partículas metálicas detectables en SISH). Como se ha indicado anteriormente, la enzima puede unirse directa o indirectamente mediante un enlazador con la sonda o el reactivo de detección relevante. Se describen reactivos (por ejemplo, reactivos de unión) y químicas (por ejemplo, químicas de enlazador y unión) adecuados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2006/0246524; 2006/0246523, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos número 2007011715.

Se apreciará por los expertos en la materia que seleccionando apropiadamente sondas de detección marcadas y/o pares de unión marcados, pueden producirse esquemas de detección múltiples para facilitar la detección de múltiples secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico diana genómicas) en un único ensayo (por ejemplo, en una única muestra celular o tisular o en más de una muestra celular o tisular). Por ejemplo, una primera sonda de detección que corresponde a una primera sonda de ácido nucleico diana puede marcarse con un primer hapteno, tal como biotina, mientras que una segunda sonda de detección que corresponde a una segunda secuencia de ácido nucleico diana puede marcarse con un segundo hapteno, tal como DNP. Después de exposición de la muestra a los conjuntos de sonda, las sondas unidas pueden detectarse poniendo en contacto la muestra con un primer agente de unión específico (en este caso avidina marcada con un primer fluoróforo, por ejemplo, un primer QUANTUM DOT™ espectralmente definido, por ejemplo, que emita a 585 nm) y un segundo agente de unión específico (en este caso un anticuerpo anti-DNP, o fragmento de anticuerpo, marcado con un segundo fluoróforo (por ejemplo, un segundo QUANTUM DOT™ espectralmente definido, por ejemplo, que emita a 705 nm). Pueden añadirse pares de agentes de unión/sondas adicionales al esquema de detección múltiple usando otros fluoróforos espectralmente definidos. Pueden preverse numerosas variaciones directas e indirectas (una etapa, dos etapas o más), todas las cuales son adecuadas en el contexto de las sondas y ensayos desvelados.

Los microscopios de fluorescencia convencionales son una herramienta económica para la detección de reactivos y sondas que incorporan compuestos fluorescentes, tales como bioconjugados de puntos cuánticos. Ya que los conjugados de puntos cuánticos son virtualmente fotoestables, puede tomarse tiempo con el microscopio para encontrar regiones de interés y centrar adecuadamente en las muestras. Los conjugados de puntos cuánticos son útiles siempre que se requiera emisión fotoestable brillante y son particularmente útiles en aplicaciones multicolor cuando solamente está disponible una fuente/un filtro de excitación y se requiere cruzamiento mínimo entre los colores.

D. Dianas

Una molécula de ácido nucleico diana puede ser cualquier ácido nucleico seleccionado, tal como ADN o ARN. En realizaciones particulares, la secuencia diana es una secuencia diana genómica o subsecuencia genómica, por ejemplo de un genoma eucariota, tal como un genoma humano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es ARN citoplasmático. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico diana se selecciona de un patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito intracelular, tal como de un genoma viral. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica, tal como una secuencia eucariota (por ejemplo, de mamífero) o

genómica viral. Pueden generarse sondas de ácido nucleico diana que corresponden esencialmente a cualquier secuencia diana genómica que incluye al menos una parte de ADN no repetitivo único. Por ejemplo, la secuencia diana genómica puede ser una parte de un genoma eucariota, tal como un genoma de mamífero (por ejemplo, humano), fúngico o de parásito intracelular. Como alternativa, una secuencia diana genómica puede ser un genoma viral o procariota (tal como un genoma bacteriano) o parte del mismo. En un ejemplo específico, la secuencia diana genómica se asocia con un organismo infeccioso (por ejemplo, virus, bacteria, hongo).

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico diana puede ser una secuencia asociada con (por ejemplo correlacionada con, implicada causalmente en, etc.) una enfermedad. En algunas realizaciones, se selecciona una secuencia diana que está asociada con una enfermedad o afección, de modo que puede usarse la detección de hibridación para inferir información (tal como información de diagnóstico o pronóstico para el sujeto del que se obtiene la muestra) relacionada con la enfermedad o afección. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico diana seleccionada es una molécula de ácido nucleico diana asociada con una enfermedad neoplásica (o cáncer). En algunas realizaciones, la secuencia diana genómica puede incluir al menos un gen asociado con cáncer (por ejemplo, HER2, c-Myc, n-Myc, Ab1, Bc12, Bc16, R1, p53, EGFR, TOP2A, MET o genes que codifican otros receptores y/o moléculas de señalización, etc.) o región cromosómica asociada con un cáncer. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana puede asociarse con una anomalía estructural cromosómica, por ejemplo, una translocación, supresión o reduplicación (por ejemplo, amplificación génica o polisomía) que se ha correlacionado con un cáncer. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana abarca una secuencia genómica que se reduplica o suprime en al menos algunas células neoplásicas. La secuencia de ácido nucleico diana puede variar sustancialmente en tamaño, tal como al menos 20 pares de bases de longitud, al menos 100 pares de bases de longitud, al menos 1000 bases de pares de longitud, al menos 50.000, al menos 100.000, o incluso al menos 250.000 pares de bases de longitud general.

La secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) puede abarcar cualquier número de pares de bases. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana abarca al menos 1000 pares de bases. En ejemplos específicos, una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) es de al menos 10.000, al menos 50.000, al menos 100.000, al menos 150.000, al menos 250.000 o al menos 500.000 pares de bases de longitud (tal como 100 kb a 600 kb, 200 kb a 500 kb o 300 kb a 500 kb). En algunos ejemplos, cuando la secuencia de ácido nucleico diana es de un genoma eucariota (tal como un genoma de mamífero, por ejemplo, un genoma humano), la secuencia diana típicamente representa una parte pequeña del genoma (o una parte pequeña de un único cromosoma) del organismo (por ejemplo, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 2 % o menos del 1 % del ADN genómico (o un único cromosoma) del organismo). En algunos ejemplos cuando la secuencia diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) es de un organismo infeccioso (tal como un virus), la secuencia diana puede representar una proporción mayor (por ejemplo, 50 % o más) o incluso todo el genoma del organismo infeccioso.

En ejemplos no limitantes específicos, se selecciona una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) asociada con una neoplasia (por ejemplo, un cáncer). Se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluyendo translocaciones y otras reordenaciones, reduplicación o supresión) en células neoplásicas, especialmente en células cancerosas, tales como leucemias de linfocitos B y linfocitos T, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon, cánceres neurológicos y similares. Por lo tanto, en algunos ejemplos, al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) está reduplicada o suprimida en al menos un subconjunto de células en una muestra.

Se conocen translocaciones que implican oncogenes para varios tumores malignos humanos. Por ejemplo, son comunes reordenaciones cromosómicas que implican el gen SYT localizado en la región de punto de rotura del cromosoma 18q11.2 entre tumores tisulares blandos de sarcoma sinovial. La translocación t(18q11.2) puede identificarse, por ejemplo, usando sondas con diferentes marcadores: la primera sonda incluye moléculas de ácido nucleico generadas a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende distalmente desde el gen SYT, y la segunda sonda incluye ácido nucleico generado a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende 3' o proximal al gen SYT. Cuando se usan sondas correspondientes a estas secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico diana genómicas) en un procedimiento de hibridación *in situ*, las células normales, que carecen de un t(18q11.2) en la región génica SYT, muestran dos señales de fusión (generadas por los dos marcadores en proximidad estrecha) que reflejan las dos copias intactas de SYT. Las células anómalas con un t(18q11.2) muestran una única señal de fusión.

Se han observado ejemplos numerosos de reduplicación de genes implicados en la transformación neoplásica, y pueden detectarse citogenéticamente mediante hibridación *in situ* usando las sondas desveladas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) se selecciona incluyendo un gen (por ejemplo, un oncogén) que está reduplicado en uno o más tumores malignos (por ejemplo, un tumor maligno humano). Por ejemplo, HER2, también conocido como c-erbB2 o HER2/neu, es un gen que desempeña un papel en la regulación del crecimiento celular (se proporciona una secuencia genómica de HER2 humana representativa en GENBANK™ n.º de referencia NC_000017, nucleótidos 35097919-35138441). El gen codifica un receptor de superficie celular transmembrana de 185 kd que es un miembro de la familia de tirosina quinasa. HER2 se amplifica en cánceres humanos de mama, ováricos y otros. Por lo tanto, puede usarse un gen de

HER2 (o una región de cromosoma 17 que incluye el gen de HER2) como una secuencia de ácido nucleico diana genómica para generar sondas que incluyan moléculas de ácido nucleico con regiones de unión específicas para HER2.

5 En otros ejemplos, se selecciona una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) que es un gen supresor de tumor que se suprime (pierde) en células malignas. Por ejemplo, la región p16 (incluyendo D9S1749, D9S1747, p16(INK4A), p14(ARF), D9S1748, p15(INK4B), y D9S 1752) localizada en el cromosoma 9p21 está suprimida en ciertos cánceres de vejiga. Las supresiones cromosómicas que implica la región distal de la rama corta del cromosoma 1 (que abarca, por ejemplo, SHGC57243, TP73, EGFL3, ABL2, ANGPTL1 y SHGC-1322), y la región pericentromérica (por ejemplo, 19p13-19q13) del cromosoma 19 (que abarca, por ejemplo, MAN2B1, ZNF443, ZNF44, CRX, GLTSCR2 y GLTSCR1)) son elementos moleculares característicos de ciertos tipos de tumores sólidos del sistema nervioso central.

15 Los ejemplos anteriormente mencionados se proporcionan solamente para fin de ilustración y no se pretende que sean limitantes. Los expertos en la materia conocen numerosas otras anomalías citogenéticas que se correlacionan con transformación y/o crecimiento neoplásico. Las secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico diana genómicas), que se han correlacionado con transformación neoplásica y que son útiles en los métodos desvelados y para las que pueden prepararse sondas desveladas, también incluyen el gen de EGFR (7p12; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000007, nucleótidos 55054219-55242525), el gen de C-MYC (8q24.21; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000008, nucleótidos 128817498-128822856), D5S271 (5p15.2), gen de lipoproteína lipasa (LPL) (8p22; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000008, nucleótidos 19841058-19869049), RB1 (13q14; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000013, nucleótidos 47775912-47954023), p53 (17p13.1; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000017, complemento, nucleótidos 7512464-7531642)), N-MYC (2p24; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000002, complemento, nucleótidos 151835231-151854620), CHOP (12q13; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000012, complemento, nucleótidos 56196638-56200567), FUS (16p11.2; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000016, nucleótidos 31098954-31110601), FKHR (13p14; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000013, complemento, nucleótidos 40027817-40138734), así como, por ejemplo: ALK (2p23; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000002, complemento, nucleótidos 29269144-29997936), cadena pesada de Ig, CCND1 (11q13; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000011, nucleótidos 69165054 ... 69178423), BCL2 (18q21.3; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000018, complemento, nucleótidos 58941559-59137593), BCL6 (3q27; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000003, complemento, nucleótidos 188921859-188946169), MALF1, API (1p32-p31; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000001, complemento, nucleótidos 59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000017, complemento, nucleótidos 35798321-35827695), TMPRSS (21q22.3; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000021, complemento, nucleótidos 41758351-41801948), ERG (21q22.3; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000021, complemento, nucleótidos 38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000007, complemento, nucleótidos 13897379-13995289), EWS (22q12.2; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000022, nucleótidos 27994271-28026505); FLI1 (11q24.1-q24.3; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000011, nucleótidos 128069199-128187521), PAX3 (2q35-q37; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000002, complemento, nucleótidos 222772851-222871944), PAX7 (1p36.2-p36.12; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000001, nucleótidos 18830087-18935219), PTEN (10q23.3; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000010, nucleótidos 89613175-89716382), AKT2 (19q13.1-q13.2; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000019, complemento, nucleótidos 45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000001, complemento, nucleótidos 40133685-40140274), REL (2p13-p12; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000002, nucleótidos 60962256-61003682) y CSF1R (5q33-q35; por ejemplo, GENBANK™ n.º de referencia NC_000005, complemento, nucleótidos 149413051-149473128). Una sonda de ácido nucleico diana o método desvelado puede incluir una región del cromosoma humano respectivo que contiene al menos uno cualquiera (o más, según sea aplicable) de los genes anteriores. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana para algunas sondas o métodos desvelados incluye uno cualquiera de los genes anteriores y suficiente secuencia genómica contigua adicional (bien 5' del gen, 3' del gen o bien una combinación de las mismas) para un total de al menos 100.000 pares de bases (tal como al menos 250.000 o al menos 500.000 pares de bases) o un total de entre 100.000 y 500.000 pares de bases.

55 En ciertas realizaciones, la sonda específica para la molécula de ácido nucleico diana se ensaya (en la misma muestra o una diferente pero análoga) en combinación con una segunda sonda que proporciona una indicación del número de cromosomas, tal como una sonda específica de cromosoma (por ejemplo, centromérica). Por ejemplo, puede usarse una sonda específica para una región de cromosoma 17 que contiene al menos el gen de HER2 (una sonda de HER2) en combinación con una sonda de CEP 17 que hibrida con el ADN de satélite alfa localizado en el centrómero del cromosoma 17 (17p11.1-q11.1). La inclusión de la sonda de CEP 17 permite determinar el número de copias relativo del gen de HER2. Por ejemplo, las muestras normales tendrán una relación de HER2/CEP 17 de menos de 2, mientras que las muestras en las que el gen de HER2 está reduplicado tendrán una relación de HER2/CEP17 de más de 2,0. De forma similar, las sondas centroméricas de CEP correspondientes a la localización de cualquier otra secuencia diana genómica seleccionada pueden usarse también en combinación con una sonda para una diana única en el mismo cromosoma (o uno diferente).

En otros ejemplos, una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) se selecciona de un virus u otro microorganismo asociado con una enfermedad o afección. La detección de la secuencia de ácido nucleico diana derivada de virus o microorganismo (por ejemplo secuencia de ácido nucleico diana genómica) en una muestra celular o tisular es indicativa de la presencia del organismo. Por ejemplo, la sonda puede seleccionarse del genoma de un virus oncogénico o patógeno, una bacteria o un parásito intracelular (tal como *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como especies de *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* y *Babesia*.

En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) es un genoma viral. Los virus ejemplares y secuencias genómicas correspondientes (n.º de referencia RefSeq de GENBANK™ entre paréntesis) incluyen adenovirus humano A (NC_001460), adenovirus humano B (NC_004001), adenovirus humano C (NC_001405), adenovirus humano D (NC_002067), adenovirus humano E (NC_003266), adenovirus humano F (NC_001454), astrovirus humano (NC_001943), poliomavirus humano BK (V01109; GI:60851) bocavirus humano (NC_007455), coronavirus humano 229E (NC_002645), coronavirus humano HKU1 (NC_006577), coronavirus humano NL63 (NC_005831), coronavirus humano OC43 (NC_005147), enterovirus humano A (NC_001612), enterovirus humano B (NC_001472), enterovirus humano C (NC_001428), enterovirus humano D (NC_001430), eritrovirus humano V9 (NC_004295), espumavirus humano (NC_001736), herpesvirus humano 1 (virus del Herpes simple de tipo 1) (NC_001806), herpesvirus humano 2 (virus del Herpes simple de tipo 2) (NC_001798), herpesvirus humano 3 (virus de Varicela zoster) (NC_001348), herpesvirus humano 4 de tipo 1 (virus de Epstein-Barr de tipo 1) (NC_007605), herpesvirus humano 4 de tipo 2 (virus de Epstein-Barr de tipo 2) (NC_009334), herpesvirus humano 5 cepa AD 169 (NC_001347), herpesvirus humano 5 cepa Merlin (NC_006273), herpesvirus humano 6A (NC_001664), herpesvirus humano 6B (NC_000898), herpesvirus humano 7 (NC_001716), herpesvirus humano 8 de tipo M (NC_003409), herpesvirus humano 8 de tipo P (NC_009333), virus de inmunodeficiencia humana 1 (NC_001802), virus de inmunodeficiencia humana 2 (NC_001722), metapneumovirus humano (NC_004148), papilomavirus humano 1 (NC_001356), papilomavirus humano 18 (NC_001357), papilomavirus humano 2 (NC_001352), papilomavirus humano 54 (NC_001676), papilomavirus humano 61 (NC_001694), papilomavirus humano -cand90 (NC_004104), papilomavirus humano RTRX7 (NC_004761), papilomavirus humano de tipo 10 (NC_001576), papilomavirus humano de tipo 101 (NC_008189), papilomavirus humano de tipo 103 (NC_008188), papilomavirus humano de tipo 107 (NC_009239), papilomavirus humano de tipo 16 (NC_001526), papilomavirus humano de tipo 24 (NC_001683), papilomavirus humano de tipo 26 (NC_001583), papilomavirus humano de tipo 32 (NC_001586), papilomavirus humano de tipo 34 (NC_001587), papilomavirus humano de tipo 4 (NC_001457), papilomavirus humano de tipo 41 (NC_001354), papilomavirus humano de tipo 48 (NC_001690), papilomavirus humano de tipo 49 (NC_001591), papilomavirus humano de tipo 5 (NC_001531), papilomavirus humano de tipo 50 (NC_001691), papilomavirus humano de tipo 53 (NC_001593), papilomavirus humano de tipo 60 (NC_001693), papilomavirus humano de tipo 63 (NC_001458), papilomavirus humano de tipo 6b (NC_001355), papilomavirus humano de tipo 7 (NC_001595), papilomavirus humano de tipo 71 (NC_002644), papilomavirus humano de tipo 9 (NC_001596), papilomavirus humano de tipo 92 (NC_004500), papilomavirus humano de tipo 96 (NC_005134), virus paragripal humano 1 (NC_003461), virus paragripal humano 2 (NC_003443), virus paragripal humano 3 (NC_001796), parecovirus humano (NC_001897), parvovirus humano 4 (NC_007018), parvovirus humano B19 (NC_000883), virus sincitial respiratorio humano (NC_001781), rinovirus humano A (NC_001617), rinovirus humano B (NC_001490), espumarretrovirus humano (NC_001795), virus T-linfotrópico humano 1 (NC_001436), virus T-linfotrópico humano 2 (NC_001488).

En ciertos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) es de un virus oncogénico, tal como Virus de Epstein-Barr (EBV) o un Virus de Papiloma Humano (VPH, por ejemplo VPH16, VPH18). En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) es de un virus patógeno, tal como un Virus Sincitial Respiratorio, un Virus de la Hepatitis (por ejemplo, Virus de la Hepatitis C), un Coronavirus (por ejemplo, virus de SARS), un Adenovirus, un Poliomavirus, un Citomegalovirus (CMV) o un Virus del Herpes Simple (VHS).

D. Kits

Se desvelan kits que incluyen al menos una sonda de ácido nucleico diana desvelada en el presente documento, y opcionalmente, al menos una sonda primaria. Por ejemplo, los kits para procedimientos de hibridación *in situ* tales como FISH, CISH y/o SISH incluyen al menos una sonda de ácido nucleico diana como se describe en el presente documento, y, opcionalmente, al menos una sonda primaria. En algunas realizaciones, los kits incluyen además una o más sondas de detección para uso junto con las al menos unas sondas de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los kits incluyen además al menos un agente de unión específico para uso junto con la o las sondas de detección. En consecuencia, los kits pueden incluir una o más sondas de ácido nucleico diana, una o más sondas de detección y uno o más agentes de unión específicos.

Los kits también pueden incluir uno o más reactivos para realizar un ensayo de hibridación *in situ*, o para producir una sonda. Por ejemplo, un kit puede incluir al menos una molécula de ácido nucleico (o población de dichas moléculas), junto con uno o más tampones, marcados dNTP, una enzima de marcaje (tal como una polimerasa), cebadores, agua sin nucleasa, e instrucciones para producir una sonda marcada.

En un ejemplo, el kit incluye una o más sondas de ácido nucleico diana, una o más sondas de detección y uno o más agentes de unión específicos junto con tampones y otros reactivos para realizar hibridación *in situ* tal como tampón de pretratamiento de parafina, proteasa o proteasas y tampón de proteasa, tampón prehibridación, tampón de hibridación, tampón de lavado, contra-tinción o contra-tinciones, medio de montaje o combinaciones de los mismos. El kit puede incluir además opcionalmente portaobjetos de control para evaluar la hibridación y señal de la sonda.

E. Automatización

Un experto habitual en la materia apreciará que las realizaciones del método desvelado en el presente documento para usar conjugados de hapteno pueden automatizarse. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de varias patentes de Estados Unidos que desvelan sistemas y métodos para realizar análisis automáticos, incluyen Patentes de Estados Unidos n.º 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y solicitudes publicadas de Estados Unidos n.º 20030211630 y 20040052685. Pueden realizarse realizaciones particulares de procedimientos de tinción de hapteno polimérico usando diversos procesos automáticos.

Se proporcionan detalles adicionales con respecto a realizaciones de trabajo ejemplares en los ejemplos de trabajo.

Ejemplos

EJEMPLO 1 DETECCIÓN DE ARNm EN TEJIDO FIJADO USANDO SONDAS POLYTAG

Se desparafinizó tejido de xenoinjerto incluido en parafina fijado con formalina usando xileno y se acondicionó para hibridación mediante tratamientos secuenciales con formalina, desnaturalización ácida (HCl 0,3 M), tampón de citrato sódico/Tween 20 y proteasa. Después del acondicionamiento, se depositaron ribosondas de PolyTag (SEQ ID NO: 7-18; 1 µg/ml diluido en un tampón de hibridación que contiene formamida) en el tejido y se desnaturalizaron a 80 °C antes de hibridaciones de seis horas a 65 °C. La sonda no unida y no unida de forma específica se retiró con tres lavados de alta rigurosidad (SSC 0,1x, 75 °C). Se depositaron oligonucleótidos de detección anti-PolyTag marcados con hapteno (SEQ ID NO: 24; 5 µg/ml diluido en tampón de hibridación que contiene formamida) en el tejido y se desnaturalizaron a 60 °C antes de hibridaciones de una hora a 37 °C. Se retiró el oligo de detección no unido y unido de forma no específica usando dos lavados de baja rigurosidad (SSC 2x, 37 °C). Se detectaron haptenos unidos a dianas de ARNm usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-hapteno afines conjugados con un punto cuántico (Invitrogen) diluido en diluyente tamponado que contenía caseína (20 nM). Los núcleos se contratiñeron usando DAPI. Los portaobjetos se deshidrataron usando lavados de etanol crecientes y se cubrieron con un cubreobjetos usando medio de montaje Cytoseal 60. Se capturaron señales fluorescentes usando captura de imágenes espectral interferométrica. Véase Figura 3.

EJEMPLO 2 DETECCIÓN DE ARN FIJADO EN UN PORTAOBJETOS DE VIDRIO MEDIANTE SONDAS POLYTAG

Tinción de transferencia puntual. Se diluyeron de un microgramo a un nanogramo de diana de ARN transcrito *in vitro* en Solución de Aplicación Puntual II (Genorama) y se depositó 1 µl en portaobjetos de micromatriz recubiertos con aminosilano (Genorama) y, después del secado, se reticuló usando luz ultravioleta. Los portaobjetos se bloquearon usando diluyente de anticuerpo tamponado que contenía caseína y se depositaron ribosondas PolyTag (SEQ ID NO: 19-21; 1 µg/ml diluido en tampón de hibridación de formamida) en los portaobjetos y se desnaturalizaron a 80 °C antes de hibridaciones de seis horas a 65 °C. La sonda no unida y unida de forma no específica se retiró con tres lavados de alta rigurosidad (SSC 0,1x, 75 °C). Se depositaron oligonucleótidos de detección anti-PolyTag marcados con hapteno (SEQ ID NO: 27, 30 y [añadir SEQ ID NO de gina]; 5 µg/ml diluido en tampón de hibridación de formamida) en el tejido y se desnaturalizaron a 60 °C antes de hibridaciones de una hora a 37 °C. Se retiró oligo de detección no unido y unido de forma no específica usando dos lavados de baja rigurosidad (SSC 2x, 37 °C). Se detectaron haptenos unidos a dianas de ARNm usando anticuerpos monoclonales anti-hapteno de ratón afines conjugados con punto cuántico (Invitrogen) diluidos en diluyente tamponado que contenía caseína (20 nM). Los portaobjetos se deshidrataron usando lavados de etanol crecientes y se cubrieron con cubreobjetos usando medio de montaje Cytoseal 60. Se desconvolucionaron señales de Qdot, capturadas usadas captura de imágenes espectral interferométrica, en canales de analitos separados y se superpusieron para visualización usando software ImagePro. Véase Fig. 2.

EJEMPLO 3 DETECCIÓN DE ADN NUCLEAR EN TEJIDO FIJADO MEDIANTE SONDAS POLYTAG

Se generó una sonda polytag específica de centrómero de cromosoma 17 (SEQ ID NO: 6) mediante transcripción de un plásmido linealizado con ARN polimerasa T7. Se sometió tejido incluido en parafina fijado en formalina en cortes de 5 µM en un portaobjetos de microscopio de vidrio a hibridación y etapas de detección como se describe posteriormente. Después de desparafinización como se ha indicado anteriormente, los portaobjetos se trataron con una solución de tampón de citrato/Tween 20 a 90 grados centígrados durante 12 minutos y un tratamiento de proteasa a 37 grados centígrados durante 8 minutos. Se aplicó sonda Polytag formulada en un tampón que contenía formamida al portaobjetos que después se calentó a 92 grados centígrados durante 8 minutos para desnaturalizar la

diana de ADN bicatenario. Después de hibridación durante 8 horas los portaobjetos se lavaron dos veces a 72 grados durante 8 minutos con SSC 2X.

5 Se añadió el oligo de detección marcado con hapteno formulado de forma similar (SEQ ID NO: 24). Después de calentar a 55 grados durante 8 minutos se permitió que continuara la hibridación durante 1 hora a 37 grados. Después de dos lavados con SSC 2X a 37 grados la sonda hibridada se detectó con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-DNP seguido de lavado y aplicación de un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa. La señal de peroxidasa se detectó mediante deposición de plata. Véase Fig. 4.

10 EJEMPLO 4 CONJUNTOS DE ÁCIDO NUCLEICO DIANA Y SONDAS DE DETECCIÓN

Se sintetizaron sondas de ácido nucleico diana (ARN) transcribiendo la sonda de un molde de ADN que codificaba la secuencia de sonda. Las siguientes secuencias diana de detección (también denominadas polytags) se dispusieron en asociación operativa con las secuencias de sonda diana (secuencias que hibridan con el ADN diana) y se repitieron de 10 a 40 veces en las sondas de ácido nucleico diana de longitud completa.

POLYTAG SOPHIA
SEQ ID NO: 1: (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)N

20 POLYTAG RAQUEL:
SEQ ID NO: 2
(AGAACAAGAAUACUACCGUCAUGCACUUGAUCCGGCACGGUCACUAGU)N

25 POLYTAG QINGXIA:
SEQ ID NO: 3 (UUACACCUCACCGACAAUAGAAGAUCGUCCUGGCACUGAACUUGCCU) N

POLYTAG EVA:
SEQ ID NO: 4 (UCCGCAGUACGCUUAAUCGCUCCAGACGACACCCAUGG)N

30 POLYTAG GINA:
SEQ ID NO: 5
(UGCGCAAGAACTCATGGCTAACGGACACCGCAAUACAAUGAUACCUUGUCGCCUUCGCGUAU
GCAU)

35 Sondas de ácido nucleico diana de ARN específicas para el centrómero del cromosoma 17:

SEQ ID NO: 6
CACAGAACUAAACAGAAGCAUUCUCAGAACCCUCUUCGUGAUGUUUGCAUUC AACUCACAGU
GC
(CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU) 5 6

40 Sondas de ácido nucleico diana de ARN específicas para ARNm de actina:

1. SEQ ID NO: 7

UGGGCAUGGGUCAGAAGGAUUCUAUGUGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCAUCCUC
ACCCUGAAGUACCCCAUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU) N

45 2. SEQ ID NO: 8

GAGCACGGCAUCGUCACCAACUGGGACGACAUGGAGAAAUCUGGCACCACACCUUCUACAA
UGAGCUGCGUGUGGCUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU) N

ES 2 606 012 T3

3. SEQ ID NO: 9

CGAGGAGCACCCCGUGCUGCTUGACCGAGGCCCCCTUGAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAA
GAUGACCCAGAUCAATGUUUG (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

5 4. SEQ ID NO: 10

AGACCUUCAACACCCAGCCAUGUACGUUJGCUAUCCAGGCUGUGCUAUCCCUGUACGCCUCU
GGCCGUACCACUGGCAUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

10 5. SEQ ID NO: 11

GUGAUGGACUCCGGUGACGGGGUCACCCACACUGUGCCCAUCUACGAGGGGUAUGCCCUC
CCAUGCCAUCCUGCGUCU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

6. SEQ ID NO: 12

15 GGACCUGGCUGGCCGGGACCUGACUGACUACCUCAUGAAGAUCUCACCGAGCGCGGCUACA
GCUUCACCACCACGGCCG (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

7. SEQ ID NO: 13

20 AGCGGAAAUCGUGCGUGACAUAAGGAGAAGCUGUGCUACGUCGCCCTUGGACUUCGAGCA
AGAGAUGGCCACGGCUGCU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

8. SEQ ID NO: 14

25 UCCAGCUCCUCCUGGAGAAGAGCUACGAGCUGCCTGACGGCCAGGUCAUACCAUJGGCAA
UGAGCGGUUCCGUGCCC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

9. SEQ ID NO: 15

UGAGGCACUCUCCAGCCUCCUCCUGGGCAUGGAGUCCUGUGGCAUCCACGAAACUACCU
UCAACUCCAUGAAGU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

10. SEQ ID NO: 16

30 GUGACGUGGACAUCCGCAAAGACCUGUACGCCAACACAGUGCUGTUCUGGCGGCACCACCAU
GUACCCUGGCAUJGCGAC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

11. SEQ ID NO: 17

35 AGGAUGCAGAAGGAGAUCAUGCCUGGCACCCAGCACAAUGAAGAUCAAGAUCAUJGCUCC
UCCUGAGCGCAAGUACUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

12. SEQ ID NO: 18

40 CGUGUGGAUCGGCGGCUCCAUCCUGGCCUCGCUUGUCCACCUUCCAGCAGAUGUGGAUCAGC
AAGCAGGAGUUAUGACGAGU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

Donde n = 56; es decir, 56 repeticiones del polytag.
Sondas de ácido nucleico diana de ARN específicas para ARN ribosómico 18S humano:

ES 2 606 012 T3

SEQ ID NO: 19

CGGAACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGGACGGCCGGGGGCAUUCGUAUUGCGCCGCUAGAGGUG
AAAUUCUUGGACCGGCGC (AGAACAAGAAUACUACCGUCAUGCACUUGAUCCGGCACGGUCA
CUAGU) _N

5 SEQ ID NO: 20

CGGAACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGGACGGCCGGGGGCAUUCGUAUUGCGCCGCUAGAGGUG
AAAUUCUUGGACCGGCGC (UUACACCUCACCGACAAUAGAAGAUCGUCCUGGCACUGAACU
GCCU) _N

10 SEQ ID NO: 21

CGGAACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGGACGGCCGGGGGCAUUCGUAUUGCGCCGCUAGAGGUG
AAAUUCUUGGACCGGCGC (UGCGCAAGAACTCATGGCTAACGGACACCGCAAUACAAUGAU
CCUGUCGCCUUCGCGUAUGCAU) _N

Donde n = 40; es decir, 40 repeticiones del polytag.

15 Se sintetizaron oligonucleótidos de detección en un Sintetizador de Oligonucleótidos Mermade usando fosforamiditas convencionales y protocolos proporcionados por el fabricante. Los haptenos, indicados por R, se introdujeron en una fosforamidita abásica que contenía el hapteno deseado. La sonda de detección Sophia se marcó con DNP (Dinitrofenol) y se usó con un anticuerpo anti-DNP acoplado a Qdots que emitían a 585 nM. La sonda de detección Raquel se marcó con TS (Tiazol Sulfonamida) y se usó con un anticuerpo anti-TS acoplado a Qdots que emitían a 655 nM. La sonda de detección Qingxia se marcó con DC (Dietil Cumarina) y se usó con un anticuerpo anti-DC acoplado a Qdots que emitían a 605 nM. La sonda de detección Eva se marcó con BF (Benzofurazano) y se usó con un anticuerpo anti-BZ acoplado a Qdots que emitían a 525 nM.

25 Sophie:

SEQ ID NO: 22

Sophie 5:

RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTAGAAGAGCACCTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCTGATG

30 SEQ ID NO: 23

Sophie 10:

RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTAGAAGAGCAC
CTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCTGATG

35 SEQ ID NO: 24

Sophie 15:

RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATT
TTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTAGAAGAGCACCTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCTGATG

40 Raquel:

SEQ ID NO: 25

Raquel 5:

45 RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRACTAGTGACCGTGCCGGATCAAGTGCATGACGGTAGTATTCTTGTT
CT

SEQ ID NO: 26

Raquel 10:

50 RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRACTAGTGACCG
TGCCGGATCAAGTGCATGACGGTAGTATTCTTGTTCT

SEQ ID NO: 36
Gina

15:RTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTR
TATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRTATTTTRCGAAGGCGACAGGTA
TCATTGTATTGCGGTGTCGGTTAGCCATGAGTT

5

Secuencias de polytag cortas adecuadas para su uso con sondas de detección de LNA o PNA:

SEQ ID NO: 37 R25_810: AGAAGTATCGTTCCGATCTAACGCG

10

SEQ ID NO: 38 R25_998: ACGCTATTACGATTACGACGTGCGA

SEQ ID NO: 39 R25_1486: TACGATCGCATCGAGTCGCAGATAT

15

SEQ ID NO: 40 R25_1426: CGCACGCATAGTTAGTCGGATATAC

SEQ ID NO: 41 R30_587: CTAGCTCCGATCCGTGATAACGTGC

SEQ ID NO: 42 R30_927: ATGTTACGACCGGCGATCTTATACG

20

SEQ ID NO: 43 R30_1: (GTACATCCTCCGGTTGCGAATATAGCGAAC)

Secuencias adecuadas para su uso en sondas de detección de LNA marcadas con hapteno:

SEQ ID NO: 44 SSophia 1 CTAGATCTCTCGAGACATGC

25

SEQ ID NO: 45 SSophia 2 TTCTAGATCTCTCGAGACATGCACA

EJEMPLO 5 DETECCIÓN CON UNA SONDA POLYTAG DE ADN MONOCATENARIO

30

A) Construcción de sonda PolyTag de ADN monocatenario

Este ejemplo describe la aplicación del sistema PolyTag para detectar diana de ácido nucleico en una célula o tejido. Se sintetizó químicamente una repetición directa de cinco copias de una secuencia única (secuencia KK5) que no tiene homología de secuencia significativa con el genoma humano. El PolyTag KK se clonó en el vector plasmídico puc 19, y la secuencia del clon se verificó por secuenciación. Se construyó una versión de repetición directa de 10 copias (KK10) duplicando KK5 con técnicas de biología molecular convencionales.

35

El gen de PTEN humano se seleccionó como el gen de interés, y solamente se seleccionaron secuencias intrónicas para diseño de cebadores de PCR y amplificación. Se amplificaron treinta y seis fragmentos de ADN, todos de aproximadamente 200 pares de base de longitud con cebadores diseñados (las secuencias de cebadores y secuencias de amplicón de PCR correspondientes se enumeran posteriormente). Se añadió un grupo fosfato al extremo 5' de fragmentos de ADN con polinucleótido quinasa T4, y después se purificaron los fragmentos de ADN del gel de agarosa. Los fragmentos de PCR PTEN se ligaron con la secuencia de KK5 o KK10 linealizada con enzimas de restricción SmaI con ADN ligasa T4. La sonda de PolyTag de PTEN de ADN monocatenario se preparó mediante: 1) con los productos de ligamiento como molde, amplificación de PCR de fragmentos de PTEN con secuencia de KK5 o KK10 unidos entre sí con cebador directo específico de PTEN (usado previamente para generar el fragmento de PCR de PTEN) más un cebador fosforilado 5' común que es complementario de la secuencia de KK (KK5Rp); 2) tratamiento con exonucleasa Lambda de sonda PolyTag de ADN monocatenario generada por fragmentos de PCR para el PTEN, porque la enzima degrada preferentemente cadena de ADN con grupo fosfato 5'.

50

B) Ejemplos de uso de sonda de ADNmc PolyTag para detección de ácido nucleico diana de interés.

En este ejemplo, la sonda de ADNmc PolyTag de PTEN (la sonda) se usó para detectar su diana de célula humana en portaobjetos tisulares incluidos en parafina; se usaron 30 de 36 fragmentos de PCR de PTEN (número 1-30 en el listado de secuencias de PCR de PTEN) en este ejemplo. El tejido se desparafinizó, se hidrató y se prehibridó. Se llevó a cabo hibridación en 45 °C durante 6 horas y no se usó ADN de bloqueo. Se realizó lavado post-hibridación de sonda con SSC 2x a 72 °C durante 8 minutos y se repitió un total de tres veces. Los procedimientos para detección de KK, hibridación de oligo y lavado son: 1) desnaturalizar a 55 °C durante 8 minutos; 2) hibridación a 45 °C durante 1 hora; 3) lavado con SSC 2x tres veces a 45 °C. La señal de detección con SISH fue como se ha publicado. Las sondas tanto PolyTag de cinco copias como PolyTag de diez copias proporcionaron señales claras y fuertes. Véase Figura 5a para resultados de cinco copias y Figura 5b para resultados de diez copias. El procedimiento de detección

60

>PTEN-PCR02 (SEQ ID NO: 51)

ATTGCTGCTCACCGTTTTTTAGGTTTCAGGTCCTCTGACACCTTTTGGTAT
CGTTAATTTTACTGATTTGTGTAGAATGTCAGTTGTATTTTACCAGCTAA
TATCTAGAAATGCTGGCAAGAGGGGTTTACTCCAGCTTTAGATTGTAGGT
ATGTTAGCTTTTTTTCATACAGTGTATTAAATTTACTGAGTCAGCTTGCTG
AATAAGACAGAAGCCCA

5 >PTEN-PCR03 (SEQ ID NO:52)

GGGCTTCAAAGTTAGTGGTCATCGAAAAGCATTAAATCTTTGCAGTTTCA
GGTACAACACATTTGGTTTTGATTAGGGATGGGGATGGGGCCCTCTTTTTG
CAGAATGGGGAAAGTATTGACAGGAATTGAGAGCTATTGGTAGGCCAGTG
TATAAGGTATGTGAAAACAGAATTAAGTTATTGGTCTGAAGTGAAG
CA

10 >PTEN-PCR04 (SEQ ID NO: 53)

AGCGTATGTTGGTCTCTACACATGAAATTTGTGTGACTTAAAACCTTCTC
TAAAACGTACTTTTAGTTATGATATGCATAGAAAAGCAGTATCAAATATT
GCGTCAAATGACTAATAACACTTAATTTCTAGAGTTGTGGTTTTATTGAG
CCAAAAGTTGATATGAAAAAAGTCAGTAAGGAAAGTCAGTGAAGTGCTT
GC

>PTEN-PCR05 (SEQ ID NO: 54)

15 TTGCTGCCAGTGTAAGTTTGCACAGCAGTATAGTCATCAATGCAGATT
TACATTGCTTATAATATACTAAGTAAATACTAAATGATTAAAGATAATAA
AATATGGTGAGGTATAACCACCTTCATTTTAAACTTAGTTTTAGAAGATA
GTAAAGAAAGATTCCTTTATTACCTTTTTTAGAATTTTATTTTAAATAACA
TGGGAAAGGCAACTGGT

>PTEN-PCR06 (SEQ ID NO: 55)

20 AATTTGTGAGACTGGGGTCAGTCAGTTCTGTTTTACAATTGCTTTCTATT
TGGTAGCTTTGAAATTAATTTAGTTGCTTATCAGAGAGAATAATGTTGAG
GTTAGACTAACCTTAAATTGGTAAGGCTTTGCTGAGCAAACCTGATAACTG
TAAGTCTTTTATAGGGTGCATTACTGCCACATATACGTTCTTCCATAGGT
GGTT

>PTEN-PCR07 (SEQ ID NO: 56)

TGGTCCATGTCTAGGTTGTAGAATTGAATTGTGCATTTTGGCATCTGAGC
ACAGCTGAGTTTTCTAAATCAATCTCTCTCCTTGCACCTAGTTTTTGCTT
TAGATCACTACCTAAGACTTACTGTTGATTTAATATTAGAGCACTTAAGC
ATAGCTTTGACTTTTTATTTCTTTGATTTTTGTAGATTTTCAGGCTGAAG
TACAATAAGGTTCTC

5 >PTEN-PCR08 (SEQ ID NO: 57)

AAATTCCTCTCTTTGTGAGACTTCTTTTTGAGTATTCTGGTTACTCTAA
ACTGATTGGAGATGAAATTAGATAGAATTGAAAACGTACTTTTAAAATG
AAATTTTGGGGATGTCATTAAGCTTGATTTTTTTAGGTTTTTTTTTTAGTG
TGTATTATAAATTATTTTACACTGATTGTCAGCGATAAAAATGGAATGCCT

10 >PTEN-PCR09 (SEQ ID NO: 58)

AAAATCAGTACCTTTGCCCCAGGTGTGATATTTAAGAAGGTCAACTTAC
TAAATCAGTGATGGAGTTAGTCCTAACATCTGGGTGTTCTGACTGCTGCT
AGGCCAGTATTCTTTATATGATAATAAGAACTTTGTCCACAGAAGATATC
CCTAATAACAAAAAAGTTTTATTTGAAGAGGACTCATGTGTTCTTTGGCT
GATTGTGAAAGTGTTGCT

>PTEN-PCR10 (SEQ ID NO: 59)

AGTTGTTGAACTGTTGGGAGTTACTTTTCTCTTACTATTTTGTATTTTAA
TGTATTCTTTGACCTTATGCTTTTTTTATTCTAAAGCTGCTTTTATTATAG
TCAGATATGATGAAGTTAAATGTACAATGTAAAATTGCAAATTTCCAACG
AGCTATACAACTTAAATATTTCTAAGTAAAGAAAATAGGGCTGACTCTA
AGTTTCTTTG

15 >PTEN-PCR11 (SEQ ID NO: 60)

TAGGTTAGCCCAGAGATGGGAAGATGCCAAGAAGGTAGCTTTAGTGGATT
CTGAATTTTTTGGTTTTGTTTTGTTTTTAGGGCAGGCAAATGTAATTACA
AAAGGGTTCTAGGAATAGATTGCTGTGATTTTTTTTTCTGTTTGCATGATT
TTACAGTTTGCTTTGCCTCTCACTTTTGAATGCAGAATAAAAATGTCAAGG
CC

20 >PTEN-PCR12 (SEQ ID NO: 61)

TGCACTTTGTCGTTGCCTTAATTAAATGGTGAATCATCAGAAATATTTA
TTTTCTATACTTATACATTTATTAAGCTTGTTTCCATTTTTTTATTTTG
TGATTTTTTAAAGTGGATTTAAGATAACCTAAACATTAGAGAGGATTTTCA
TGGTTTTGATTCATGAAATCATAATGTTATACAAACCTAACTGAAGTGTT
AGAGCC

25

>PTEN-PCR13 (SEQ ID NO: 62)

TGGCTGAGAACTAAAGATTGTGTAATAAACGCCTGGCCTTCAGTCATTTG
GTTTTTTTTTTCCCTCGATTGTTTGGATAGTTAACTGGACATCATGTTTT
AACTTGAGAAATTAAGTTATAACAAGATTTTGATATTTTAACTAGTTTTT
CTAACTGGTTGAGATATATAAGAATTTAGTATTACAGGACTCAATCAGGG
AACTG

5 >PTEN-PCR14 (SEQ ID NO: 63)

GGTGAGAACTGAATTGGAGGCTATGAAAAAATACCTTTTGGGCCTTTCT
GAATAGACATATATACATAAATTATATCTCTTACATTAAGTGAGGCACAT
ATGTAGGTGAGATTTTACCTGAATATTTAAAAGTTTAAAAGTCGTTACCT
ATTCTGTTTACTTAATAGTATTTAAAGGGTGTGAGAGGTGTTATGTGTTT
CTGTCCCT

10 >PTEN-PCR15 (SEQ ID NO: 64)

GGTTAATCACCTCTGGCAAATAAATGATAAAAGCATAGCTTTTGTAAGC
AGAATGATATTACAGAAGTTAACTTATAAATCTAAGTGATTTAAAGACAC
TTAGGAAATTTATGATAATGCTGGGTGAGCATTACAGTTTTAACTTTTTA
CAGTTTTTCATATGCTTTTTTTGTGATTTTGCTGTAGAAAATTAACAGTT
GGCATTGGCTTAGTT

>PTEN-PCR16 (SEQ ID NO: 65)

15 TGTTGCCAAATGAACGAGTTTGTAGTATTGCTAACAAGGAGAAGAATTAC
TAGCAAGTCTTGATGTTACTTTTGAAGAGTGTGATGATTGCATTTAGGAA
GATATCTAACTTCTGTTTCAAAGCAAAAAGTATGTGCAAATTTCTTACT
CATGACAAATTCATATAATATAAAAACATGAAAGTTGTGAGGTCAGGTTG
TTTGGA

>PTEN-PCR17 (SEQ ID NO: 66)

20 TGCTCACAAGAACCCTAACTGTGTGTTACTTGAAAGCACTGATGGAAATC
AGGGAAAAGCTCCAGAAGTTCCTACGAAATAAAATTAATGATAAAGTC
CTGGTATCTGCTAACTTGCCCTCCATTCCTGTTATCTTTTCTTCTTAGTC
TGACTTCATTAATTTCTTCCACCTGGCTACTGGTTTAGCTCAGTGTTTTA
TGAGCCAGGCAG

ES 2 606 012 T3

>PTEN-PCR18 (SEQ ID NO: 67)

AGGAAGGTGAGAATCTGAAGAAAATGAAACCTTAAAAAGATTGAATTCCT
GGACTCCATTTAAAGGAGTAAATAGCTCACGAACAAGACTTGCTGCTCTG
CAAAGTCTTCCATGTTGATCCTGGTCTTTGACTCCTTATCTGTCTGATTA
AATTGAATTCGCTGCCGTGGCATCCTTAAAGCTGGACCTTACTTTGTCAG
TCCTGCCT

5 >PTEN-PCR19 (SEQ ID NO: 68)

AGTGCAGTAAAAGTGCAGTGTCCAAATAGCCCTTGTAACAAAACCTTTCT
CTTTCTCCTGGGTGCCAATTTGACATTTAATCAGTTTTGTTTCTAGCAGT
GTTCAATTTATTAGATTATAAGTCTTTTTTTTTCTTTATATTATTCTAAGA
TCAAAAATATATAAAGATATACACAGGAGTCCTGCTGCTACCTGTTCTTG

10 >PTEN-PCR20 (SEQ ID NO: 69)

CTTGTCTTTTCAGGCAGGTGTCAATTTTGGGGTTTTGTTTTGATTTTTGG
TTTTTGACATAAAGTACTTTAGTTCTGTGATGTATAAACCGTGAGTTTCT
GTTTTTCTCATATACCTGAATACTGTCCATGTGGAAGTTACCTTTTATCT
TTACCAGTATTAACACATAAATGGTTATACATAAATACATTGACCACCTT
TTATTACTCCAGCT

>PTEN-PCR21 (SEQ ID NO: 70)

TGATGGGAACAGCAGGTTGATATAGCTTGTGATAACACTTCTAAAGAAAA
AGCAATGAGCCATAGAAAAAAGAAAAAGATACATTTTGAATTAAGGAAGA
TGGTGAATCTGGGAAGTGAGCAGTACAGTCACCAGACGTGTATCCTCTCC
TATGGTACAGAAGTGTATTATTGGGTCTCTTTATGGCCTGCATGATATATC
CCACAAGATGACCTACTTCA

15 >PTEN-PCR22 (SEQ ID NO: 71)

ACCTTTATGCCTCTGAAGGAAAAGATTTATACATTCAGCTTGTAATTAGT
AATCAAGACTGAGGTTTAGTCTATCTAGCTTCACAATCTATCTAGTTTGT
TTTGTCTAGCCATATGATTTCTTCAAATATGCCATTTCTTAAAAAAAAT
GTTTTATGTATCCCGATTAATATTTAGCCAGTGGTTCTTTTAGCCGATGG
ATCTTGTACCTCTT

20 >PTEN-PCR23 (SEQ ID NO: 72)

TTTTGATTGGGGGATAATTGGCCAATAAAGCTTTGATAGCCTCTATTGCC
CAGGCCCTCCTCTTCTTTTATGAGAGAAAGGATGAACAGTGACCAGAAA
TAAAGGTATTGTTTTTTCTATCAACTAAAATGGAAATAAATAATTCCTA
AGTAATTTGCCTGTTAGGATTAAGTCTCCAAGAGAATGGCTGTGCCTAG
TACCTAAGTG

25

ES 2 606 012 T3

>PTEN-PCR24 (SEQ ID NO: 73)

ACTTCTCCTTTTGAGGTTACCGCCTACGATTGGGAATTAATGTAAAAAAT
AAGCCAAAAGAAAGTGAGGGAAAAGTGAACCAAGCTGTAATTTTTTTACT
CTTTTTTATTGTTGTTGTTATTGTTGCTGTTTTTTACTATCTTGATTGCA
ACAGTTTGGCTTATATATATATAGCATTGGAATTGACAGTAAGAAAGCCAC

5 >PTEN-PCR25 (SEQ ID NO: 74)

TGCTTTTCCTTCCCTAATCCCTCAGGGGTGGGATAGAGAGCACAGTGGCC
TCCCAGGGAGGTAGAAGCTGCTCCAGACTAACAATCAGAGCTGCCAGTTC
TTAATCCCAAGACCGCCAGACTTCACAAAGACATAACCGAGGTCTGTGCT
GTCAGTGCCCCACTACTACACTCCCTTAAGTAGCCCCACATTCTGTGCT
TGTTT

10 >PTEN-PCR26 (SEQ ID NO: 75)

GATATTTTGCAGCATGTGAAGCTTTTTTAAAAAGTTAGGCTTATTGAAGTA
TAATTTACACACAAAGTACAAAAAAGACTGTGTTCTCAAATCTGT
GAGTCATTAATGGGTTTAGATGTTTATATATTGAAATTATTGGAAGTAAG
GTATGTTTATATTAGAAAGATTTGTAGTCTAGATTATCCAAGTTTTGGGA
GTATTACCTCTCTGCT

>PTEN-PCR27 (SEQ ID NO: 76)

TTTTCCGCCTTCCATTGTGTCAGACTTATAAGGCAATCAGCCAACCTGTG
GGCATGAAATCCTTGGGAGGAAAGAGAAGGAAGTGGGAGGGGCAGCCATG
GTGAATGTTTCCCTAAGTTATAGTCAAGTTCCTTGAGAGAACATAACCTC
ATCCCCTTTTTAACTGTTGTAATACTTTCTTTTAAATAGATTGTTTATT
CTCCTGCAAGTCTCACAGTT

15 >PTEN-PCR28 (SEQ ID NO: 77)

AATCTCTGACTCTCCTGTACCTTGTCTCCTCACTAGGATTCGGTATCCACGG
CAAAAAGATCTATTAATAGTTGGTATCAGGCCTGTACATGTGTTAAGAGA
AAGATGAGGAAAGAAGTATCTGCTTCTAATCTCTTGAAATTATCTCCAAA
TTGAAATGGTATTTTGGTTGCCTAACAGCCTGAAGATGACAAATATCCCC

20 >PTEN-PCR29 (SEQ ID NO: 78)

GGTTCCTTTGTTAAAGCAGGCATTTTTTCAGATTTGTCTTTTGTCTTAGG
GCATGGTTTTTAACTTCAAGGTTGCCCTTCCAATGTCTCAGCTAAGTAT
CTGGGGTGTTCATGAGGTCTCTTCCACTTTGCCTAGGCCAGAACTCCAG
CTTCTCCAGTATTATATTTGTTACCTCTGGCGTCATCTCCGTTATGCT
TTCAGATCCTGC

25

>PTEN-PCR30 (SEQ ID NO: 79)

TGTTGGCACAGATTCATGTTACTTGATCTGCTTTAAATGACTTGGCATCT
AGCCCATATTTGAGCCATAACCGTGTGGTAATTTGAAGTGTAAATCACA
GTAGAGCTTCTGTAAAGCACTAATAGCATCTTCCATGGAGGTATACTTC
AGAGTGAATATAATTTTGTATTATCCTGTGTCTCTAGAGCTATTGACTGAA
AAAGCTG

5 >PTEN-PCR31 (SEQ ID NO: 80)

AGAGTTTTAAGGACTGCCACCTGATTGATAGAGCTAGTTGACCTTATCT
TTAACTTTTTGTCTTTTCTTTGACTTTGGGAGTAGAGATGTGAAAAGGTA
AAAAGGAAGGAAGGAAGAGAAAACCTTAACTCTTTTGGCCATGAAGACTG
TTTTTCCTTCTCAAAATATTGACTATTTTCTGATTTGTAAAAATCGGCAC
ATAAAACGTGT

10 >PTEN-PCR32 (SEQ ID NO: 81)

AGGGGTCTTTCTCTTTTCTGATAAACCTCTCCTACAAAGAGCCTTGTTG
CGGATACCATAGTGTTTCTTTGGAGGAAAATAAAAACTACAAAGCTTTGT
ATTTTTTGCACAACCTGGATTGAGAATATAAGTAATAAAAAAGGACAAGAA
CTTTCAAAAGCTAGAAGCCATTAACTGAGTCACTTCAGGGTTAGACTAT
CAGAACTGGG

>PTEN-PCR33 (SEQ ID NO: 82)

15 AGGACACCAAAGACAAATTCGGCCTTTTTCAAATTTTATTCTAGTTTAA
CATATTCAAAGAAAGGGAAGGAAATCTTTTCATTCTGTGTAGTGAC
TTCCTGCTTTAAGAACTTAGGACTTCAGCTGTACTATCAGTATTGTAGGC
CACTTAACATTATTATGGTTAAAGTTGGCATTGGAGAGAGCCTAGGAACC
TAACTGCCTGTTTGTT

>PTEN-PCR34 (SEQ ID NO: 83)

20 GACCATCCACTGTTTATGCCAATATTCCTTTACGTTTTGCTTTTTTGCT
TGTTTCGTTTTAACCTCTCCAAATTTACTGACTTCAGAAGTTTCTAGAAC
TAAGTTATAGCATGTTTTGAGTTCTAATGTCACCTTCCGATCTTCTTTAC
CTTTTTTCTACCTCTGTTTGTATTTCTGGTTCTGGTTAAGTGAGTCTGGT

AAGCAGCAG

>PTEN-PCR35 (SEQ ID NO: 84)

GAGACTTATCACTACCAAACCACAAAGAATTTAAAAGAAACTGTCAGTAG
GTATAGGTGGAAGGAGGGCATTTATCAGAGATTTTAATTTAAGAAGAAAG
TCTTCATCCTTATCCTACCAACCCCATTCCTGAGCATATTTATCATTA
CTAGTCCAGCATATTTGCTCCATATTTCTATGCTTACCTGTGAAGAT

ES 2 606 012 T3

>PTEN-PCR36 (SEQ ID NO: 85)

CATTACTTCCACTTTTCCGTCCATATAGTCCTCTTAACAGTAATATTTGAG
AGGCATTTTTATTAAAGCAGTCTTAAGGAGTGTTTCGTCAAACCACATGTT
CTGGGATCCTGAGAAAGTAGGGGAAGTTTAGAGAACTGAAGCTGCACAAA
ACTAATGTTTTATTTTCTGTTGTGTTGTCCTGAGACCAGCTTCTTAGATTG
TGT

5 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ventana Medical Systems, Inc.
Farrell, Michael
Jiang, Zeyu
10 Day, William A. Jr.
- <120> Sondas Polytag
- <130> VENTA-31371/WO-1/ORD
- 15 <150> US 61/308.670
<151> 26-02-2010
- <160> 85
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 40
25 <212> ARN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Sintética
- 30 <400> 1
caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu 40
- <210> 2
35 <211> 48
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
- <220>
40 <223> Sintética
- <400> 2
agaacaagaa uacuaccguc augcacuuga uccggcacgg ucacuagu 48
- <210> 3
45 <211> 47
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
- <220>
50 <223> Sintética
- <400> 3
uuacaccuca ccgacaauag aagaucgucc uggcacugaa cuugccu 47
- 55 <210> 4
<211> 39
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 606 012 T3

	<220> <223> Sintética		
5	<400> 4 uccgcaguaa cgcuaaau cg cuccagacga cacccaugg	39	
10	<210> 5 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Sintética <400> 5		
	ugcgcaagaa ctcattggcta acggacaccg caauacaauug auaccugucg ccuucgcgua		60
	ugcau		65
20	<210> 6 <211> 104 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Sintética <400> 6		
	cacagaacua aacagaagca uucucagaac ccucuuucgug auguuugcau ucaacucaca		60
30	gugccaucag caggacgcac ugaccaccau gaaggugcuc uucu		104
35	<210> 7 <211> 120 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Sintética <400> 7		
	ugggcauggg ucagaaggau uccuaugugg ggcacgaggc ccagagcaag agaggcaucc		60
	ucaccugaa guacccauc caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu		120
45	<210> 8 <211> 120 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Sintética <400> 8		
	gagcacggca ucguaccaa cugggacgac auggagaaaa ucuggcacca cacuuucua		60
	aaugagcugc guguggcucc caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu		120
55			

ES 2 606 012 T3

5	<210> 9 <211> 122 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sintética		
10	<400> 9		
	cgaggagcac cccgugcugc tugaccgagg cccccctuga accccaagge caaccgcgag	60	
	aagaugaccc agaucatguu ugcaucagca ggacgcacug accaccauga aggugcucuu	120	
	cu	122	
15	<210> 10 <211> 120 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sintética		
20	<400> 10		
	agaccucaa caccagcc auguacguug cuauccagge ugugcuaucc cuguacgccu	60	
	cuggccguac cacuggcauc caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu	120	
25	<210> 11 <211> 120 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Sintética		
	<400> 11		
	gugauggacu ccggugacgg ggucaccac acugugcca ucuacgaggg guaugccuc	60	
35	ccccaugcca uccugcgucu caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu	120	
40	<210> 12 <211> 120 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sintética		
45	<400> 12		
	ggaccuggcu ggccgggacc ugacugacua ccucaugaag auccucaccg agcgcggcua	60	
	cagcuucacc accacggccg caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu	120	
50	<210> 13 <211> 121 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220>		

ES 2 606 012 T3

	<223> Sintética	
	<400> 13	
	agcgggaaau cgugcgugac auuaaggaga agcugugcua cgucgcocctu ggacuucgag	60
	caagagaugg ccacggcugc ucaucagcag gacgcacuga ccaccaugaa ggugcucuuc	120
5	u	121
	<210> 14	
	<211> 120	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
15	<400> 14	
	uccagcuccu ccuggagaa gagcuacgag cugcctgacg gccaggucan caccauuggc	60
	aaugagcggg uccgcugccc caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu	120
	<210> 15	
20	<211> 120	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Sintética	
	<400> 15	
	ugaggcacuc uuccagccuu ccuuccuggg cauggagucc uguggcaucc acgaaacuac	60
30	cuucaacucc aucaugaagu caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu	120
	<210> 16	
	<211> 121	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
40	<400> 16	
	gugacgugga cauccgcaaa gaccuguaog ccaacacagu gcugtucugg cggcaccacc	60
	auguaccug gcauugccga ccaucagcag gacgcacuga ccaccaugaa ggugcucuuc	120
	u	121
	<210> 17	
	<211> 120	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
50	<400> 17	

ES 2 606 012 T3

	aggauhcaga aggagaucau ugcccuggca cccagcaca ugaagauca gaucauugcu	60
	ccuccugagc gcaaguacuc caucagcagg acgcacugac caccaugaag gugcucuucu	120
5	<210> 18 <211> 122 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética <400> 18	
	cguguggauc ggcggcuca uccuggccuc gcuuguccac cuuccagcag auguggauca	60
	gcaagcagga guuaugacga gucaucagca ggacgcacug accaccauga aggugcucu	120
	cu	122
15	<210> 19 <211> 128 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética <400> 19	
	cggaacugag gccaugaua agagggacgg cccggggcau ucguauugcg cccguagagg	60
	ugaaaauucu ggaccggcgc agaacaaga uacuaccguc augcauuga uccggcacgg	120
25	ucacuagu	128
30	<210> 20 <211> 127 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética <400> 20	
	cggaacugag gccaugaua agagggacgg cccggggcau ucguauugcg cccguagagg	60
	ugaaaauucu ggaccggcgc uuacaccuca cgcacaauag aagaucgucc uggcacugaa	120
	cuugccu	127
40	<210> 21 <211> 145 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética <400> 21	

	cggaacugag gccaugauua agagggacgg ccgggggcau ucguauugcg ccgcuagagg	60
	ugaaaauucu ggaccggcgc ugcgcaagaa ctcatggcta acggacaccg caauacaaug	120
	auaccugucg ccuucgguua ugcau 145	
5	<210> 22 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
20	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
25	<220> <221> misc_feature <222> (15)..(15) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
30	<220> <221> misc_feature <222> (22)..(22) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
35	<220> <221> misc_feature <222> (29)..(29) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
	<400> 22	
	ntattttnta ttttntattt tntattttnt agaagagcac ctcatgggtg gtcagtgcgt	60
40	cctgctgatg	70
45	<210> 23 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
60	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno	
60	<220> <221> misc_feature <222> (15)..(15)	

<223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <400> 23
ntattttnta ttttntattt tntattttnt attttntatt ttntattttt tattttntat 60
 40 **ttntagaag agcaccttca tgggtggtcag tgcgctcctgc tgatg 105**
 <210> 24
 <211> 140
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (71)..(71)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (85)..(85)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60

<400> 24

ntattttnta tttntattt tntattttnt attttntatt ttntattttt tattttntat 60
ttntattttt ntattttnta tttntattt tntattttnt agaagagcac cttcatggtg 120
gtcagtgcgt cctgctgatg 140

- 5 <210> 25
- <211> 77
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintética

- 15 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (8)..(8)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- 25 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (15)..(15)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- 30 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (22)..(22)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (29)..(29)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- <400> 25

ntattttnta tttntattt tntattttna ctagtgaccg tgccggatca agtgcgatgac 60
ggtagtattc ttgttct 77

- 40 <210> 26
- <211> 112
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 45 <220>
- <223> Sintética

- 50 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- 55 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (8)..(8)
- <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

- <220>

<221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

40 <400> 26

ntatntntnta tttntntattt tntatntntt atttntntatt ttntatnttn tattntntat 60

tttnactagt gaccgtgccg gatcaagtgc atgacggtag tattcttggt ct 112

45 <210> 27
 <211> 147
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintética

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60 <220>
 <221> misc_feature

<222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (71)..(71)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (85)..(85)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <400> 27
 65

ntatntntnta tntntntatnt tntatntntnt atntntntatnt tntntatntntn tntntntntat 60
tntntatntnt ntatntntnta tntntntatnt tntatntntna ctagtgcacog tgcocggatca 120
agtgcacatgac ggtagtattc ttgttct 147

5 <210> 28
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<400> 28

ntatntntnta tntntntatnt tntatntntna ggcaagttca gtgccaggac gatcttctat 60
tgtcgggtgag gtgtaa 76

40 <210> 29
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature

<222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

40 <400> 29
ntatntntnta tttntntattt tntatntntt atttntntatt ttntatntntn tattntntat 60
tttnaggcaa gttcagtgcc aggacgatct tctattgtcgc gtgaggtgta a 111

45 <210> 30
 <211> 146
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintética

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (71)..(71)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (85)..(85)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<400> 30

ntattttnta tttntattt tntattttnt atttntatt ttntattttt tattttntat 60
ttntattttt ntattttnta tttntattt tntattttna ggcaagttca gtgccaggac 120
gatcttctat tgcggtgag gtgtaa 146

5 <210> 31
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<400> 31

ntattttnta tttntattt tntattttnc catgggtgtc gtctggagcg attaagcgtt 60

actgcgga 68

40 <210> 32
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>

<221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25

<220>
 <221> misc_feature

 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

40

<400> 32

ntattttnta tttntattt tntattttnt atttntatt ttntattttt tattttntat 60
tttnccatgg gtgtcgtctg gagcgattaa gcgttactgc gga 103

45

<210> 33
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Sintética

 <220>
 <221> misc_feature

55

<222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (71)..(71)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (85)..(85)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

 <400> 33
 65

ntattttnta tttntattt tntattttnt atttntatt ttntattttt tattttntat 60
ttntattttt ntattttnta tttntattt tntattttnc catgggtgtc gtctggagcg 120
attaagcgtt actgcgga 138

5 <210> 34
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<400> 34

ntattttnta tttntattt tntattttnc gaaggcgaca ggtatcattg tattgcggtg 60
tccgtagcc atgagtt 77

40 <210> 35
 <211> 112
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 5 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 10 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 15 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 20 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 25 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 30 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 35 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<400> 35

ntattttnta ttttntattt tntattttnt attttntatt ttntatttttn tattttntat 60

tttncgaagg cgacaggtat cattgtattg cgggtgtccgt tagccatgag tt 112

40

<210> 36
 <211> 147
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Sintética

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (71)..(71)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (85)..(85)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

60

<400> 36

ES 2 606 012 T3

	ntattttnta tttntattt tntattttnt atttntatt ttntattttt tattttntat	60
	ttntattttt ntattttnta tttntattt tntattttnc gaaggcgaca ggtatcattg	120
	tattgcggtg tccgtagcc atgagtt	147
5	<210> 37 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 37 agaagtatcg ttccgatcta acgcg 25	
15	<210> 38 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 38 acgctattac gattacgacg tgcga 25	
25	<210> 39 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 39 tacgatcgca tcgagtcgca gatat 25	
40	<210> 40 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
	<400> 40 cgcacgcata gtagtcgga tatac 25	
50	<210> 41 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética	
	<400> 41 ctagctccga tccgtgataa cgtgc 25	
	<210> 42 <211> 25	

ES 2 606 012 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 42		
	atgttacgac cggcgatctt atacg	25	
10	<210> 43		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 43		
	gtacatcctc cggttgcgaa tatagcgaac	30	
20	<210> 44		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 44		
30	ctagatctct cgagacatgc	20	
	<210> 45		
	<211> 25		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
40	<400> 45		
	ttctagatct ctcgagacat gcaca	25	
	<210> 46		
	<211> 150		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
50	<400> 46		
	tccgtgataa cgtgcgatat ctagctccga tccgtgataa cgtgcgatat ctagctcaag	60	
	tccgtgataa cgtgcgatat ctagctccac tccgtgataa cgtgcgatat ctagctcgac	120	
	tccgtgataa cgtgcgatat ctagctcctg	150	
55	<210> 47		
	<211> 127		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		

	<223> Sintética
	<220>
5	<221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
10	<221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
15	<221> misc_feature <222> (15)..(15) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
20	<221> misc_feature <222> (22)..(22) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
25	<221> misc_feature <222> (29)..(29) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
30	<221> misc_feature <222> (36)..(36) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
35	<221> misc_feature <222> (43)..(43) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
40	<221> misc_feature <222> (50)..(50) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
45	<221> misc_feature <222> (57)..(57) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
50	<221> misc_feature <222> (64)..(64) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
55	<221> misc_feature <222> (71)..(71) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
60	<221> misc_feature <222> (78)..(78) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno
	<220>
65	<221> misc_feature <222> (85)..(85) <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

ES 2 606 012 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 5 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 10 <223> n es un resto abásico que contiene un hapteno

<400> 47
ntattttnta ttttntattt tntattttnt attttntatt ttntatttttnt tattttntat 60
tttntatttt ntattttnta ttttntattt tntattttnt gagctagata tcgcacgta 120
tcacgga 127

15 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 48
 25 tgctgcagg tcgacaggag ctacg 24

<210> 49
 <211> 80
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 49
 35 accgtctga ttaccgagag tgcgctgaac cggaatgtac gatcaattag gcgctgctcg 60
 atcgtagatt actaactgct 80

<210> 50
 <211> 206
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 50
 45 **ggctgctcct ctttaccttt ctgtcactct cttagaacgt gggagtagac ggatgcgaaa 60**
atgtccgtag tttgggtgac tataacattt aacctggtc aggttgctag gtcatatatt 120
ttgtgtttcc tttctgtgta ttcaacctag ggtgtgtttg gctagacgga actcttgctt 180
ggttgcaagt gtcaagccac cgattg 206

<210> 51
 <211> 217
 50

ES 2 606 012 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Sintética		
	<400> 51		
	attgctgctc accgttttta ggtttcaggt cctctgacac cttttggtat cgtaatttt		60
	actgatttgt gtagaatgtc agttgtattt taccagctaa tatctagaaa tgctggcaag		120
	aggggtttac tccagcttta gattgtaggt atgtagctt tttcataca gtgtattaaa		180
10	tttactgagt cagcttgctg aataagacag aagccca		217
	<210> 52		
	<211> 202		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
20	<400> 52		
	gggcttcaaa agttagtggt catcgaaaag cattaatctt tgcagtttca ggtacaacac		60
	attggttttg attagggatg gggatggggc cctctttttg cagaatgggg aaagtattga		120
	caggaattga gagctattgg taggccagtg tataaggtat gtgaaaacag aattaagtta		180
	ttggtctgaa gtgactgaag ca		202
	<210> 53		
	<211> 202		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
30	<400> 53		
	agcgtatggt ggtctctaca catgaaattt gtgtgactta aaactttctc taaaactgta		60
	cttttagtta tgatatgcat agaaagcagt atcaaatatt gcgtcaaag actaataaca		120
	cttaatttct agagttgtgg ttttattgag ccaaaagttg atatgaaaaa aagtcagtaa		180
	ggaaagtcag tgaagtgctt gc		202
35	<210> 54		
	<211> 217		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 54		

ES 2 606 012 T3

	ttgctgccag tgtaaaagtt tgcacagcag tatagtcac	aatgcagatt tacattgctt	60
	ataatatact aagtaaatac taaatgatta aagataataa aatatggtga ggtataacca		120
	ccttcatttt aaacttagtt ttagaagata gtaagaaag attcctttat taccttttta		180
	gaattttatt ttaataaca tgggaaaggc aactggt		217
5	<210> 55 <211> 204 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sintética		
	<400> 55		
	aatttgtgag actggggtca gtcagttctg tttacaatt gctttctatt tggtagcttt		60
	gaaattaatt tagttgctta tcagagagaa taatggtgag gttagactaa ccttaaattg		120
	gtaaggcttt gctgagcaaa ctgataactg taagtctttt atagggtgca ttactgccac		180
	atatacgttc ttccataggt ggtt		204
15	<210> 56 <211> 215 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Sintética		
	<400> 56		
	tggtccatgt ctaggttgta gaattgaatt gtgcattttg gcactctgagc acagctgagt		60
	tttctaaatc aatctctctc cttgcaccta gtttttgctt tagatcacta cctaagactt		120
	actgttgatt taatattaga gcacttaagc atagctttga cttttatttc ctttgatttt		180
25	tgtagatttt caggctgaag tacaataaggt ttctc		215
30	<210> 57 <211> 200 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Sintética		
	<400> 57		
	aaattccctc tctttgtgag acttcttttt gagtattctg gttactctaa actgattgga		60
	gatgaaatta gatagaattg aaaactgtac ttttaaatg aaattttggg gatgtcatta		120
	agcttgattt tttaggtttt ttttttagtg tgtattataa attattttac actgattgtc		180
	agcgataaaa tggaatgcct		200
	<210> 58 <211> 218		

ES 2 606 012 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Sintética		
	<400> 58		
	aaaatcagta cctttgcccc caggtgtgat atttaagaag gtcaacttac taaatcagtg		60
	atggagttag tcctaacatc tgggtgttct gactgctgct aggccagtat tctttatatg		120
	ataataagaa ctttgtccac agaagatata cctaataaca aaaaaggttt atttgaagag		180
10	gactcatgtg ttctttggct gattgtgaaa gtgttgct		218
	<210> 59		
	<211> 210		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
20	<400> 59		
	agttgttgaa ctgttgggag ttacttttct cttactatct tgttatttaa tgtattcttt		60
	gaccttatgc ttttttattc taaagctgct tttattatag tcagatatga tgaagttaaa		120
	tgtacaatgt aaaattgcaa attccaacg agctatacaa acttaaatat ttctaagtaa		180
	agaaaatagg gctgactcta aggttctttg		210
	<210> 60		
	<211> 202		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Sintética		
30	<400> 60		
	taggttagcc cagagatggg aagatgcca gaaggtagct ttagtgatt ctgaattttt		60
	tggttttggt ttgttttag ggcaggcaaa tgtaattaca aaaggttct aggaatagat		120
	tgctgtgatt tttttctgt ttgcatgatt ttacagtttg ctttgctct cacttttgaa		180
	tgcaataa aatgtcaagg cc		202
35	<210> 61		
	<211> 206		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 61		

ES 2 606 012 T3

	tgcactttgt cgttgcccta attaaatggt gaaatcatca gaaatattta ttttcctata	60
	cttatacatt tattaagctt gtttccattt ttttattttg tgatttttta agtggattta	120
	agataaccta aacattagag aggattttca tggttttgat tcatgaaatc ataatgttat	180
	acaaacctaa ctgaagtgtt agagcc	206
5	<210> 62 <211> 205 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 62	
	tggctgagaa ctaaagattg tgtaataaac gcctggcctt cagtcatttg gttttttttt	60
	tcctogatt gtttgatag ttaactggac atcatgtttt aacttgagaa attaagttat	120
	acaagatttt gatattttaa actagttttc ctaactggtt gagatatata agaatttagt	180
	attacaggac tcaatcaggg aactg	205
15	<210> 63 <211> 208 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 63	
	ggtgagaact gaattggagg ctatgaaaa aatacctttt gggcctttct gaatagacat	60
	atatacataa attatatctc ttacattaag tgaggcacat atgtaggtga gatttttacc	120
	tgaatattaa aagtttaaaa gtcgttacct attctgttta cttaatagta tttaaagggt	180
25	gtgagagggt ttatgtgttt ctgtccct	208
30	<210> 64 <211> 216 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
	<400> 64	
	ggttaatcac ctctggcaaa ataaatgata aaagcatagc ttttgtaagc agaatgatat	60
	tacagaagtt aacttataaa tctaagtgtg ttaaagacac ttaggaaatt tatgataatg	120
	ctgggtcagc attacagttt taacttttta cagtttttca tatgcttttt ttgtgatttt	180
	gctgtagaaa attaacagtt ggcatttggc ttagtt	216
40	<210> 65 <211> 206	

ES 2 606 012 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Sintética		
	<400> 65		
	tgttgccaaa tgaacgagtt tgtagtattg ctaacaagga gaagaattac tagcaagtct		60
	tgatgttact tttgaagagt gtgatgattg catttaggaa gatatactaaa cttctgtttc	120	
	aaagcaaaaa gtatgtgcaa atttcttact catgacaaat tcatataata taaaaacatg	180	
10	aaagtttgtga ggtcagggtg tttgga		206
	<210> 66		
	<211> 212		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
20	<400> 66		
	tgctcacaag aaccctaact gtgtgttact tgaaagcact gatggaaatc agggaaaaag		60
	ctccagaagt tcctacgaaa taaaattaaa tgataaagtc ctggtatctg ctaacttgcc	120	
	ttccattcct gttatctttt cttcttagtc tgacttcatt aattctttca ccctggctac	180	
	tggttttagct cagtgtttta tgagccaggc ag		212
	<210> 67		
	<211> 208		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Sintética		
30	<400> 67		
	aggaaggtga gaatctgaag aaaatgaaac cttaaaaaga ttgaattcct ggactccatt		60
	taaaggagta aatagctcac gaacaagact tgctgctctg caaagtcttc catgttgatc	120	
	ctggtctttg actccttacc tgtctgatta aattgaattc gctgcogtgg catcotta	180	
	gctggacctt actttgtcag tcttgcct		208
35	<210> 68		
	<211> 200		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 68		

ES 2 606 012 T3

	agtgcagtaa aagtcagtg tccaaatagc ccttgtaaca aaacctttct ctttotoctg	60
	ggcgccaatt tgacatttaa tcagttttgt ttctagcagt gttcaattta ttagattata	120
	agtctttttt ttctttatat tattctaaga tcaaaaatat ataaagatat acacaggagt	180
	cctgctgcta cctgttcttg	200
5	<210> 69 <211> 214 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 69	
	cttgtctttt caggcaggtg tcaattttgg ggttttggtt tgatttttgg tttttgacat	60
	aaagtacttt agttctgtga tgtataaacc gtgagtttct gtttttctca tatacctgaa	120
	tactgtccat gtggaagtta ctttttatct ttaccagtat taacacataa atggttatac	180
	ataaatacat tgaccacctt ttattactcc agct	214
15	<210> 70 <211> 220 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 70	
	tgatgggaac agcaggttga tatagcttgt gataacactt ctaaagaaaa agcaatgagc	60
	catagaaaaa agaaaaagat acattttgaa ttaaggaaga tgggtaatct ggggaagtgag	120
	cagtacagtc accagacgtg tctcctctcc tatggtacag aagtgtttat tgggtctctt	180
25	tatggcctgc atgatatac ccacaagatg acctacttca	220
30	<210> 71 <211> 215 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
	<400> 71	
	acctttatgc ctctgaagga aaagatttat acattcagct tgtaattagt aatcaagact	60
	gaggtttagt ctatctagct tcacaatcta tctagtttgt tttgtctago catatgattt	120
	cttcaaatat gccatttctt aaaaaaaaaat gttttatgta tcccgattaa tatttagcca	180
	gtggttcttt tagccgatgg atcttgtcac ctctt	215
40	<210> 72 <211> 210	

ES 2 606 012 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Sintética		
	<400> 72		
	ttttgattgg gggataattg gccataaag ctttgatagc ctctattgcc caggccccc	60	
	ctcttctttt atgagagaaa ggatgaacag tgaccagaaa taaaggtatt gtttttttct	120	
	atcactaaa atggaaataa ataattccta agtaatttgc ctgttaggat taaagtctcc	180	
10	aagagaatgg ctgtgcctag tacctaagt	210	
	<210> 73		
	<211> 200		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
20	<400> 73		
	acttctcctt ttgaggttac cgcctacgat tgggaattaa tgtaaaaaat aagccaaaag	60	
	aaagtgaggg aaaagtgaac caagctgtaa tttttttact cttttttatt gttgttgta	120	
	ttgttgctgt tttttactat cttgattgca acagtttggc ttatatatat agcatttggga	180	
	attgacagta agaaagccac	200	
	<210> 74		
	<211> 205		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Sintética		
	<400> 74		
	tgcttttctt tcctaattcc ctcaaggggtg ggatagagag cacagtggcc tccagggag	60	
	gtagaagctg ctccagacta acaatcagag ctgccagttc ttaatcccca agacogocag	120	
	acttcacaaa gacataccga ggtctgtgct gtcagtggcc cactactaca ctcccttaag	180	
35	tagccccaca ttcttgtgct tgttt	205	
	<210> 75		
	<211> 216		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 75		

ES 2 606 012 T3

	gatattttgc agcatgtgaa gctttttaaa aagttaggct tattgaagta taatttacac	60
	acaaagtaca aaaaaaaaaa gactgtgttc tcaaactctgt gagtcattaa tgggtttaga	120
	tgtttatata ttgaaattat tggaagtaag gtatgtttat attagaaaga tttgtagtct	180
	agattatcca agttttggga gtattacctc tctgct	216
5	<210> 76 <211> 220 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 76	
	ttttccgcct ttccattgtg tcagacttat aaggcaatca gccaaactgtg ggcattgaaat	60
	ccttgggagg aaagagaagg aagtgggagg ggcagccatg gtgaatgttt ccctaagtta	120
	tagtcaagtt ctttgagaga acataacctc atcccccttt taaactgttg taataactttc	180
	ttttaaataag attgtttatt ctctgcaag tctcacagtt	220
15	<210> 77 <211> 200 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 77	
	aatctctgac tctcctgtac cttgtcctca ctaggattcg gtatccacgg caaaaagatc	60
	tattaatagt tggatcagg cctgtacatg tgtaagaga aagatgagga aagaagtatc	120
	tgcttctaatt ctcttgaat tatctccaaa ttgaaatggt attttggttg octaacagcc	180
25	tgaagatgac aaatatcccc	200
30	<210> 78 <211> 212 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
	<400> 78	
	ggttctcttt gttaaagcag gcatttttca gatttgtctt ttgtcctagg gcatggtttt	60
	taacttcaag gttgcccttt ccaatgtctc agctaagtat ctgggggtgtt ccatgaggtc	120
	tcttccactt tgcctaggcc agaactccag cttctcccag tattatattt cgttacctct	180
	ggcgtcatct ccgttatgct ttcagatcct gc	212
40	<210> 79 <211> 207	

ES 2 606 012 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 79		
	tgttggcaca gattcatggt acttgatctg ctttaaata ga cttggcatct agoccatatt		60
	tgagccata accgtgtggt aatttgaagt gtaattcaca gtagagcttc tgttaaagca		120
	ctaataagcat cttccatgga ggtatacttc agagtgaata taattttggt tatcctgtgt		180
10	ctctagagct attgactgaa aaagctg		207
15	<210> 80		
	<211> 211		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
20	<400> 80		
	agagttttaa ggactgocca cctgattgat agagctagtt gacottatct ttaacttttt		60
	gtttttcttt tgactttggg agtagagatg tgaaaaggta aaaaggaagg aaggaagaga		120
	aaacttaact ctttttgccc atgaagactg tttttccttc tcaaaatatt gactattttc		180
	tgatttgtaa aaatcggcac ataaaacgtg t		211
25	<210> 81		
	<211> 210		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 81		
	aggggtcttt ctcttttctt gataaacctc tcctacaaag agccttggtg cggataccat		60
	agtgtttctt tggaggaaaa taaaaactac aaagctttgt attttttgca caactggatt		120
	cagaatataa gtaataaaaa aggacaagaa ctttcaaaag ctagaagcca ttaaactgag		180
	tcacttcagg gttagactat cagaactggg		210
35	<210> 82		
	<211> 216		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 82		

ES 2 606 012 T3

	aggacaccaa agacaaattc ggcctttttc aaaattttat tctagtttaa catattcaaa	60
	gaaaggggaag gaaattcttt tcattcctgt gtgtagtgac ttctgtcttt aagaacttag	120
	gacttcagct gtactatcag tattgtaggc cacttaacat tattatggtt aaagttggca	180
	ttggagagag cctaggaacc taactgcctg tttggt	216
5	<210> 83 <211> 209 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 83	
	gaccatccac tgtttatgcc aatattcctt ttacgttttg cttttttgct tgttcgtttt	60
	aacctctcca aattttactg acttcagaag tttctagaac taagttatag catgttttga	120
	gttctaattg cactttcoga tcttctttac cttttttcta cctotgtttg tattttctggt	180
	tctggttaag tgagtctggt aagcagcag	209
15	<210> 84 <211> 200 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 84	
	gagacttato actaccaaac cacaagaat ttaaagaaa ctgtcagtag gtataggtgg	60
	aaggagggca tttatcagag attttaattt aagaagaaag tcttcatcct tatcctacca	120
	accoccatto octgagcata tttatcatta ctagtccag catatttgcct occatatttc	180
25	ctatgcttac ctgtgaagat	200
30	<210> 85 <211> 203 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
	<400> 85	
	cattacttcc actttccgtc catatagtcc tcttaacagt aatatttgag aggcattttt	60
	attaagcag tcttaaggag tgttcgtcaa accacatggt ctgggatcct gagaaagtag	120
	gggaagtta gagaactgaa gctgcacaaa actaatgttt attttctggt gtgttgctct	180
	gagaccagct tcttagattg tgt	203

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una primera secuencia de ácido nucleico diana celular *in situ* en una muestra tisular que comprende:

5 poner en contacto dicha muestra tisular con una primera molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de dicha primera secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte de diana de detección que comprende una pluralidad de primeras secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido de sonda de detección y no complementarias de dicha secuencia de ácido nucleico diana, en condiciones en las que dicha parte de sonda diana de dicha primera molécula de ácido nucleico hibrida directamente con dicha secuencia de ácido nucleico diana celular;

10 poner en contacto dicha primera molécula de ácido nucleico con una pluralidad de segundas moléculas de ácido nucleico comprendiendo cada una, una parte de sonda de detección complementaria de dichas secuencias diana de detección de dicha primera molécula de ácido nucleico y una parte de resto detectable que comprende al menos un primer resto detectable bien 5' o bien 3' de dicha parte de sonda de detección, en el que dicho al menos un primer resto detectable se incorpora en la molécula de ácido nucleico, en condiciones tales que dicha parte de sonda de detección de dicha segunda molécula de ácido nucleico hibride con dichas primeras secuencias diana de detección de dicha primera molécula de ácido nucleico; y

15 detectar dicho al menos un primer resto detectable.

20

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha parte de sonda diana de dicha primera molécula de ácido nucleico y dicha secuencia de ácido nucleico diana y dicha parte de sonda de detección de dicho segundo ácido nucleico y dichas secuencias diana de detección de dicha primera molécula de ácido nucleico tienen puntos de fusión en un intervalo de aproximadamente 10 grados Celsius.

25

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico diana celular se selecciona del grupo que consiste en ADN genómico, ADN nuclear, ARN, ARNm y ácido nucleico citoplasmático.

30 4. El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto la muestra tisular con una tercera molécula de ácido nucleico que comprende una parte de sonda diana que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de una segunda secuencia de ácido nucleico diana celular y una parte diana de detección que comprende una pluralidad de segundas secuencias diana de detección que son complementarias de al menos una secuencia de ácido nucleico de sonda de detección y no complementarias de dicha secuencia de ácido nucleico diana, en condiciones en las que dicha parte de sonda diana de dicha tercera molécula de ácido nucleico hibrida directamente con dicha secuencia de ácido nucleico diana celular;

35 poner en contacto dicha tercera molécula de ácido nucleico con una pluralidad de cuartas moléculas de ácido nucleico que comprenden cada una una parte de sonda de detección complementaria de dichas secuencias diana de detección de dicha tercera molécula de ácido nucleico y una parte de resto detectable que comprende al menos un segundo resto detectable bien 5' o bien 3' de dicha parte de sonda de detección, en el que dicho al menos un segundo resto detectable se incorpora en la molécula de ácido nucleico, en condiciones tales que dicha parte de sonda de detección de dicha cuarta molécula de ácido nucleico hibride con dichas segundas secuencias diana de detección de dicha tercera molécula de ácido nucleico; y

40 detectar dicho al menos un segundo resto detectable.

45

5. El método de la reivindicación 4, en el que dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana celulares son parte de la misma molécula.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dichos primer y segundo restos detectables son iguales.

50

Figura 1

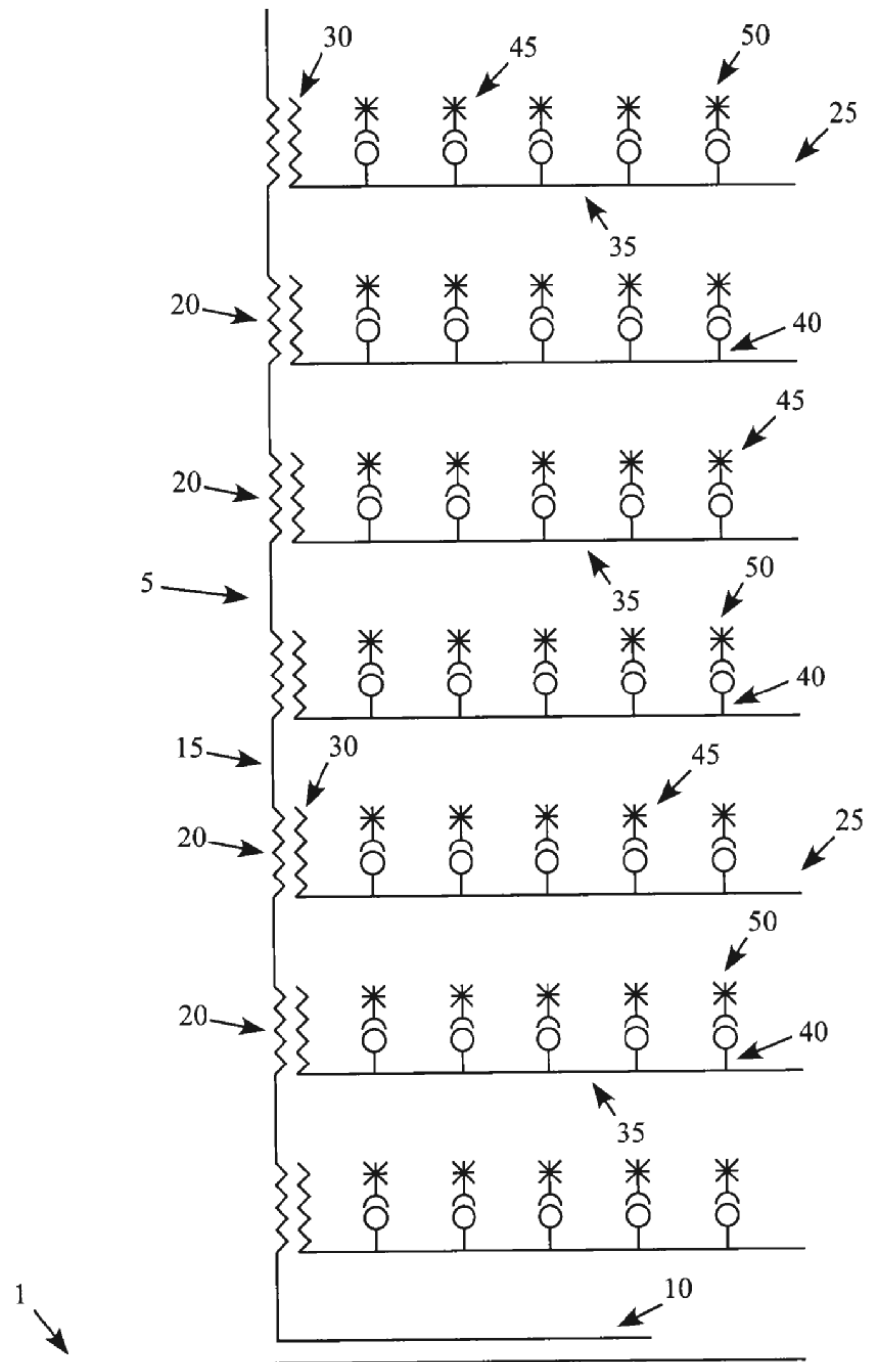


Figura 2

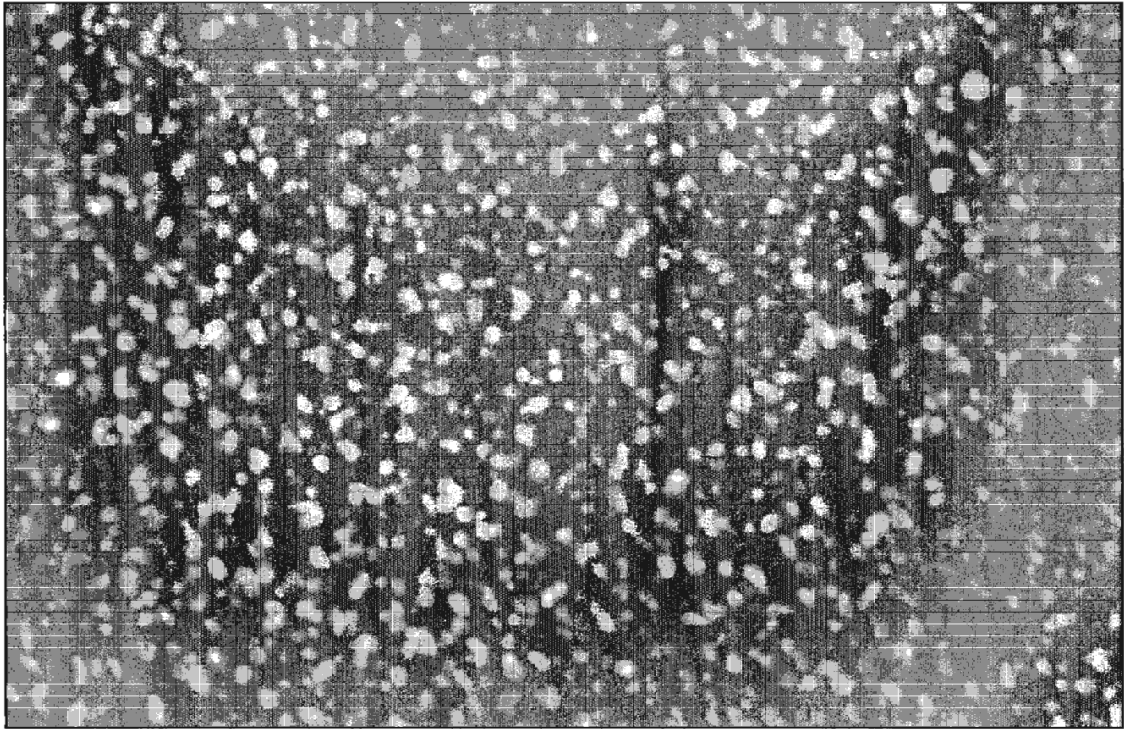
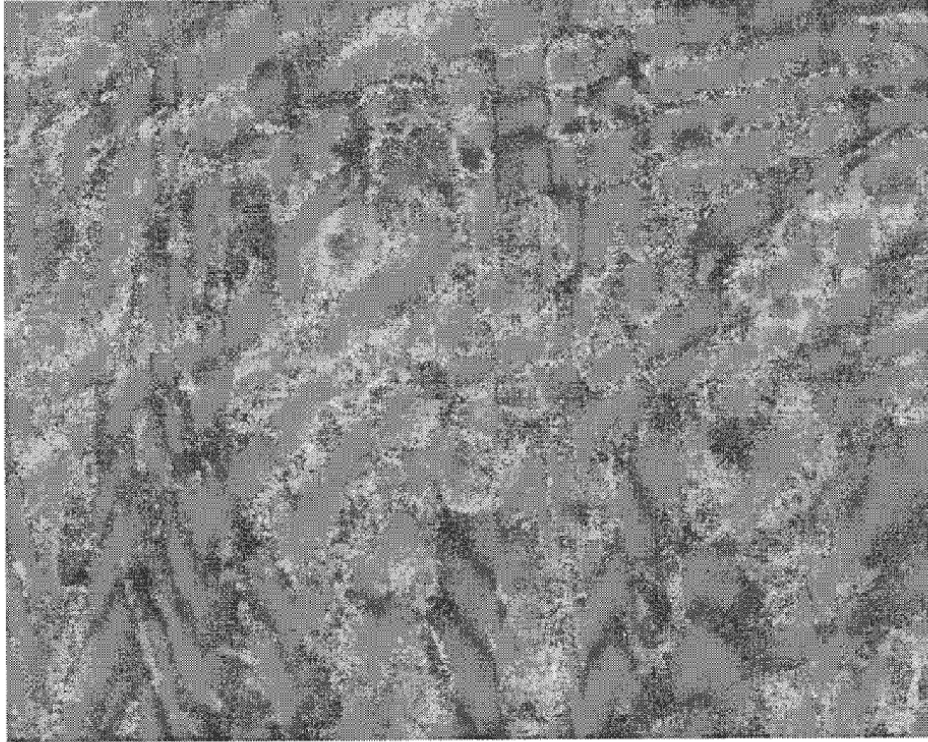


Figura 3

3a



3b



Figura 4

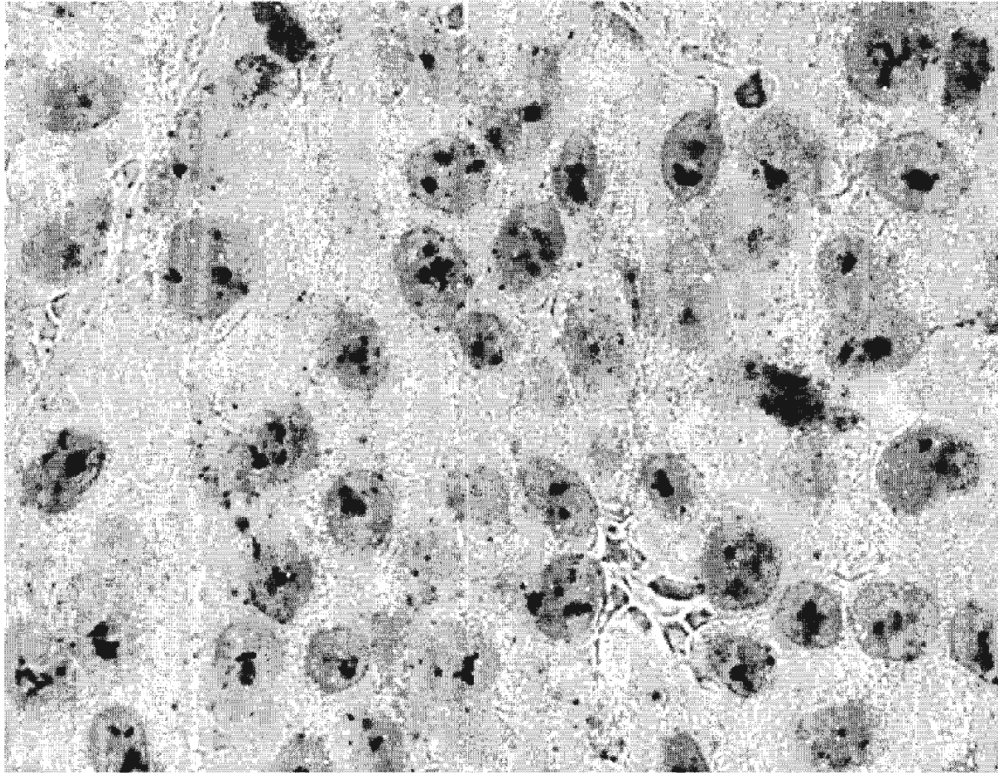
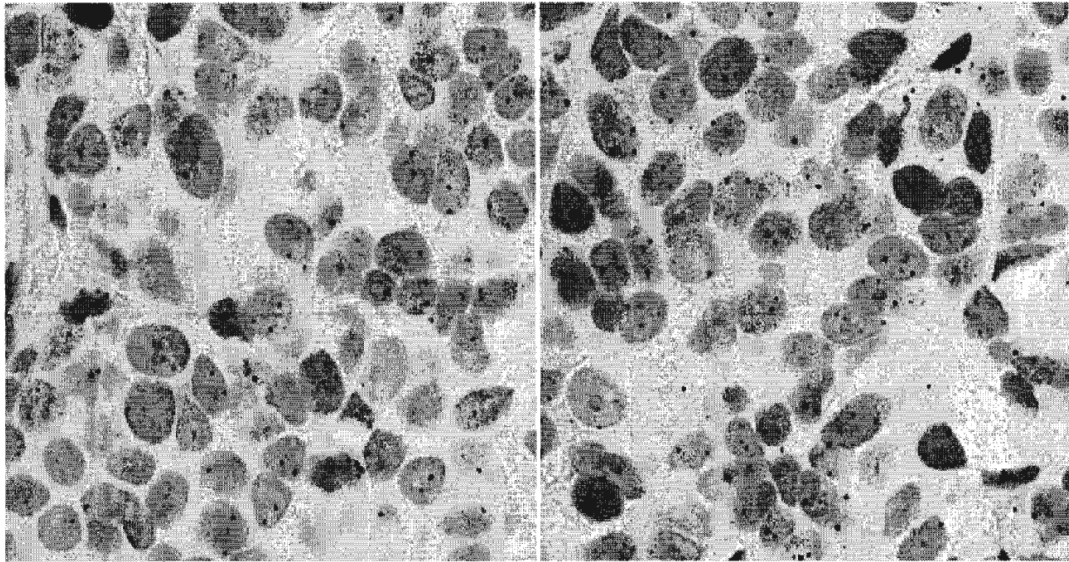


Figura 5



5a

5b

Figura 6

