

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 481**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2009 PCT/IB2009/005893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO2009144581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009 E 09754209 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2285979**

54 Título: **Composiciones de hibridación y métodos**

30 Prioridad:

27.05.2008 US 56089 P
27.02.2009 DK 200900278
27.05.2008 DK 200800727
26.02.2009 US 155683 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HANSEN, CHARLES, M.;
MATTHIESEN, STEEN, HAUGE;
PETERSEN, KENNETH, H. y
POULSEN, TIM, SVENSTRUP

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 613 481 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

Composiciones de hibridación y métodos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones acuosas para su uso en hibridación, por ejemplo, para su uso en hibridación *in situ* (ISH), a métodos para hibridación *in situ* y a usos de dichas composiciones en ensayos de hibridación *in situ*.

10 En una realización, la presente invención se refiere al campo del examen molecular de ADN y ARN. En particular, la invención se refiere a los campos de la citología, la histología y la biología molecular. En un aspecto, la presente invención se refiere a la energía (por ejemplo, tiempo de incubación y calor) requerida durante la hibridación entre ácidos nucleicos, por ejemplo en hibridación *in situ* que selecciona como diana ADN y ARN.

Antecedentes y descripción

La estructura de doble hélice del ADN se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre bases en hebras opuestas cuando las bases se aparean de un modo particular (A+T o G+C). Este apareamiento de bases complementarias (hibridación) es fundamental en todos los procesos que implican ácidos nucleicos.

15 En un ejemplo básico de hibridación, secuencias o fragmentos de ácido nucleico se unen a una secuencia o un fragmento complementario de ácido nucleico. Por ejemplo, la hibridación puede usar sondas de ácido nucleico, diseñadas para unirse, o "hibridarse", con una diana, por ejemplo, ADN o ARN. Un tipo de hibridación, la hibridación *in situ* (ISH), incluye hibridación con una diana en una muestra, en la que la muestra puede estar *in vivo*, o por ejemplo fijada o adherida a un portaobjetos de vidrio. Las sondas pueden marcarse para hacer posible la
20 identificación del híbrido sonda-diana mediante el uso de un microscopio/escáner de fluorescencia o campo brillante. El fragmento o secuencia normalmente es un ácido nucleico de doble hebra o de una sola hebra, tal como un ADN, ARN, o análogos. En algunas realizaciones, el fragmento o secuencia puede ser una sonda que puede marcarse usando marcadores radiactivos tales como ³¹P, ³³P o ³²S, marcadores no radiactivos tales como digoxigenina y biotina, o marcadores fluorescentes. Tales sondas marcadas pueden usarse para detectar anomalías genéticas en
25 una secuencia diana, proporcionando información valiosa acerca de, por ejemplo, trastornos prenatales, cáncer y otras enfermedades genéticas o infecciosas.

La eficacia y exactitud de los ensayos de hibridación de ácido nucleico dependen principalmente de al menos uno de tres factores: a) condiciones de desnaturalización (es decir, separación de, por ejemplo, dos hebras de ácido
30 nucleico), b) condiciones de renaturalización (es decir, reapareamiento de, por ejemplo, dos hebras de ácido nucleico), y c) condiciones de lavado tras la hibridación.

Los experimentos de hibridación tradicionales, tales como ensayos de ISH, usan una disolución que contiene formamida para desnaturalizar ácido nucleico de doble hebra. La formamida es un disolvente que tiene un efecto desestabilizante sobre el estado de hélice de, por ejemplo, ADN, ARN, y análogos, desplazando moléculas
35 hidratadas unidas de manera suelta y de manera uniforme. Además, la formamida estabiliza el estado helicoidal de ADN, ARN, y análogos mediante "formamidación" de los sitios de unión de Watson-Crick de las bases. Sin embargo, la formamida es un material tóxico peligroso, sometido a regulaciones estrictas para su uso y eliminación.

Además, el uso de formamida, aunque aceptado como la técnica convencional para hibridación, está obstaculizado por el largo tiempo requerido para completar la hibridación, dependiendo de las condiciones y de los fragmentos o
40 secuencias de ácido nucleico usados. Por ejemplo, la etapa de desnaturalización va seguida por una etapa de hibridación que lleva mucho más tiempo que, por ejemplo, en un protocolo de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) tradicional lleva 14-24 horas, y puede llevar incluso hasta 72 horas. Se muestran ejemplos de tiempos de hibridación tradicionales en las figuras 1 y 2.

La etapa de reapareamiento (es decir, hibridación) de dos hebras complementarias de cadenas de ácido nucleico es con mucho el aspecto que consume más tiempo de un ensayo que usa hibridación. Hasta ahora se creía que el uso
45 de agentes caotrópicos, tales como formamida, guanidinio, hidrógeno y urea, que interfieren en los sitios de unión de Watson-Crick de bases de ácido nucleico y perturban de ese modo los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias de ácido nucleico, era el único modo de disminuir la temperatura de fusión (T_f) de las cadenas complementarias. Sin embargo, aunque el uso de agentes caotrópicos disminuye la T_f, estos agentes parecen prolongar significativamente el tiempo de hibridación, en comparación con la hibridación en una disolución acuosa
50 sin un agente caotrópico. Adicionalmente, aparte de la desventaja del largo tiempo de procesamiento, el uso de una alta concentración de formamida parece incurrir en la destrucción morfológica de la estructura celular, nuclear y/o cromosómica. Finalmente, la formamida se considera un producto químico tóxico y peligroso para los seres humanos.

55 La presente invención proporciona varias posibles ventajas con respecto a la técnica anterior, tales como tiempos de hibridación más rápidos, menores temperaturas de hibridación y disolventes de hibridación menos tóxicos.

El documento WO 92/07956 describe técnicas de amplificación por PCR mejoradas usando DMSO al 10%. El documento US 2006/0147957 describe métodos para la preparación de muestras para amplificación de muestras de ácido nucleico. El documento WO 01/66804 describe un método para optimizar el rendimiento de hibridación de sondas de polinucleótido en un alineamiento. El documento WO 94/02638 describe ensayos para moléculas diana en células y virus mediante los cuales el uso de eliminadores de radicales libres conduce a autofluorescencia disminuida.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones que dan como resultado al menos una de las siguientes ventajas: procedimientos de hibridación altamente sensibles, técnicamente fáciles, flexibles y fiables, y análisis rápidos. En algunas realizaciones, por ejemplo, una ventaja puede ser la capacidad para adaptar el tiempo de hibridación variando la temperatura de la reacción de hibridación en un grado mucho mayor que el que está disponible usando métodos de la técnica anterior. Por ejemplo, la hibridación puede ser posible a temperatura ambiente.

El contenido de la invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, las composiciones y los métodos de la invención disminuyen la energía necesaria para la hibridación. Las composiciones y los métodos de la invención son aplicables a cualquier técnica de hibridación. Las composiciones y los métodos de la invención también son aplicables a cualquier sistema molecular que se hibrida o se une usando apareamiento de bases, tal como, por ejemplo, ADN, ARN, PNA, LNA, y análogos naturales y sintéticos de los mismos.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar métodos y composiciones de hibridación que conserven la morfología de una muestra biológica. Otro objeto de la invención es proporcionar una composición y un procedimiento de hibridación no tóxicos. Aún otro objeto de la invención es proporcionar una técnica de hibridación con baja evaporación. Un objeto adicional de la invención es proporcionar una técnica de hibridación detectable con un objetivo 20x. Aún otro objeto de la invención es proporcionar una composición con una baja concentración de sonda. Otro objeto de la invención es reducir y/o eliminar la necesidad de bloquear la unión no específica. Las composiciones y los métodos de la invención también pueden permitir el uso de sondas heterogéneas sin necesidad de bloquear, eliminar o inhabilitar de otro modo la unión de, por ejemplo, secuencias repetitivas en una muestra biológica.

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

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

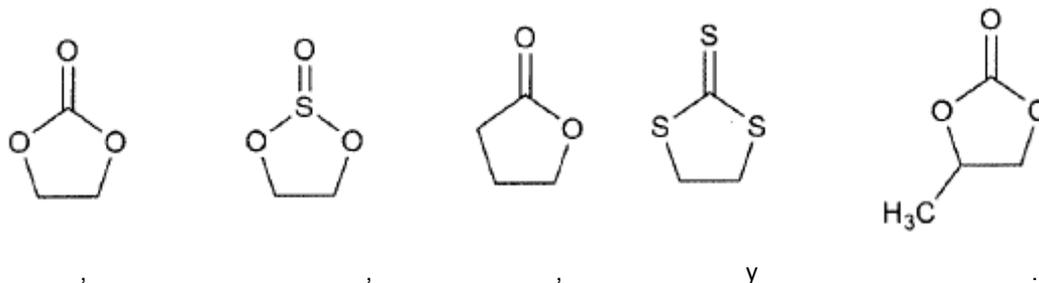
Las composiciones y los métodos de hibridación de ácidos nucleicos de la presente invención son útiles para el análisis *in vivo* o *in vitro* de ácidos nucleicos usando técnicas tales como PCR, PCR *in situ*, transferencia de tipo Northern, transferencia de tipo Southern, citometría de flujo, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, quimioluminiscencia, inmunohistoquímica, cariotipo virtual, ensayo génico, microalineamiento de ADN (por ejemplo, hibridación genómica comparativa con alineamientos (CGH con alineamientos)), obtención de perfiles de expresión génica, ID génica, alineamiento Tiling, electroforesis en gel, electroforesis capilar, e hibridaciones *in situ* tales como FISH, SISH, CISH. Los métodos y las composiciones de la invención pueden usarse en muestras *in vitro* e *in vivo* tales como frotis de médula ósea, frotis de sangre, preparaciones tisulares incrustadas en parafina, muestras tisulares disociadas enzimáticamente, médula ósea, amniocitos, preparaciones en Cytospin, impresiones, etc.

En una realización, la invención proporciona métodos y composiciones para hibridar al menos una molécula con una diana. La invención puede, por ejemplo, eliminar el uso de, o reducir la dependencia de, formamida. Por ejemplo, los métodos y las composiciones de la invención pueden disminuir la barrera de energía para la hibridación sin el uso de formamida. La menor barrera de energía puede reducir el tiempo y/o la temperatura necesarios para la hibridación. Por ejemplo, la invención puede permitir la hibridación a menores temperaturas, o puede permitir una rápida hibridación a mayores temperaturas. Por tanto, en algunos aspectos, la presente invención supera una etapa que lleva mucho tiempo principal en ensayos de hibridación.

Un aspecto de la invención es una composición de hibridación que comprende al menos una sonda de hibridación *in*

situ, aproximadamente el 1%-95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene estructura base cíclica en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra y una disolución de hibridación que comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, sales, agentes acelerantes, agentes quelantes, detergentes y agentes de bloqueo, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:

5



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

10

15

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

20

25

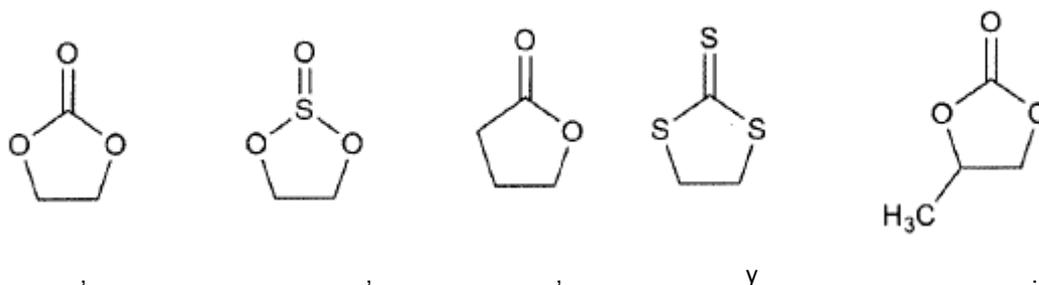
Según otro aspecto de la presente invención la composición acuosa que comprende un disolvente aprótico polar tiene toxicidad reducida. Por ejemplo, una composición menos tóxica que las disoluciones de hibridación tradicionales puede comprender una composición con la condición de que la composición no contenga formamida, o con la condición de que la composición contenga menos del 10%, o menos del 5%, o menos del 2%, o menos del 1%, o menos del 0,5%, o menos del 0,1%, o menos del 0,05%, o menos del 0,01% de formamida. Una composición menos tóxica también puede comprender una composición con la condición de que la composición no contenga dimetilsulfóxido (DMSO), o con la condición de que la composición contenga menos del 10%, el 5%, el 2%, o menos del 1%, o menos del 0,5%, o menos del 0,1%, o menos del 0,05%, o menos del 0,01% de DMSO.

30

35

Los disolventes apróticos polares pueden seleccionarse basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen. Por ejemplo, los disolventes apróticos polares adecuados pueden tener un parámetro de solubilidad en dispersión de entre 17,7 y 22,0 MPa^{1/2}, un parámetro de solubilidad en medio polar de entre 13 y 23 MPa^{1/2}, y un parámetro de solubilidad por enlaces de hidrógeno de entre 3 y 13 MPa^{1/2}. Los disolventes apróticos polares que pueden usarse en las presentes composiciones, métodos y usos inventivos ("disolventes apróticos polares de la invención) se eligen de la lista que consiste en:

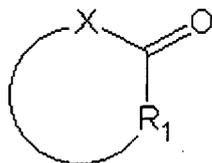
40



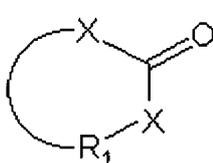
Los disolventes apróticos polares (incluyendo, entre otros, los disolventes apróticos polares de la invención) son compuestos cíclicos. Un compuesto cíclico tiene una estructura de base cíclica. Los ejemplos incluyen los compuestos cíclicos dados a conocer en el presente documento. El disolvente aprótico polar puede elegirse de las

fórmulas 1-4 a continuación:

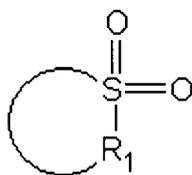
Fórmula 1



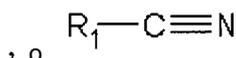
Fórmula 2



Fórmula 3



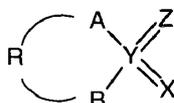
Fórmula 4



5 en las que X es O y R1 es alquildiilo. Las fórmulas 1-3 engloban, entre otros, los disolventes apróticos polares de la invención. La fórmula 4 define disolventes apróticos polares fuera de la invención.

Además, los disolventes apróticos polares pueden elegirse de la fórmula 5 a continuación:

Fórmula 5



en la que X es opcional y si está presente, se elige de O o S;

10 en la que Z es opcional y si está presente, se elige de O o S;

en la que A y B son independientemente O o N o S o parte del alquildiilo o una amina primaria;

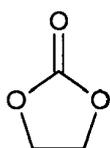
en la que R es alquildiilo; y

en la que Y es O o S o C.

La fórmula 5 engloba, entre otros, los disolventes apróticos polares de la invención.

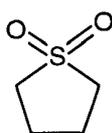
15 Se proporcionan ejemplos de los disolventes apróticos polares adecuados según la fórmula 5 en las fórmulas 6-9 a continuación:

Fórmula 6



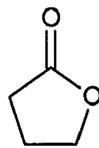
en la que:
X no existe;
A, B y Z son O;
Y es C; y
R es etano-1,2-diilo (un disolvente aprótico polar de la invención)

Fórmula 7



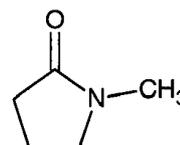
en la que:
Z y X son O;
A y B forman parte del alquildiilo;
Y es S; y
R es butano-1,4-diilo (distinto de un disolvente aprótico polar de la invención)

Fórmula 8



en la que:
X no existe;
A forma parte del alquildiilo;
Y es C;
B y Z son O; y
R es propano-1,3-diilo (un disolvente aprótico polar de la invención)

Fórmula 9



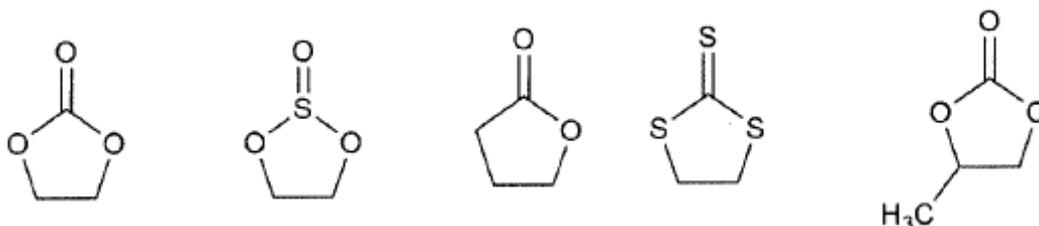
en la que:
X no existe;
A forma parte del alquildiilo;
Y es C;
B es metilamina;
Z es O; y
R es propano-1,3-diilo (distinto de un disolvente aprótico polar de la invención)

Los disolventes apróticos polares, incluyendo en algunos casos, entre otros, los disolventes apróticos polares de la invención, tienen funcionalidad lactona, sulfona, nitrilo, sulfito o carbonato. Tales compuestos se distinguen por sus constantes dieléctricas relativamente altas, altos momentos dipolares y solubilidad en agua.

20 Según la invención, el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad lactona es γ -butirolactona (GBL), el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad sulfito es sulfito de glicol/sulfito de etileno (GS), y el disolvente aprótico polar que tiene funcionalidad carbonato es carbonato de etileno (EC), carbonato de propileno (PC) o tiocarbonato de etileno (ETC).

Según aún otro aspecto, la invención proporciona un método para hibridación *in situ* que comprende:

- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico,
- proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico,
- 5 - proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra y una disolución de hibridación que comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, sales, agentes acelerantes, agentes quelantes, detergentes y agentes de bloqueo, en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



- 10 - combinar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda y la composición de hibridación al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda.

En una realización, se proporciona una cantidad de energía suficiente para hibridar los ácidos nucleicos primero y segundo.

- 15 En una realización, la hibridación de la primera secuencia de ácido nucleico con la segunda secuencia de ácido nucleico se produce en menos de 8 horas, tal como por ejemplo menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas o menos de 1 hora.

Un método divulgado puede comprender, por ejemplo:

- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico,
- 20 - aplicar una composición acuosa que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico y al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra a dicha primera secuencia de ácido nucleico al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda.

En una realización, se proporciona una cantidad de energía suficiente para hibridar los ácidos nucleicos primero y segundo.

En una realización, la hibridación de la primera secuencia de ácido nucleico con la segunda secuencia de ácido nucleico se produce en menos de 8 horas, tal como por ejemplo menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas o menos de 1 hora.

- 30 Según aún otro aspecto de la presente invención, la energía de hibridación se proporciona calentando la composición acuosa y la secuencia de ácido nucleico. Por tanto, la etapa de hibridar puede incluir las etapas de calentar y enfriar la composición acuosa y las secuencias de ácido nucleico.

Según otro aspecto de la invención, las etapas de desnaturalización e hibridación pueden producirse por separado. Por ejemplo, la muestra puede desnaturalizarse con una disolución sin sonda e hibridarse después con sonda.

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

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método en el que la hibridación lleva menos de 1 hora. En otras realizaciones, la hibridación lleva menos de 30 minutos. Todavía en otras realizaciones, la hibridación lleva menos de 15 minutos. En otras realizaciones, la hibridación lleva menos de 5 minutos.

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

Por tanto, la invención también se refiere al uso de una composición de hibridación que comprende una composición

de hibridación tal como se describe en esta invención para su uso en ensayos de hibridación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un transcurso temporal típico para la detección de un solo locus con sondas de FISH marcadas primarias en secciones tisulares fijadas con formaldehído, incrustadas en parafina (muestras histológicas). Las barras representan una hibridación realizada usando una disolución tradicional (parte superior) y un transcurso temporal típico para una hibridación realizada usando una composición de la invención (parte inferior). La primera barra a la izquierda en cada transcurso temporal representa la etapa de desparafinado; la segunda barra representa la etapa de pretratamiento térmico; la tercera barra representa la etapa de digestión; la cuarta barra representa la etapa de desnaturalización e hibridación; la quinta barra representa la etapa de lavado de rigurosidad; y la sexta barra representa la etapa de montaje.

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

Descripción detallada

A. Definiciones

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

“Muestra biológica” ha de entenderse como cualquier muestra *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de una o más células o fragmentos celulares. Esto puede, por ejemplo, ser un organismo unicelular o multicelular, sección tisular, muestra citológica, extensión cromosómica, secuencias de ácido nucleico purificadas, secuencias de ácido nucleico producidas de manera artificial producidas, por ejemplo, por un sistema de base biológica o mediante síntesis química, microalineamiento u otra forma de chip de ácido nucleico. En una realización, una muestra es una muestra de mamífero, tal como, por ejemplo, una muestra de ser humano, animal murino, rata, felino o canino.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico peptídico” o “PNA” significa un polímero sintético que tiene una estructura principal de poliamida con nucleobases colgantes (que se producen de manera natural y modificadas), incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera de los segmentos de oligómero o polímero a los que se hace referencia o se reivindican como ácidos nucleicos peptídico en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.539.082, 5.527.675, 5.623.049, 5.714.331, 5.718.262, 5.736.336, 5.773.571, 5.766.855, 5.786.461, 5.837.459, 5.891.625, 5.972.610, 5.986.053, 6.107.470, 6.201.103, 6.228.982 y 6.357.163, documento WO 96/04000 o en cualquiera de las referencias citadas en los mismos. La nucleobase colgante, tal como, por ejemplo, una base de purina o pirimidina en PNA puede conectarse a la estructura principal mediante un ligador tal como, por ejemplo, uno de los ligadores que se enseñan en el documento WO03/27328 o en cualquiera de las referencias citadas en el mismo. En una realización, el PNA tiene una estructura principal de N-(2-aminoetil)-glicina. Pueden sintetizarse PNA (y opcionalmente marcarse) tal como se enseña en el documento WO03/27328 o en cualquiera de las referencias citadas en el mismo. Los PNA se hibridan fuertemente y con alta especificidad de secuencia, con ADN y ARN, porque la estructura principal de PNA permanece inalterada. Por tanto, sondas de PNA cortas pueden presentar especificidad comparable con sondas de ADN o ARN más largas. Las sondas de PNA también pueden mostrar mayor especificidad en la unión a ADN o ARN complementario.

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

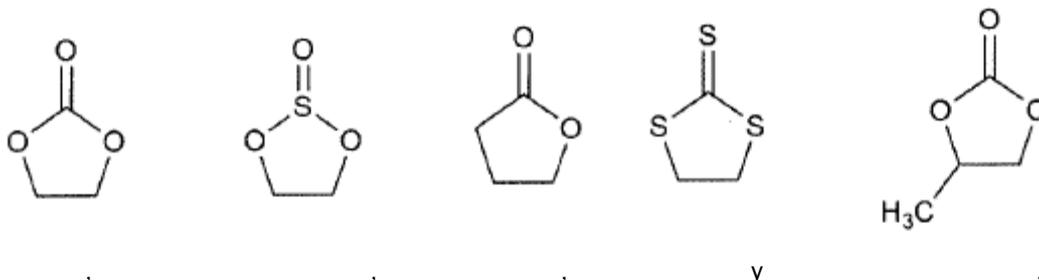
Los ejemplos de ácidos nucleicos y análogos de ácido nucleico también incluyen polímeros de monómeros de nucleótido, incluyendo desoxirribonucleótidos de doble y una sola hebra (ADN), ribonucleótidos (ARN), formas β -anoméricas de los mismos, análogos naturales y sintéticos de los mismos, y similares. La cadena de ácido nucleico puede componerse en su totalidad por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), análogos naturales o sintéticos de los mismos, o mezclas de los mismos. ADN, ARN u otros ácidos nucleicos tal como se definen en el presente documento pueden usarse en el método y las composiciones de la invención.

- 5 “Disolvente aprótico polar” se refiere a un disolvente orgánico que tiene un momento dipolar de aproximadamente 2 unidades debyes o más, una solubilidad en agua de al menos aproximadamente el 5% (volumen) a o cerca de la temperatura ambiental, es decir, aproximadamente 20°C, y que no experimenta un intercambio significativo de hidrógeno a pH aproximadamente neutro, es decir, en el intervalo de 5 a 9, o en el intervalo 6 a 8. Los disolventes apróticos polares incluyen los definidos según los parámetros de solubilidad de Hansen comentados a continuación.
- “Alquildilo” se refiere a un radical hidrocarbonado saturado o insaturado, ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene dos centros radicálicos monovalentes derivados mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original.
- 10 “Disolución acuosa” ha de entenderse como una disolución que contiene agua, incluso pequeñas cantidades de agua. Por ejemplo, una disolución que contiene el 1% de agua ha de entenderse como una disolución acuosa.
- “Hibridación” ha de entenderse como incorporar tanto las etapas de desnaturalización como de reapareamiento del procedimiento de hibridación a menos que se especifique de otro modo.
- 15 “Composición de hibridación” se refiere a una disolución acuosa de la invención para realizar un procedimiento de hibridación, por ejemplo, para unir una sonda a una secuencia de ácido nucleico. Las composiciones de hibridación pueden comprender, por ejemplo, al menos un disolvente aprótico polar, al menos una secuencia de ácido nucleico, y una disolución de hibridación. Las composiciones de hibridación no comprenden enzimas u otros componentes, tales como desoxinucleósidos trifosfato (dNTP), para amplificar ácidos nucleicos en una muestra biológica.
- 20 “Disolución de hibridación” se refiere a una disolución acuosa para su uso en una composición de hibridación de la invención. Se comentan las disoluciones de hibridación en detalle a continuación y pueden comprender, por ejemplo, agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo.
- “Composición de PCR” se refiere a una disolución acuosa de la invención para realizar un procedimiento de hibridación para amplificar una secuencia de ácido nucleico. Las composiciones de PCR pueden comprender, por ejemplo, al menos un disolvente aprótico polar, al menos una enzima para amplificar ácidos nucleicos, un conjunto de cebadores oligonucleotídicos de ácido nucleico, una mezcla de dNTP y una disolución de PCR.
- 25 “Disolución de PCR” se refiere a una disolución acuosa para su uso en una composición de PCR de la invención. Las disoluciones de PCR pueden comprender por ejemplo, agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales y detergentes.
- 30 “Parámetros de solubilidad de Hansen” y “HSP” se refieren a los siguientes parámetros de energía de cohesión (solubilidad): (1) el parámetro de solubilidad en dispersión (δ_D , “parámetro D”), que mide interacciones apolares derivadas de las fuerzas atómicas; (2) el parámetro de solubilidad en medio polar (δ_P , “parámetro P”), que mide interacciones de dipolo permanente-dipolo permanente; y (3) el parámetro de solubilidad por enlaces de hidrógeno (δ_H , “parámetro H”), que mide el intercambio de electrones. Los parámetros de solubilidad de Hansen se definen adicionalmente a continuación.
- 35 “Secuencias repetitivas” ha de entenderse como que se refiere al rápido reapareamiento (aproximadamente el 25%) y/o reapareamiento intermedio (aproximadamente 30%) de componentes de genomas de mamíferos. Los componentes de rápido reapareamiento contienen secuencias altamente repetitivas pequeñas (de unos pocos nucleótidos de largo) que se encuentran habitualmente en tándem (por ejemplo, ADN satélite), mientras que los componentes de reapareamiento intermedio contienen ADN repetitivo disperso. Las secuencias repetidas dispersas se clasifican como o bien SINE (secuencias repetidas dispersas cortas) o LINE (secuencias repetidas dispersas largas), que se clasifican ambas como retrotransposones en primates. Las SINE y LINE incluyen, pero no se limitan a, repeticiones de Alu, repeticiones de Kpn, repeticiones de dinucleótido, repeticiones de trinucleótido, repeticiones de tetranucleótido, repeticiones de pentanucleótido y repeticiones de hexanucleótido. Las repeticiones de Alu componen la mayoría de SINE humanas y se caracterizan por una secuencia consenso de aproximadamente 280 a 300 pb que consisten en dos secuencias similares dispuestas como dímero de cabeza a cola. Además de SINE y 40 LINE, también existen secuencias repetidas en telómeros de cromosomas en los extremos terminales de cromosomas y centrómeros de cromosoma, que contienen distintas secuencias repetidas que sólo existen en la región central de un cromosoma. Sin embargo, a diferencia de las SINE y LINE, que se dispersan aleatoriamente en la totalidad del genoma completo, las secuencias repetidas de telómero y centrómero se localizan en una determinada región del cromosoma.
- 45 “No tóxico” y “toxicidad reducida” se definen con respecto al etiquetado de toxicidad de formamida según “Directive 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council of 31 May 1999 concerning the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging, and labelling of dangerous preparations” (ecb.jrc.it/legislation/1999L0045EC.pdf) (“Directiva”). Según la Directiva, la toxicidad se define usando el siguiente orden de clasificación: T+ “muy tóxico”, T “tóxico”, C “corrosivo”, Xn “dañino”, Xi “irritante”. Las frases de riesgo (“frases R”) describen los riesgos de la toxicidad clasificada. La formamida se enumera como T (tóxico) y R61 (puede provocar daños al feto). Todos los productos químicos siguientes se clasifican como menos tóxicos que la formamida: acetonitrilo (Xn, R11, R20, R21, R22, R36); sulfolano (Xn, R22); γ -
- 50
- 55

butirolactona (Xn, R22, R32); y carbonato de etileno (Xi, R36, R37, R38). En el momento de presentar esta solicitud, no están etiquetados actualmente el tritiocarbonato de etileno y sulfito de glicol.

B. Selección de disolvente

Los disolventes apróticos polares para su uso en la invención (“disolventes apróticos polares de la invención”) son



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

Por ejemplo, el parámetro D puede calcularse con una exactitud razonable basándose en el índice de refracción, o puede derivarse de tablas mediante comparación con disolventes conocidos de tamaño, forma y composición similares después del establecimiento de una temperatura crítica y un volumen molar. El parámetro P puede estimarse a partir de momentos dipolares conocidos (véase, por ejemplo, McClellan A.L., Tables of Experimental Dipole Moments (W.H. Freeman 1963)) usando la ecuación 1:

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

en la que V es el volumen molar. No existen ecuaciones para calcular el parámetro H. En su lugar, habitualmente se determina el parámetro H basándose en contribuciones de grupos.

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

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

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

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

Números RED de menos de 1,0 indican alta afinidad; números RED iguales o próximos a 1,0 indican condiciones límite; y números RED progresivamente mayores indican afinidades progresivamente menores.

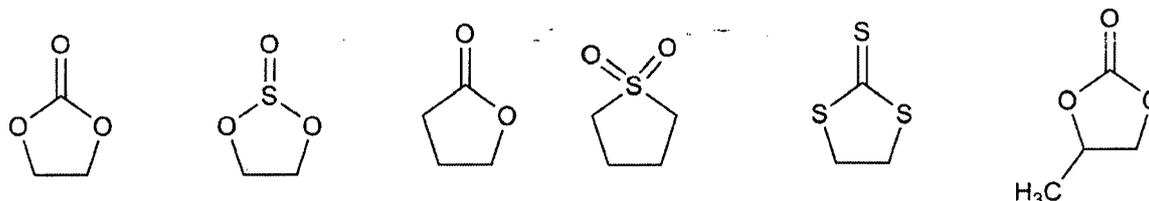
En algunas realizaciones y divulgaciones, los parámetros D de los disolventes apróticos polares, incluyendo entre otros los disolventes apróticos polares de la invención, son de entre 17,7 y 22,0 $\text{MPa}^{1/2}$. Tales parámetros D relativamente altos se asocian generalmente con disolventes que tienen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

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

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

- 5 El volumen molar del disolvente aprótico polar también puede ser relevante, puesto que participa en la evaluación de los tres parámetros de solubilidad de Hansen. A medida que el volumen molar se vuelve más pequeño, los líquidos tienden a evaporarse rápidamente. A medida que el volumen molar se vuelve más grande, los líquidos tienden a entrar en la región de sólido en el intervalo de parámetros D y P citado anteriormente. Por tanto, los disolventes apróticos polares, incluyendo entre otros los disolventes apróticos polares de la invención están bastante cerca del límite líquido/sólido en el espacio de HSP.

En algunas realizaciones, los disolventes apróticos polares de la invención tienen funcionalidad lactona, sulfito y/o carbonato. Tales compuestos se distinguen por sus constantes dieléctricas relativamente altas, altos momentos dipolares y solubilidad en agua. Un disolvente aprótico polar con funcionalidad lactona a modo de ejemplo es γ -butirolactona (GBL), un disolvente aprótico polar con funcionalidad sulfito a modo de ejemplo es sulfito de glicol/sulfito de etileno (GS), y disolventes apróticos polares con funcionalidad carbonato a modo de ejemplo son carbonato de etileno (EC), carbonato de propileno (PC) o tritricarbonato de etileno (ETC), todos ellos disolventes apróticos polares de la invención. Disolventes apróticos polares dados a conocer adicionalmente son sulfolano y acetonitrilo. Se proporcionan a continuación las estructuras de estos disolventes a modo de ejemplo y en la tabla 1 se facilitan sus parámetros de solubilidad de Hansen, números RED y volúmenes molares.



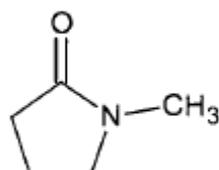
carbonato de etileno (un disolvente aprótico polar de la invención)	sulfito de glicol (un disolvente aprótico polar de la invención)	γ -butirolactona (un disolvente aprótico polar de la invención)	Sulfolano (distinto de un disolvente aprótico polar de la invención)	tritricarbonato de etileno (un disolvente aprótico polar de la invención)	carbonato de propileno (un disolvente aprótico polar de la invención)
---------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------

20 Tabla 1

	D	P	H	RED	Volumen molar (cm ³ /mol)
Correlación (R ₀ = 3,9)	19,57	19,11	7,71	-	-
GBL	19,0	16,6	7,4	0,712	76,5
PC	20,0	18,0	4,1	0,993	85,2
SL	20,3	18,2	10,9	0,929	95,7
EC	19,4	21,7	5,1	0,964	66,0
ETC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
GS	20,0	15,9	5,1	n/a	75,1

n/a = no disponible.

- 25 Otros disolventes apróticos polares dados a conocer son compuestos cíclicos tales como, por ejemplo, ϵ -caprolactona. Además, también se dan a conocer pirrolidinonas sustituidas y estructuras relacionadas con nitrógeno en un anillo de 5 ó 6 miembros, y estructuras cíclicas con dos grupos nitrilo, o un grupo bromo y uno nitrilo. Por ejemplo, N-metil-pirrolidinona (mostrada a continuación) es otro disolvente aprótico polar dado a conocer.



Otros disolventes apróticos polares dados a conocer pueden contener un grupo uretano (NHCOO-) de anillo. En las tablas 2 y 3 a continuación se exponen productos químicos dados a conocer adicionalmente (que no son disolventes

apróticos polares de la invención).

Tabla 2

Disolvente	D	P	H
Acetanilida	20,6	13,3	12,4
N-Acetil-pirrolidona	17,8	13,1	8,3
4-Aminopiridina	20,4	16,1	12,9
Benzamida	21,2	14,7	11,2
Bencimidazol	20,6	14,9	11,0
1,2,3-Benzotriazol	18,7	15,6	12,4
Dióxido de butadieno	18,3	14,4	6,2
Carbonato de 2,3-butileno	18,0	16,8	3,1
Caprolactona (épsilon)	19,7	15,0	7,4
Anhídrido cloromaleico	20,4	17,3	11,5
2-Clorociclohexanona	18,5	13,0	5,1
Cloronitrometano	17,4	13,5	5,5
Anhídrido citracónico	19,2	17,0	11,2
Crotonolactona	19,0	19,8	9,6
Ciclopropilnitrilo	18,6	16,2	5,7
Sulfato de dimetilo	17,7	17,0	9,7
Dimetilsulfona	19,0	19,4	12,3
Dimetilsulfóxido	18,4	16,4	10,2
1,2-Dinitrobenceno	20,6	22,7	5,4
2,4-Dinitrotolueno	20,0	13,1	4,9
Difenilsulfona	21,1	14,4	3,4
1,2-Dinitrobenceno	20,6	22,7	5,4
2,4-Dinitrotolueno	20,0	13,1	4,9
Cloruro de etanosulfonilo	17,7	14,9	6,8
Furfural	18,6	14,9	5,1
2-Furonitrilo	18,4	15,0	8,2
Isoxazol	18,8	13,4	11,2
Anhídrido maleico	20,2	18,1	12,6
Malononitrilo	17,7	18,4	6,7
4-Metoxibenzonitrilo	19,4	16,7	5,4
1-Metoxi-2-nitrobenceno	19,6	16,3	5,5
1-Metil-imidazol	19,7	15,6	11,2
3-Metil-isoxazol	19,4	14,8	11,8
N-Óxido de N-metil-morfolina	19,0	16,1	10,2
Metil-fenilo-sulfona	20,0	16,9	7,8
Metil-sulfolano	19,4	17,4	5,3
4-Toluenosulfonato de metilo	19,6	15,3	3,8
3-Nitroanilina	21,2	18,7	10,3
2-Nitrotiofeno	19,7	16,2	8,2
9,10-Fenantrenoquinona	20,3	17,1	4,8
Anhídrido ftálico	20,6	20,1	10,1
1,3-Propanosultona	18,4	16,0	9,0
beta-Propiolactona	19,7	18,2	10,3
Sacarina	21,0	13,9	8,8
Succinonitrilo	17,9	16,2	7,9
Sulfanilamida	20,0	19,5	10,7
Sulfolano	20,3	18,2	10,9
2,2,6,6-Tetraclorociclohexanona	19,5	14,0	6,3
Tiazol	20,5	18,8	10,8
3,3,3-Tricloropropeno	17,7	15,5	3,4
1,1,2-Tricloropropeno	17,7	15,7	3,4
1,2,3-Tricloropropeno	17,8	15,7	3,4

La tabla 2 expone una lista a modo de ejemplo de disolventes apróticos polares que no son disolventes apróticos polares de la invención basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen. Otros compuestos, naturalmente, también pueden satisfacer estos requisitos. Algunos de estos productos químicos se han usado en disoluciones en hibridación y/o PCR en la técnica anterior (por ejemplo, se ha usado dimetilsulfóxido (DMSO) en disoluciones de hibridación y PCR, y se ha usado sulfolano (SL) en disoluciones de PCR), pero la mayor parte no. Sin embargo, la técnica anterior no reconocía que estos compuestos puedan usarse ventajosamente para disminuir los tiempos y/o

5

las temperaturas de hibridación, tal como se dan a conocer en esta solicitud.

Tabla 3

Producto químico (momento dipolar)	RED	Punto de fusión, °C
Carbonato de cloroetileno (4,02)	0,92	-
2-Oxazolidinona (5,07)	0,48	86-89
2-Imidazol	1,49	90-91
1,5-Dimetil-tetrazol (5,3)	~1,5	70-72
N-Etil-tetrazol (5,46)	~1,5	
Dióxido-sulfuro de trimetileno (4,49)	-	-
Sulfuro de trimetileno (3,63)	-	-
1,3-Dimetil-5-tetrazol (4,02)	-	-
Piridazina (3,97)	1,16	-8
2-Tiouracilo (4,21)	-	-
N-Metil-imidazol (6,2)	1,28	-
1-Nitroso-2-pirolidinona	~1,37	-
Etilfosfinato de etilo (3,51)	-	-
5-ciano-2-Tiouracilo (5,19)	-	-
4H-Piran-4-tiona (4,08)	1,35	32-34
4H-Piran-4-ona = gamma-pirona (4,08)	1,49	Punto de ebullición (P.E.) 80
2-Nitrofurano (4,41)	1,14	29
Alfa-Bromotetronato de metilo (6,24)	-	-
Óxido de tetrahidrotiapiirano (4,19)	1,75	60-64
Picolinonitrilo (2-cianopiridina) (5,23)	0,40	26-28 (P.E. 212-215)
Nitrobencimidazol (6,0)	0,52	207-209
Isatina (5,76)	-	193-195
N-fenil-sidnona (6,55)	-	-
Sulfato de glicol (etilenglicol)	-	99°C
Nota: no es soluble al 40%		

Aunque se enumera el DMSO en la tabla 2 debido a que sus parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) se encuentran dentro de los intervalos citados anteriormente, el DMSO no funciona disminuyendo los tiempos y/o las temperaturas de hibridación en las composiciones y los métodos de la invención. Por tanto, la composición de hibridación de la invención no contiene DMSO como disolvente aprótico polar. Sin embargo, está muy dentro de los conocimientos del experto habitual examinar compuestos adecuados usando la orientación proporcionada en el presente documento incluyendo someter a prueba un compuesto en uno de los ejemplos proporcionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los disolventes apróticos polares adecuados tendrán HSP dentro de los intervalos citados anteriormente y una estructura mostrada en las fórmulas 1-9 anteriores.

C. Composiciones, tampones y disoluciones

(1) Disoluciones de hibridación

Se conocen en la técnica disoluciones de hibridación tradicionales. Tales disoluciones pueden comprender, por ejemplo, agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo.

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

Los agentes acelerantes pueden incluir polímeros tales como FICOLL, PVP, heparina, sulfato de dextrano, proteínas tales como BSA, glicoles tales como etilenglicol, glicerol, 1,3-propanodiol, propilenglicol o dietilenglicol, combinaciones de los mismos tales como disolución de Dernhardt y BLOTTO, y disolventes orgánicos tales como formamida, dimetilformamida, DMSO, etc. El agente acelerante puede estar presente a concentraciones de desde el 1% hasta el 80% o de 0,1x a 10x. Normalmente, está presente formamida a concentraciones de desde el 25% hasta el 75%, mientras que están presentes DMSO, sulfato de dextrano y glicol a concentraciones de desde el 5% hasta el 10%.

Los agentes quelantes pueden incluir EDTA, EGTA, etc. Los agentes quelantes pueden estar presentes a concentraciones de desde 0,1 mM hasta 10 mM. Normalmente, los agentes quelantes están presentes a concentraciones de desde 0,5 mM hasta 5 mM.

Las sales pueden incluir cloruro de sodio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, etc. Las sales pueden estar presentes a concentraciones de desde 1 mM hasta 750 mM. Normalmente, las sales están presentes a

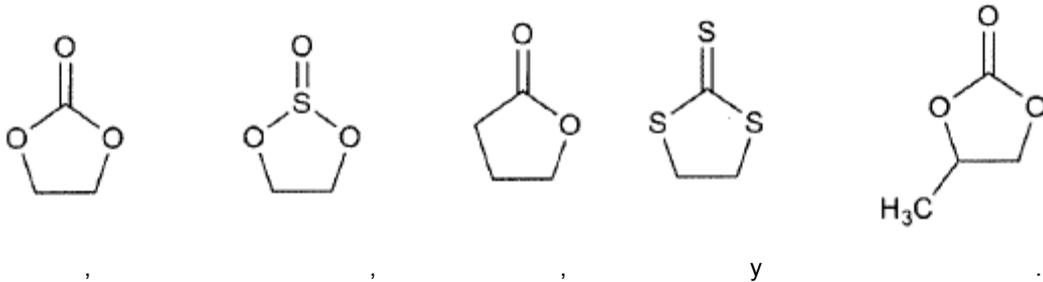
concentraciones de desde 10 mM hasta 500 mM.

Los detergentes pueden incluir Tween, SDS, Triton, CHAPS, ácido desoxicólico, etc. El detergente puede estar presente a concentraciones de desde el 0,01% hasta el 10%. Normalmente, los detergentes están presentes a concentraciones de desde el 0,1% hasta el 1%.

- 5 Los agentes de bloqueo de ácido nucleico pueden incluir, ARNt de levadura, ADN homopolimérico, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, ADN de esperma de arenque, ADN humano total, ADN de COT1, etc. Los ácidos nucleicos de bloqueo pueden estar presentes a concentraciones de 0,05 mg/ml a 100 mg/ml.

10 Existe una gran variación en la bibliografía referente a las disoluciones de hibridación tradicionales. Por ejemplo, una disolución de hibridación tradicional puede comprender SSC 5x o 6x, EDTA 0,01 M, disolución de Dernhardt 5x, SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado, fragmentado 100 mg/ml. Otra disolución de hibridación tradicional puede comprender HEPES 50 mM, NaCl 0,5 M y EDTA 0,2 mM. Una disolución de hibridación típica para FISH con muestras biológicas para la detección de ARN puede comprender, por ejemplo, SSC 2x, sulfato de dextrano al 10%, complejo vanadil-ribonucleósido 2 mM, formamida al 50%, BSA libre de ARNasa al 0,02% y ARNt de *E. coli* 1 mg/ml. Una disolución de hibridación típica para FISH con muestras biológicas para la detección de ADN puede comprender, por ejemplo, SSC 2x, sulfato de dextrano al 10%, formamida al 50%, y por ejemplo, ADN de esperma de salmón 0,3 mg/ml o ADN de COT1 0,1 mg/ml. Otras disoluciones de hibridación típicas pueden comprender formamida al 40%, sulfato de dextrano al 10%, NaCl 30 mM, tampón fosfato 5 mM, Alu-PNA (PNA de bloqueo) o ADN de COT-1, y en algunos casos ADN humano total (THD) 0,1 µg/µl.

20 Las composiciones de la invención pueden comprender una disolución de hibridación que comprende cualquiera de los componentes de las disoluciones de hibridación tradicionales citados anteriormente en combinación con al menos un disolvente aprótico polar, en las que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



25 Los componentes tradicionales pueden estar presentes a las mismas concentraciones tal como se usa en las disoluciones de hibridación tradicionales, o pueden estar presentes a mayores o menores concentraciones, o pueden omitirse por completo.

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

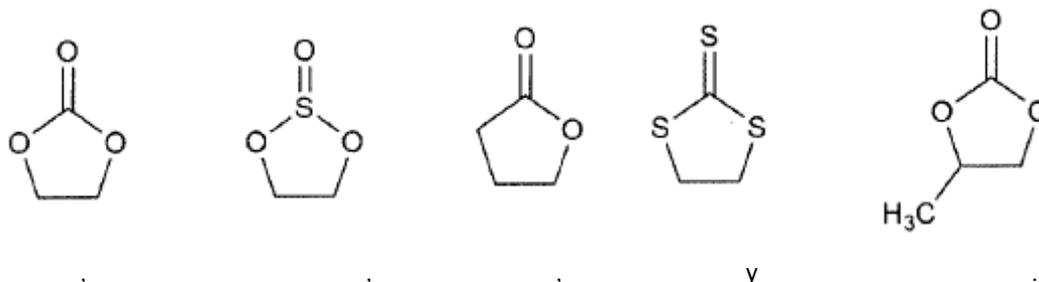
35 Si las composiciones de la invención comprenden agentes acelerantes tales como sulfato de dextrano, glicol o DMSO, el sulfato de dextrano puede estar presente a concentraciones de desde el 5% hasta el 40%, el glicol puede estar presente a concentraciones de desde el 0,1% hasta el 10%, y el DMSO puede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

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

45 Las composiciones de la invención pueden comprender agentes que reducen la unión no específica a, por ejemplo, la membrana celular, tales como esperma de salmón o pequeñas cantidades de ADN humano total o, por ejemplo, pueden comprender agentes de bloqueo para bloquear la unión de, por ejemplo, secuencias repetidas con la diana tales como mayores cantidades de ADN humano total o ADN repetido enriquecido o agentes de bloqueo específicos tales como fragmentos y secuencias de PNA o LNA. Estos agentes pueden estar presentes a concentraciones de desde 0,01-100 µg/µl o 0,01-100 µM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, estos agentes serán ADN humano total 0,1 µg/µl, o ADN no humano 0,1 µg/µl, tal como ADN de esperma de arenque, esperma de salmón o timo de ternero,

o PNA de bloqueo 5 μ M.

Un aspecto de la invención es una composición o disolución para su uso en hibridación. Las composiciones para su uso en la invención incluyen una composición de hibridación que comprende al menos una sonda de hibridación *in situ*, aproximadamente el 1%-95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene estructura base cíclica en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra y una disolución de hibridación que comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, sales, agentes acelerantes, agentes quelantes, detergentes y agentes de bloqueo, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



Una cantidad de disolvente aprótico polar eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra es una cantidad que posibilita la hibridación. Por ejemplo, un modo para someter a prueba si la cantidad de disolvente aprótico polar es eficaz para posibilitar la hibridación es determinar si el disolvente aprótico polar, cuando se usa en las composiciones y los métodos de hibridación descritos en el presente documento, tales como el ejemplo 1, produce una señal detectable y/o un producto de ácido nucleico amplificado.

La composición de hibridación inventiva comprende un disolvente aprótico polar de la invención en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 95% (v/v). En algunas realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 5% al 60% (v/v). En otras realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 10% al 60% (v/v). Todavía en otras realizaciones, la concentración de disolvente aprótico polar es del 30% al 50% (v/v). También son adecuadas concentraciones del 1% al 5%, del 5% al 10%, el 10%, del 10% al 20%, del 20% al 30%, del 30% al 40%, del 40% al 50% o del 50% al 60% (v/v). En algunas realizaciones, el disolvente aprótico polar estará presente a una concentración del 0,1%, el 0,25%, el 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4% o el 5% (v/v). En otras realizaciones, el disolvente aprótico polar estará presente a una concentración del 7%, el 7,5%, el 8%, el 8,5%, el 9%, el 9,5%, el 10%, el 10,5%, el 11%, el 11,5%, el 12%, el 12,5%, el 13%, el 13,5%, el 14%, el 14,5%, el 15%, el 15,5%, el 16%, el 16,5%, el 17%, el 17,5%, el 18%, el 18,5%, el 19%, el 19,5% o el 20% (v/v).

La composición de hibridación inventiva de la invención comprende además una o más sondas de hibridación *in situ*. Las sondas pueden marcarse directa o indirectamente con compuestos detectables tales como enzimas, cromóforos, fluorocromos y haptenos. Las sondas de ADN pueden estar presentes a concentraciones de 0,1 a 100 ng/ μ l. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas pueden estar presentes a concentraciones de 1 a 10 ng/ μ l. Las sondas de PNA pueden estar presentes a concentraciones de 0,5 a 5000 nM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas pueden estar presentes a concentraciones de 5 a 1000 nM.

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

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

Diferentes disolventes apróticos polares pueden conferir diferentes propiedades a las composiciones de la invención. Por ejemplo, la elección del disolvente aprótico polar puede contribuir a la estabilidad de la composición, puesto que determinados disolventes apróticos polares pueden degradarse a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el disolvente aprótico polar carbonato de etileno se descompone en etilenglicol, que es una molécula relativamente estable, y dióxido de carbono, que puede interactuar con agua para formar ácido carbónico, alterando la acidez de las composiciones de la invención. Sin limitarse por la teoría, se cree que el cambio en el pH tras la descomposición del carbonato de etileno hace que las composiciones de la invención sean menos eficaces para la hibridación. Sin embargo, puede mejorarse la estabilidad reduciendo el pH de la composición, añadiendo ácido cítrico como tampón a pH 6,2 en lugar del tampón fosfato tradicional, que se usa normalmente a aproximadamente pH 7,4 y/o añadiendo etilenglicol a concentraciones, por ejemplo, de entre el 0,1% y el 10%, o de entre el 0,5% y el 5%, tal como, por ejemplo, el 1%, el 2%, el 3%, etc. Por ejemplo, con tampón citrato 10 mM, las composiciones de la invención son estables a 2-8°C durante aproximadamente 8 meses. También puede mejorarse la estabilidad si las composiciones

se almacenan a bajas temperaturas (por ejemplo, -20°C).

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

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

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

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

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

Por consiguiente, los sistemas multifásicos de la invención pueden usarse para examinar convenientemente diferentes aspectos de una muestra. Por ejemplo, podría usarse un sistema bifásico para separar muestras marcadas con sondas de PNA de muestras marcadas con sondas de ADN. Otros usos incluyen el aislamiento de una fase específica que presenta, por ejemplo, determinadas ventajas en la hibridación de manera que puede usarse la fase aislada como sistema monofásico. La sonda y/o muestra puede añadirse antes de, o después del aislamiento de una fase particular.

Pueden realizarse hibridaciones con una composición monofásica de la invención, con fases individuales de las composiciones multifásicas de la invención, o con mezclas de una cualquiera o más de las fases en una composición multifásica de la invención. Por ejemplo, en un sistema monofásico, puede extraerse un volumen de la muestra para su uso en la hibridación. En un sistema multifásico, puede extraerse un volumen de muestra de la fase de interés (por ejemplo, la fase superior, inferior o central) para usarse en la hibridación. Alternativamente, las fases en un sistema multifásico pueden mezclarse antes de extraerse un volumen de la muestra mixta para su uso en la hibridación. Sin embargo, el sistema multifásico puede producir una tinción de fondo local intensa e irregular dependiendo de la composición. Aunque la adición de bajas cantidades de formamida reducirán el fondo en un sistema monofásico, tiene poco efecto sobre un sistema multifásico con altas concentraciones (por ejemplo, el 40%) de un disolvente aprótico polar. Además, a medida que aumenta la concentración de formamida, se requieren mayores concentraciones de sonda y/o tiempos de hibridación más largos para mantener una fuerte intensidad de señal.

(3) Optimización para aplicaciones particulares

Las composiciones de la invención pueden variarse para optimizar los resultados para una aplicación particular. Por ejemplo, la concentración de disolvente aprótico polar, sal, agente acelerante, agente de bloque e iones de hidrógeno (es decir pH) pueden variarse para mejorar los resultados para una aplicación particular.

Por ejemplo, la concentración de disolvente aprótico polar puede variarse para mejorar la intensidad de señal y la tinción de fondo. Generalmente, a medida que aumenta la concentración de disolvente aprótico polar, disminuye la intensidad de señal y disminuye la tinción de fondo. Por ejemplo, las composiciones que comprenden EC al 15%

5 tienden a mostrar señales más intensas y menos fondo que las composiciones que comprenden EC al 5%. Sin embargo, puede mejorarse la intensidad de señal para composiciones que tienen bajas concentraciones de disolvente aprótico polar (por ejemplo, del 0% al 20%) si se aumentan las concentraciones de sal y/o sulfato de dextrano. Por ejemplo, pueden observarse señales intensas con EC a del 5% al 10% cuando la concentración de sal se eleva aproximadamente de 8 a 16 veces las concentraciones de sal tradicionales (es decir, aproximadamente NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM). Asimismo, a medida que se usan menores concentraciones de disolvente aprótico polar, generalmente se requieren mayores concentraciones de sulfato de dextrano para mantener buena intensidad de señal y fondo.

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

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

20 Además, las sondas tipo usadas en las composiciones de la invención pueden variarse para mejorar los resultados. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, combinaciones de sondas de ADN/ADN pueden mostrar menos fondo que combinaciones de ADN/sondas de PNA en las composiciones de la invención o viceversa. Por otra parte, las sondas de PNA tienden a mostrar señales más intensas que las sondas de ADN a bajas concentraciones de sal y/o bajas concentraciones de disolvente aprótico polar. De hecho, las sondas de PNA también muestran señales cuando no está presente disolvente aprótico polar, mientras que las sondas de ADN muestran señales débiles o no muestran señales sin disolvente aprótico polar.

D. Aplicaciones, métodos y usos

(1). Muestras analíticas

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

40 La muestra puede aislarse y procesarse usando protocolos convencionales. Pueden obtenerse preparaciones de fragmentos celulares, por ejemplo, mediante homogeneización celular, tratamiento por congelación-descongelación o lisado celular. La muestra aislada puede tratarse de muchos modos diferentes dependiendo del fin de la obtención de la muestra y dependiendo de la rutina en el centro. A menudo la muestra se trata con diversos reactivos para conservar el tejido para el análisis posterior de la muestra, alternativamente la muestra puede analizarse directamente. Ejemplos de métodos ampliamente usados para conservar muestras son fijación con formalina seguido por incrustación en parafina y crioconservación.

45 Para extensiones en metafase, se tratan generalmente cultivos celulares con colcemida, u otros agentes de perturbación del polo del huso adecuados, para detener el ciclo celular en metafase. Entonces se fijan las células y se aplican en puntos sobre portaobjetos de microscopio, se tratan con formaldehído, se lavan y se deshidratan en etanol. Entonces se añaden sondas y se analizan las muestras mediante cualquiera de las técnicas comentadas a continuación.

50 La citología implica el examen de células individuales y/o extensiones de cromosomas a partir de una muestra biológica. El examen citológico de una muestra comienza con la obtención de una muestra de células, lo que puede realizarse normalmente mediante raspado, frotamiento con hisopo o cepillado de una zona, como en el caso de muestras de cuello uterino, o recogiendo fluidos corporales, tales como los obtenidos de la cavidad torácica, la vejiga o la columna vertebral, o mediante aspiración con aguja fina o biopsia con aguja fina, como en el caso de tumores internos. En una preparación citológica manual convencional, la muestra se transfiere a un material de suspensión líquido y las células en el fluido se transfieren entonces directamente o mediante etapas de procesamiento basadas en centrifugación sobre un portaobjetos de microscopio de vidrio para su observación. En una preparación citológica

automatizada típica, se coloca un conjunto de filtro en la suspensión líquida y el conjunto de filtro tanto dispersa las células como captura las células sobre el filtro. Entonces se retira el filtro y se pone en contacto con un portaobjetos de microscopio. Las células se fijan entonces sobre el portaobjetos de microscopio antes de su análisis mediante cualquiera de las técnicas comentadas a continuación.

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

- La histología implica el examen de células en cortes finos de tejido. Para preparar una muestra tisular para el examen histológico, se fijan trozos del tejido en un fijador adecuado, normalmente un aldehído tal como formaldehído o glutaraldehído, y luego se incrustan en cera de parafina fundida. El bloque de cera que contiene la muestra tisular se corta entonces en un micrótomos para producir cortes finos de parafina que contienen el tejido, normalmente de desde 2 hasta 10 micrómetros de grosor. Entonces se aplica el corte de la muestra a un portaobjetos de microscopio, se seca al aire y se calienta para provocar que la muestra se adhiera al portaobjetos de vidrio. Entonces se disuelve la parafina residual con un disolvente adecuado, normalmente xileno, tolueno u otros.
15 Estos denominados disolventes de desparafinado se eliminan entonces con un reactivo de tipo lavado-deshidratación antes del análisis de la muestra mediante cualquiera de las técnicas comentadas a continuación. Alternativamente, pueden prepararse cortes a partir de muestras congeladas, fijadas brevemente en formalina al 10% u otros fijadores adecuados, y luego infundidas con reactivo de deshidratación antes del análisis de la muestra.

- En un experimento de hibridación tradicional usando una muestra histológica, se cortan muestras tisulares fijadas con formalina, incrustadas en parafina en secciones de 2-6 μm y se recogen sobre portaobjetos. La parafina se funde (por ejemplo, 30-60 minutos a 60°C) y luego se elimina (desparafina) lavando con xileno (o un sustituto de xileno), por ejemplo, 2 x 5 minutos. Las muestras se rehidratan, se lavan y luego se pretratan (por ejemplo, 10 minutos a 95-100°C). Se lavan los portaobjetos y luego se tratan con pepsina u otro permeabilizador adecuado, por ejemplo, 3-15 minutos a 37°C. Se lavan los portaobjetos (por ejemplo, 2 x 3 minutos), se deshidratan y se aplica la sonda. Se cubren las muestras con un cubreobjetos y se incuba el portaobjetos a una temperatura suficiente para desnaturar cualquier ácido nucleico en la muestra (por ejemplo 5 minutos a 82°C), seguido por incubación a una temperatura suficiente para permitir la hibridación (por ejemplo, durante la noche a 45°C). Tras la hibridación, se retiran los cubreobjetos y se someten las muestras a un lavado de alta rigurosidad (por ejemplo, 10 minutos a 65°C) seguido por una serie de lavados de baja rigurosidad (por ejemplo, 2 x 3 minutos a temperatura ambiente). Entonces se rehidratan las muestras y se montan para su análisis.
25
30
35

(2). Técnicas de hibridación

- Las composiciones y los métodos de la presente invención pueden usarse completa o parcialmente en todos los tipos de técnicas de hibridación de ácido nucleico conocidas en la técnica para muestras citológicas e histológicas. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH; incluyendo FISH multicolor, Fiber-FISH, etc.), hibridación *in situ* cromogénica (CISH), hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación genómica comparativa (CGH), representaciones cromosómicas y alineamientos *in situ*.
40

- Se describen sondas moleculares que son adecuadas para su uso en las hibridaciones de la invención, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0266459. En general, las sondas pueden prepararse mediante síntesis química o amplificando una secuencia específica de ADN mediante clonación, insertando el ADN en un vector y amplificando el vector e insertándolo en células huésped apropiadas. Los vectores usados comúnmente incluyen plásmidos bacterianos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC) o cromosomas artificiales de levadura (YAC). Entonces se extrae el ADN amplificado y se purifica para su uso como sonda. Se conocen en la técnica métodos para preparar y/o sintetizar sondas, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento PCT/US02/30573.
45

- En general, el tipo de sonda determina el tipo de característica que puede detectarse en un ensayo de hibridación. Por ejemplo, pueden usarse sondas de ADN nuclear total o genómico como sonda específica de especie. Las representaciones cromosómicas son colecciones de secuencias de ADN derivadas de un solo tipo de cromosoma y pueden identificar ese tipo de cromosoma específico en núcleos en metafase e interfase, contar el número de un determinado cromosoma, mostrar translocaciones, o identificar fragmentos extracromosómicos de cromatina.
50 Diferentes tipos cromosómicos también tienen secuencias repetidas únicas que pueden seleccionarse como diana para hibridación con sonda para detectar y contar cromosomas específicos. Las sondas de inserción grandes pueden usarse para seleccionar como diana secuencias de una sola copia. Con estas sondas grandes, la eficacia de hibridación es inversamente proporcional al tamaño de la sonda. También pueden usarse sondas más pequeñas para detectar aberraciones tales como deleciones, amplificaciones, inversiones, duplicaciones y aneuploidía. Por ejemplo, pueden usarse sondas específicas de locus coloreadas de diferente manera para detectar translocaciones
55
60

mediante hibridación de señales separadas *in situ*.

En general, la capacidad para discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas es inversamente proporcional a la longitud de la sonda de hibridación debido a que la diferencia de estabilidad térmica disminuye entre los complejos silvestres y mutantes a medida que aumenta la longitud de la sonda. Se requieren generalmente sondas de más de 10 pb de longitud para obtener la diversidad de secuencia necesaria para identificar correctamente un organismo único o un estado clínico de interés. Por otra parte, diferencias de secuencia tan sutiles como una sola base (mutación puntual) en oligómeros muy cortos (<10 pares de bases) pueden ser suficientes para posibilitar la discriminación de la hibridación con secuencias diana de ácido nucleico complementarias en comparación con secuencias no diana.

10 En una realización, al menos un conjunto de las sondas de hibridación *in situ* puede comprender una o más sondas de PNA, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.105.294. Métodos para sintetizar sondas de PNA se describen en el documento WO03/27328. Alternativamente, o además, al menos un conjunto de las sondas de hibridación en cualquiera de las técnicas comentadas anteriormente puede comprender una o más sondas de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como se describe en el documento WO 99/14226. Debido al enlace en puente adicional entre los carbonos en 2' y 4', la estructura principal del LNA se preorganiza para la hibridación. Las interacciones LNA/ADN y LNA/ARN son más intensas que las interacciones ADN/ADN y ADN/ARN correspondientes, tal como se indica mediante una mayor temperatura de fusión. Por tanto, los métodos y las composiciones de la invención, que disminuyen la energía requerida para la hibridación, son particularmente útiles para hibridaciones con sondas de LNA.

20 En una realización, las sondas puede comprender un marcador detectable (una molécula que proporciona una señal identificable analíticamente que permite la detección del híbrido sonda-diana), tal como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0266459. El marcador detectable puede unirse directamente a una sonda, o puede unirse indirectamente a una sonda, por ejemplo, mediante el uso de un ligador. Cualquier método de marcaje conocido por los expertos en la técnica, incluyendo procesos enzimáticos y químicos, puede usarse para el marcaje de sondas usadas en los métodos y las composiciones de la invención. En otras realizaciones, las sondas no están marcadas.

30 En general, técnicas de hibridación *in situ* tales como CGH, FISH, CISH y SISH emplean sondas de ácido nucleico grandes, principalmente no especificadas que se hibridan con rigurosidad variable con genes o fragmentos de genes en los cromosomas de las células. El uso de sondas grandes hace que la técnica de hibridación *in situ* sea muy sensible. Sin embargo, el uso satisfactorio de sondas genómicas grandes en ensayos de hibridación tradicionales depende del bloqueo de la tinción de fondo no deseada derivada de, por ejemplo, secuencias repetitivas que están presentes en la totalidad del genoma. Tales etapas de bloqueo requieren mucho tiempo y son caras. Tal como se comenta en el presente documento, los métodos y las composiciones de la invención reducen y/o eliminan ventajosamente la necesidad de tales etapas de bloqueo. Sin embargo, en una realización, pueden suprimirse secuencias repetitivas según los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento WO03/27328.

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

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

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

Se ha usado FISH satisfactoriamente para mapear secuencias de ADN repetitivas y de una sola copia en cromosomas en metafase, núcleos en interfase, fibras de cromatina y moléculas de ADN desnudo, y para la

identificación de cromosomas y el análisis de cariotipo a través de la localización de familias repetidas grandes, normalmente los ADN ribosómicos y familias de alineamientos en tándem principales. Una de las aplicaciones más importantes para FISH ha sido en la detección de secuencias de ADN de una sola copia, en particular genes relacionados con enfermedad en seres humanos y otras especies modelo eucariotas, y la detección de agentes de infección. Puede usarse FISH para detectar, por ejemplo, aneuploidía cromosómica en diagnósticos prenatales, cánceres hematológicos y tumores sólidos; anomalías génicas tales como amplificaciones de oncogenes, deleciones génicas o fusiones génicas; anomalías estructurales cromosómicas tales como translocaciones, duplicaciones, inserciones o inversiones; síndromes de genes contiguos tales como síndrome de microdelección; los efectos genéticos de diversas terapias; ácidos nucleicos virales en células somáticas y sitios de integración viral en cromosomas; etc. En FISH multicolor, cada cromosoma se tiñe con un color distinto, permitiendo determinar los cromosomas normales a partir de los que se derivan los cromosomas anómalos. Tales técnicas incluyen FISH múltiplex (m-FISH) cariotipado espectral (SKY), marcaje combinado binario y de razón (COBRA), cariotipado de cambio de color, bandas de color entre especies, bandas multicolor de alta resolución, FISH múltiplex telomérica (TM-FISH, FISH de señales separadas (ssFISH) y FISH de señales fusionadas.

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

Las composiciones de la invención también pueden usarse completa o parcialmente en todos los tipos de técnicas de biología molecular que implican hibridación, incluyendo transferencia y estudio con sonda (por ejemplo, de tipo Southern, Northern, etc.), alineamientos y técnicas de amplificación incluyendo PCR tradicional, RT-PCR, PCR mutacional, PCR asimétrica, PCR de arranque en caliente, PCR inversa, PCR múltiplex, PCR anidada, PCR cuantitativa y PCR *in situ*. La PCR *in situ* es una reacción en cadena de la polimerasa que tiene lugar dentro de una célula sobre un portaobjetos, por ejemplo, las muestras de citología e histología descritas anteriormente. Normalmente, después de adherir la muestra a un portaobjetos de microscopio, las células se rehidratan y se permeabilizan, y luego se combinan con una mezcla apropiada de reactivos de PCR incluyendo polimerasa, dNTP y cebadores. La PCR puede llevarse a cabo en un instrumento especializado, tal como el sistema de PCR *in situ* GeneAmp 1000 (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA), y puede detectarse el producto amplificado usando sondas marcadas o incorporando dNTP marcados durante la amplificación. Las composiciones de la invención mejorarán la eficacia del análisis mediante PCR tradicional e *in situ*, por ejemplo, reduciendo las temperaturas y/o el tiempo de desnaturalización e hibridación requeridos con el fin de ejecutar los ciclos de amplificación.

(3). Condiciones de hibridación

El método la presente invención implica el uso de disolventes apróticos polares en hibridación de cadenas de ácido nucleico. Las composiciones la presente invención son particularmente útiles en dicho método.

Los métodos de hibridación que usan las composiciones de la invención pueden implicar la aplicación de las composiciones a una muestra que comprende una secuencia de ácido nucleico diana, lo más probablemente en una forma de doble hebra. Habitualmente, con el fin de garantizar el acceso de la sonda para que se hibride con la secuencia diana, la muestra y la composición se calientan para desnaturalizar los ácidos nucleicos diana. Durante la desnaturalización, el disolvente aprótico polar interacciona con la secuencia y facilita la desnaturalización de la diana y el reapareamiento de la sonda con la diana. Los disolventes apróticos polares especificados en la presente invención aceleran este proceso considerablemente y reducen la severidad y toxicidad de las condiciones de hibridación en comparación con formamida.

Las hibridaciones que usan las composiciones de la invención pueden realizarse usando la misma metodología de ensayo que para hibridaciones realizadas con composiciones tradicionales. Sin embargo, las composiciones de la invención permiten tiempos de hibridación más cortos. Por ejemplo, las etapas de pretratamiento térmico, digestión, desnaturalización, hibridación, lavado y montaje pueden usar las mismas condiciones en cuanto a volúmenes, temperaturas, reactivos y tiempos de incubación que para composiciones tradicionales. Existe una gran variación en los protocolos de hibridación tradicionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, algunos protocolos especifican una etapa de desnaturalización independiente de posibles nucleótidos de doble hebra sin sonda presente, antes de la siguiente etapa de hibridación. Las composiciones de la invención pueden usarse en cualquiera de los protocolos de hibridación tradicionales conocidos en la técnica.

Alternativamente, los ensayos que usan las composiciones de la invención pueden cambiarse y optimizarse con respecto a las metodologías tradicionales, por ejemplo, disminuyendo el tiempo de hibridación, aumentando o disminuyendo las temperaturas de desnaturalización y/o hibridación y/o aumentando o disminuyendo los volúmenes de hibridación.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando la temperatura de desnaturalización es de desde 60 hasta 100°C y la temperatura de hibridación es de desde 20 hasta 60°C. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando la temperatura de desnaturalización es de desde 60 hasta 70°C, de 70 a 80°C, de 80 a 90°C o de 90 a 100°C, y la temperatura de hibridación es de desde 20 hasta 30°C, de 30 a 40°C, de 40 a 50°C o de 50 a 60°C. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando la temperatura de desnaturalización es de 72, 82 ó 92°C, y la temperatura de hibridación es de 37, 40, 45 ó 50°C.

En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando el tiempo de desnaturalización es de desde 0 hasta 10 minutos y el tiempo de hibridación es de desde 0 minutos hasta 24 horas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando el tiempo de desnaturalización es de desde 0 hasta 5 minutos y el tiempo de hibridación es de desde 0 minutos hasta 8 horas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando el tiempo de desnaturalización es de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 minutos, y el tiempo de hibridación es de 0 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 180 minutos o 240 minutos. Los expertos en la técnica entenderán que en algunos casos, por ejemplo, detección de ARN, no se requiere una etapa de desnaturalización.

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

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

Las composiciones de la invención eliminan sorprendentemente la necesidad de una etapa de bloqueo durante la hibridación mejorando la intensidad de señal y de fondo mediante el bloqueo de la unión de, por ejemplo, secuencias repetitivas con el ADN diana. Por tanto, no hay necesidad de usar ADN humano total, PNA de bloqueo, ADN de COT-1 o ADN de cualquier otra fuente como agente de bloqueo. Sin embargo, los niveles de fondo pueden reducirse adicionalmente añadiendo agentes que reducen la unión no específica, tal como a la membrana celular, tales como pequeñas cantidades de ADN humano total o ADN de origen no humano (por ejemplo, ADN de esperma de salmón) a una reacción de hibridación que usa las composiciones de la invención.

Las composiciones acuosas de la invención proporcionan además la posibilidad de reducir considerablemente la concentración de secuencias de ácido nucleico incluidas en la composición. Generalmente, la concentración de sondas puede reducirse desde 2 hasta 8 veces en comparación con concentraciones tradicionales. Por ejemplo, si se usan sondas de ADN de HER2 y sondas de PNA de CEN17 en las composiciones de la invención, sus concentraciones pueden reducirse en 1/4 y 1/2, respectivamente, en comparación con sus concentraciones en las composiciones de hibridación tradicionales. Esta característica, junto con la ausencia de cualquier requisito de ADN de bloqueo, tal como PNA de bloqueo o COT1, permite un aumento del volumen de sonda en sistemas de instrumentos automatizados en comparación con el volumen de 10 µl tradicional usado en sistemas de composiciones tradicionales, lo que reduce la pérdida debida a evaporación, tal como se comenta en más detalle a continuación.

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

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

Los métodos de ensayo tradicionales también pueden cambiarse y optimizarse cuando se usan las composiciones de la invención dependiendo de si el sistema es manual, semiautomatizado o automatizado. Por ejemplo, un sistema semiautomatizado o automatizado se beneficiará de los tiempos de hibridación cortos obtenidos con las composiciones de la invención. El tiempo de hibridación corto puede reducir las dificultades que se encuentran cuando se usan composiciones tradicionales en tales sistemas. Por ejemplo, un problema de los sistemas

semiautomatizados o automatizados es que puede producirse una evaporación significativa de la muestra durante la hibridación, puesto que tales sistemas requieren volúmenes de muestra pequeños (por ejemplo, 10-150 μ l), temperaturas elevadas y tiempos de hibridación prolongados (por ejemplo, 14 horas). Por tanto, las proporciones de los componentes en las composiciones de hibridación tradicionales son bastante invariables. Sin embargo, puesto que las composiciones de la invención permiten hibridaciones más rápidas, la evaporación se reduce, permitiendo un aumento de la flexibilidad en las proporciones de los componentes en las composiciones de hibridación usadas en sistemas semiautomatizados y automatizados.

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

Otro problema del análisis de obtención de imágenes automatizado es el número de imágenes necesario, la enorme cantidad de espacio de almacenamiento requerido y el tiempo requerido para capturar las imágenes. Las composiciones de la invención abordan este problema produciendo señales muy intensas en comparación con composiciones tradicionales. Debido a las señales muy intensas producidas por las composiciones de la invención, la obtención de imágenes puede realizarse a menor aumento que el requerido para composiciones tradicionales y pueden detectarse y analizarse todavía, por ejemplo, mediante algoritmos. Puesto que el plano focal se vuelve más amplio con menor aumento, las composiciones de la invención reducen o eliminan el requisito de capturar secciones en serie de una muestra. Como resultado, la obtención de imágenes global es mucho más rápida, puesto que las composiciones de la invención requieren menos o ninguna sección en serie y cada imagen cubre un área mucho mayor. Además, el tiempo global para el análisis es más rápido, puesto que los archivos de imágenes totales son mucho más pequeños.

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

La divulgación puede entenderse más claramente con la ayuda de los ejemplos no limitativos que siguen, que constituyen realizaciones preferidas de las composiciones según la divulgación. De manera distinta en los ejemplos, o cuando se indique de otra forma, ha de entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, etcétera, en la memoria descriptiva y las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se trata de obtener en el presente documento. Como mínimo, cada parámetro numérico debe interpretarse en vista del número de cifras significativas y enfoques de redondeo habituales.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establece el amplio ámbito son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en el ejemplo específico son reportados tan precisamente como es posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo. Los ejemplos que siguen ilustran la presente invención y no deben, en ninguna manera considerarse como limitantes de la invención.

Ejemplos

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

Los reactivos usados en los siguientes ejemplos son del kit auxiliar de FISH para histología (K5599) y el kit auxiliar de FISH para citología (K5499) de Dako (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca). Los kits contienen todos los reactivos clave, excepto la sonda, requeridos para completar un procedimiento de FISH para muestras de secciones tisulares incrustadas en parafina, fijadas con formalina. Se prepararon todas las muestras según la descripción del fabricante. Se usó el hibridador de Dako (S2450, Dako) para las etapas de digestión, desnaturalización e hibridación.

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

Se realizó la evaluación de portaobjetos de CISH usando un microscopio óptico Olympus BX51, bajo un objetivo de

4x, 10x, 20x, 40x y 60x.

En los ejemplos que siguen, "sulfato de dextrano" se refiere a la sal de sodio de sulfato de dextrano (D8906, Sigma) que tiene un peso molecular $M_w > 500.000$. Todas las concentraciones de disolventes apróticos polares se proporcionan como porcentajes v/v. Tampón fosfato se refiere a una disolución tamponada con fosfato que contiene NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio dibásico dihidratado) y Na_2HPO_4 , H_2O (fosfato de sodio monobásico monohidratado). Tampón citrato se refiere a una disolución tamponada con citrato que contiene citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $2\text{H}_2\text{O}$; 1.06448, Merck) y ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, H_2O ; 1.00244, Merck).

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

Se cocieron los portaobjetos con múltiples secciones de alineamientos tisulares fijadas con formalina e incrustadas en parafina (FFPE) cortadas de seres humanos (amígdalas, carcinoma de mama, riñón y colon) a 60°C durante 30-60 min, se desparafinaron en baños de xileno, se rehidrataron en baños de etanol y luego se transfirieron a un tampón de lavado. Entonces se pretrataron las muestras en disolución de pretratamiento a un mínimo de 95°C durante 10 min y se lavaron 2 x 3 min. Entonces se digirieron las muestras con pepsina RTU a 37°C durante 3 min, se lavaron 2 x 3 min, se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Entonces se incubaron las muestras con $10\ \mu\text{l}$ de sonda para FISH tal como se describe a continuación en los experimentos individuales. Entonces se lavaron las muestras mediante lavado de rigurosidad a 65°C 10 min, luego se lavaron 2 x 3 min, luego se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Finalmente, se montaron los portaobjetos con $15\ \mu\text{l}$ de medio de montaje antidesvanecimiento. Cuando se completó la tinción, realizaron la puntuación observadores entrenados para evaluar la intensidad de señal, la morfología y el fondo de los portaobjetos teñidos.

Procedimiento de FISH para citología general (ejemplos 21-22)

Se fijaron portaobjetos con preparación de metafases en formaldehído al 3,7% durante 2 min, se lavaron 2 x 5 min, se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Entonces se incubaron las muestras con $10\ \mu\text{l}$ de sonda para FISH tal como se describe en los experimentos individuales. Entonces se lavaron las muestras mediante lavado de rigurosidad a 65°C 10 min, luego se lavaron 2 x 3 min, luego se deshidrataron en una serie de evaporaciones de etanol y se secaron al aire. Finalmente, se montaron los portaobjetos con $15\ \mu\text{l}$ de medio de montaje antidesvanecimiento. Cuando se completó la tinción, realizaron la puntuación observadores entrenados para evaluar la intensidad de señal y el fondo de los portaobjetos teñidos tal como se describe en las secciones de directrices de puntuación para secciones tisulares.

Directrices de puntuación de secciones tisulares

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

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

- 0 No se observa señal.
- 1 La intensidad de señal es débil.
- 2 La intensidad de señal es moderada.
- 3 La intensidad de señal es fuerte.

El sistema de puntuación permite el uso de 0,5 grados.

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

- 0 Las estructuras tisulares y los bordes nucleares están completamente destruidos.
- 1 Las estructuras tisulares y/o los bordes nucleares son escasos. Este grado incluye situaciones en las que algunas zonas tienen núcleos vacíos.
- 2 Se observan estructuras tisulares y/o bordes nucleares, pero los bordes nucleares no son claros. Este grado incluye situaciones en las que unos cuantos núcleos están vacíos.
- 3 Las estructuras tisulares y los bordes nucleares están intactos y son claros.

El sistema de puntuación permite el uso de 0,5 grados.

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

- 0 Se observa poco o nada de fondo.
- 1 Algo de fondo.
- 2 Fondo moderado.
- 5 3 Fondo alto.

El sistema de puntuación permite el uso de 0,5 grados.

Ejemplo 1

Este ejemplo compara la intensidad de señal y la morfología celular de muestras tratadas con las composiciones de la invención o disoluciones de hibridación tradicionales en función de la temperatura de desnaturalización.

- 10 Composición de la sonda para FISH I: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, formamida al 40% (15515-026, Invitrogen), PNA de bloqueo 5 µM (véase Kirsten Vang Nielsen *et al.*, PNA Suppression Method Combined with Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) Technique in PRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation, capítulo 10 (Franck Pellestor ed.) (Nova Science Publishers, Inc. 2006)), sonda de ADN del gen CCND1 marcada con Texas Red 10 ng/µl (RP11-1143E20, tamaño de 192 kb).
- 15 Composición de la sonda para FISH II: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40% (03519, Fluka), PNA de bloqueo 5 µM, sonda de ADN del gen CCND1 marcada con Texas Red 10 ng/µl (RP11-1143E20, tamaño de 192 kb).

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

- 20 Resultados:

Temperatura de desnaturalización	Señal		Morfología celular	
	(I) Formamida	(II) EC	Formamida	E
72°C	0	2	Buena	Buena
82°C	0,5	3	Buena	Buena
92°C	0,5	3	No buena	No buena

Las señales puntuadas como “3” eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

Ejemplo 2

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

- 25 Composición de la sonda para FISH I: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, formamida al 40%, PNA de bloqueo 5 µM, sonda de ADN del gen CCND1 marcada con Texas Red 10 ng/µl.

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

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

Resultados:

Tiempo de hibridación	Señal		Tinción de fondo	
	(I) Formamida	(II) EC	Formamida	EC

14 horas	3	3	+0,5	+2
4 horas	1	3	+0,5	+1
2 horas	0,5	3	+0	+1
60 min	0,5	3	+0	+1
30 min	0	2,5	+0	+1
15 min	0	2	+0	+1
0 min	0	1	+0	+0,5

Las señales puntuadas como “3” eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

Ejemplo 3

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

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

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

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

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

- 15 Composición de la sonda para FISH V: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, acetonitrilo (AN) al 40% (C02CIIX, Lab-Scan), PNA de bloqueo 5 µM, sonda de ADN del gen CCND1 marcada con Texas Red 10 ng/µl.

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

Se mezclaron antes de su uso fases de diferente viscosidad, si estaban presentes. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos.

Resultados:

Señal					
(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)
Formamida	EC	PC	SL	AN	GBL
0,5	3	3	3	2	3

Las señales puntuadas como “3” eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

25 Ejemplo 4

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

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

Se mezclaron antes de su uso fases de diferente viscosidad, si estaban presentes. Se incubaron las sondas para

ES 2 613 481 T3

FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos.

Resultados:

		Carbonato de etileno (EC)				
		10%	20%	30%	40%	60%
Intensidad de señal	Texas Red	1,5	2	3	3	2
	FITC	1	1,5	2	2,5	2

Las señales puntuadas como "3" eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

Ejemplo 5

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

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

- 10 Se mezclaron antes de su uso fases de diferente viscosidad, si estaban presentes. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos.

Resultados:

	Carbonato de etileno (EC)	
	Bloqueo con PNA	Sin bloqueo con PNA
Intensidad de señal	3	3
Intensidad de fondo	0,5 +	0,5 +

Las señales puntuadas como "3" eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

Ejemplo 6

- 15 Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones de la invención en función de la concentración de sonda y el tiempo de hibridación.

Composiciones de sonda para FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40% y sonda de ADN del gen CCND1 marcada con Texas Red 10, 7,5, 5 ó 2,5 ng/μl (según se indica).

- 20 Se mezclaron antes de su uso fases de diferente viscosidad, si estaban presentes. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 3 horas, 2 horas y 1 hora.

Resultados:

Tiempo de hibridación	Intensidad de señal			
	(I)	(II)	(III)	(IV)
	10 ng/μl	7,5 ng/μl	5 ng/μl	2,5 ng/μl
3 horas	3	3	3	3
2 horas	3	3	3	1
1 horas	3	3	3	0,5

Las señales puntuadas como "3" eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

Ejemplo 7

- 25 Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones de la invención en función de las concentraciones de sal, fosfato y tampón.

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

- 5 Se mezclaron antes de su uso fases de diferente viscosidad, si estaban presentes. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos.

Resultados:

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

Las señales puntuadas como “3” eran claramente visibles en un objetivo de 20x.

Ejemplo 8

- 10 Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones de la invención en función de la concentración de sulfato de dextrano.

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

- 15 Se mezclaron antes de su uso fases de diferente viscosidad, si estaban presentes. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

% de sulfato de dextrano	Intensidad de señal	
	Sonda con Texas Red	Sonda con FITC
0%	1	1
1%	1	1
2%	1,5	1,5
5%	2	2,5
10%	2	2,5

- 20 NOTA: este experimento no produjo resultados puntuados como “3” porque la sonda marcada con Texas Red de SIL-TAL1 tiene sólo 67 kb y era de una preparación no optimizada.

Ejemplo 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referencia de sonda para FISH V: Vial de venta convencional de mezcla de sonda HER2 PharmDx (K5331, Dako) que contiene PNA de bloqueo. Hibridación por la noche durante 20 horas.

40 Todas las composiciones estaban presentes como monofase. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos sin bloqueo, excepto por la referencia de sonda para FISH V, que tenía bloqueo con PNA y se hibridó durante 20 horas.

Resultados:

	Intensidad de la señal	
	Sondas de ADN	Sondas de PNA
Composición Ia	0	0,5
Composición Ib	0	0,5
Composición Ic	0,5	2,5
Composición IIa	0,5	3

Composición IIb	1	2
Composición IIc	0,5	3
Composición IIIa	1	2,5
Composición IIIb	1,5	2,5
Composición IIIc	2	3
Composición IVa	2,5-3	3
Composición IVb	3	3
Composición IVc	3	3
Referencia V	2	2,5

NOTA: La composición IVa dio señales de ADN intensas sin sal. Esto no es posible con composiciones para FISH convencionales, en las que la unión a ADN depende de la sal.

Ejemplo 10

5 Este ejemplo compara la intensidad de señal de muestras tratadas con las composiciones de la invención en función de la concentración de disolvente aprótico polar y sulfato de dextrano en condiciones alta concentración de sal (4x normal).

Composición de la sonda para FISH I: carbonato de etileno al 0%, sulfato de dextrano al 29%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN del gen HER2 marcada con Texas Red 10 ng/μl y 50 nM de sonda de PNA de CEN-7 marcada con FITC. La composición era monofásica.

10 Composición de la sonda para FISH II: carbonato de etileno al 5%, sulfato de dextrano al 27%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN del gen HER2 marcada con Texas Red 10 ng/μl y 50 nM de sonda de PNA de CEN-7 marcada con FITC. La composición era monofásica.

15 Composición de la sonda para FISH III: carbonato de etileno al 10%, sulfato de dextrano al 25%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN del gen HER2 marcada con Texas Red 10 ng/μl y 50 nM de sonda de PNA de CEN-7 marcada con FITC. La composición era monofásica.

Composición de la sonda para FISH IV (no sometida a prueba): carbonato de etileno al 20%, sulfato de dextrano al 21%, NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM, sonda de ADN del gen HER2 marcada con Texas Red 10 ng/μl y 50 nM de sonda de PNA de CEN-7 marcada con FITC. La composición era bifásica.

Resultados:

	Intensidad de la señal	
	Sondas de ADN	Sondas de PNA
Composición I	0,5	3
Composición II	2	2,5
Composición III	3	3
Composición IV	-	-

20 NOTA: La composición II dio buenas señales de ADN con EC al 5% sólo y señales de ADN intensas con EC al 10%.

Ejemplo 11

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de muestras tratadas con diferentes fases de las composiciones de la invención.

25 Composición de la sonda para FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40%, sonda de ADN del gen HER2 marcada con Texas Red 8 ng/μl y sonda de PNA de CEN-17 marcada con FITC 600 nM. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

	Intensidad de señal		
	Sonda de ADN	Sonda de PNA	Fondo
Fase superior	3	1,5	+2
Fase inferior	3	2,5	+1
Mezcla de fases superior e inferior	2,5	3	+0,5

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

Ejemplo 12

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

5 Composición de la sonda para FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, GBL al 40%, sonda de ADN del gen CCND1 marcada con Texas Red 10 ng/μl y sonda de PNA de CEN-17 marcada con FITC 600 nM.

Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

	Intensidad de la señal		Fondo
	Sonda de ADN	Sonda de PNA	
Fase superior	3	0-0,5	+ 1,5
Fase inferior	2	0,5	+3
Fases mezcladas	2,5	0,5	+2,5

10 Ejemplo 13

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

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

15 Resultados:

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

NOTA: EC al 15%, sulfato de dextrano al 20% producen las mejores intensidades de señal altas de la disolución monofásica anterior. EC al 20% bifásico tiene intensidades de señal incluso más altas que el 15%. (Datos no mostrados).

Ejemplo 14

20 Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de muestras tratadas con diferentes composiciones de la

invención en función de la concentración de sonda y el tiempo de hibridación.

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

- 5 Composición de la sonda para FISH II: sonda de ADN de HER2 marcada con Texas Red 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y concentración convencional (50 nM) de sondas de PNA de CEN7 marcadas con FITC; EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM.

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

Las composiciones I-III existen como monofase. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 3 horas, 2 horas y 1 hora.

Resultados:

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

Las señales puntuadas como “3” eran claramente visibles en un objetivo de 20x. B.G.: fondo.

15 Ejemplo 15

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de muestras tratadas con las composiciones de la invención en función del agente de bloqueo.

- 20 Composiciones de sonda para FISH: EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM; sonda de ADN de HER2 marcada con Texas Red 2,5 ng/μl (1/4 de la concentración convencional) y 1/2 de la concentración convencional (300 nM) de sonda de PNA de CEN17 marcada con FITC. Se bloquearon las muestras con: (a) nada; (b) COT1 0,1 μg/μl (15279-011, Invitrogen); (c) COT1 0,3 μg/μl; o (d) ADN humano total 0,1 μg/μl antes de la hibridación usando las composiciones de la invención.

Estaban presentes todas las muestras como monofase. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos.

25 Resultados:

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

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

Ejemplo 16

- 30 Este experimento compara diferentes modos de eliminación de la tinción de fondo usando las composiciones de la invención.

Todas las composiciones contenían EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%, NaCl 600 mM, tampón fosfato 10 mM, sondas de ADN de HER2 2,5 ng/μl (1/4 de la concentración convencional), sonda de PNA de CEN17 300 nM (1/2 de la concentración convencional), y uno de los siguientes agentes de reducción del fondo:

- 5 A) PNA de bloqueo 5 μM (véase Kirsten Vang Nielsen *et al.*, PNA Suppression Method Combined with Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) Technique in PRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation, capítulo 10 (Franck Pellestor ed.) (Nova Science Publishers, Inc. 2006))
- B) ADN de COT-1 0,1 μg/μl
- C) ADN humano total (THD) 0,1 μg/μl (THD no marcado sonificado)
- D) ADN de esperma de salmón fragmentado 0,1 μg/μl (AM9680, Ambion)
- 10 E) ADN de timo de ternero 0,1 μg/μl (D8661, Sigma)
- F) ADN de esperma de arenque 0,1 μg/μl (D7290, Sigma)
- G) formamida al 0,5%
- H) formamida al 2%
- I) etilenglicol al 1% (1.09621, Merck)
- 15 J) glicerol al 1% (1.04095, Merck)
- K) 1,3-propanodiol al 1% (533734, Aldrich)
- L) H₂O al 1% (control)

Estaban presentes todas las muestras como monofase. Se incubaron las sondas a 82°C durante 5 minutos y luego a 45°C con secciones tisulares FFPE durante 60 y 120 minutos.

20 Resultados:

Bloqueo del fondo	Hibridación/min	Fondo	Intensidad de señal	
			ADN	PNA
PNA de bloqueo	60	+1	3	2,5
PNA de bloqueo	120	+1-1,5	3	2,5
COT-1	60	+0,5	3	2,5
COT-1	120	+0-0,5	3	2,5
THD	60	+0	3	3
THD	120	+0,5	3	2,5
ADN de esperma de salmón	60	+0	3	3
ADN de esperma de salmón	120	+0	3	3
ADN de timo de ternero	60	+0	2,5	3
ADN de timo de ternero	120	+0,5	3	2,5
ADN de esperma de arenque	60	+0	3	3
ADN de esperma de arenque	120	+0,5	2,5	3
Formamida al 0,5%	60	+0	2,5	3
Formamida al 0,5%	120	+0	3	3
Formamida al 2%	60	+0,5	2,5	3
Formamida al 2%	120	+0,5	3	3

Etilenglicol al 1%	60	+0,5	2,5	3
Etilenglicol al 1%	120	+1,5	3	2,5
Glicerol al 1%	60	+0,5	0,5	3
Glicerol al 1%	120	+1	3	2,5
1,3-Propanodiol al 1%	60	+0	3	2,5
1,3-Propanodiol al 1%	120	+1	3	2,5
Nada	60	+1	2,5	2,5
Nada	120	+1,5	3	2,5

NOTA: todos los agentes de reducción del fondo, excepto PNA de bloqueo, mostraron un efecto en la reducción del fondo. Por tanto, no se requiere un bloqueo específico contra secuencias de ADN repetitivas.

Ejemplo 17

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

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

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

Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos.

Resultados:

	Intensidad de señal	
	I (ET)	II (GS)
Fase superior	1,5	0
Fase inferior	0	3 5
Mezcla de fases superior e inferior	2,5	3

15 Ejemplo 18.

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

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

20 sulfolano

γ-butirolactona

tritocarbonato de etileno

sulfito de glicol

carbonato de propileno

25 Resultados: Todos los disolventes apróticos polares a todas las concentraciones examinadas produjeron al menos un sistema bifásico en las composiciones usadas. Sin embargo, esto no excluye que estos compuestos puedan producir un sistema monofásico en las condiciones de otras composiciones.

Ejemplo 19

Este experimento examina el uso de las composiciones de la invención en el análisis de hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en múltiples secciones tisulares FFPE.

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

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

10 Composición de la sonda para FISH III: 300 nM de cada sonda de PMA de CEN17 marcada con FITC individual (1/2 de la concentración convencional); EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0.

15 Se analizaron todas las muestras usando el protocolo DuoCISH de Dako (SK108) y composiciones para sondas divididas con la excepción de que el lavado de rigurosidad se realizó durante 20 minutos en lugar de 10 minutos, y sin el uso de la etapa con cromógeno rojo de DuoCISH.

Resultados:

Composición	Intensidad de la señal	
	FITC ADN	FITC PNA
I	3	-
II	3	-
III	-	3

20 NOTA: Las intensidades de la señal eran muy intensas. Debido a los altos niveles de fondo, no fue posible discriminar si la adición de ADN de esperma de salmón en la composición II reducía el fondo. Las señales eran claramente visibles usando un objetivo de 10x por ejemplo en amígdalas, que en general tenían menos fondo. Si los tejidos presentaban alto fondo, las señales eran claramente visibles usando un objetivo de 20x.

Ejemplo 20

Este ejemplo compara la intensidad de señal y el fondo de secciones tisulares FFPE tratadas con las composiciones de la invención con dos sondas de ADN.

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

30 Composición de la sonda para FISH II: sonda de ADN del gen IGH marcada con FITC 9 ng/μl; sonda de ADN de MYC marcada con Texas Red 6,4 ng/μl; EC al 15%, sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,0; ADN de esperma de salmón fragmentado 0,1 ug/ul.

ADN de salmón	Intensidad de la señal		Fondo
	Sonda con FITC	Sonda con Texas Red	
-	2,5	2,5	+2,5
+	3	3	+1,5

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

Ejemplo 21

Este experimento examina el uso de las composiciones de la invención con muestras citológicas.

35 Composición de la sonda para FISH: EC al 15%; sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM; sonda de ADN de HER2 marcada con Texas Red 5 ng/μl (1/2 de la concentración convencional) y 1/2 de la concentración convencional de CEN7 (25 nM).

Se incubaron las sondas para FISH con extensiones de cromosomas en metafase a 82°C durante 5 minutos, luego a 45°C durante 30 minutos, todas sin bloqueo.

Resultados:

Intensidad de la señal		Fondo
Sonda de ADN	Sonda de PNA	
3	3	+1

- 5 No se observaron bandas de cromosomas (patrón de bandas R) con las composiciones de la invención, en contraposición con disoluciones para ISH tradicionales, que muestran normalmente bandas R. Se observó una tinción de fondo de color rojo poco homogénea de los núcleos en interfase y los cromosomas en metafase.

Ejemplo 22

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

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

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

- 20 Se incubaron las sondas para FISH con extensiones en metafase a 82°C durante 5 min, luego a 45°C durante 60 min.

Resultados:

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

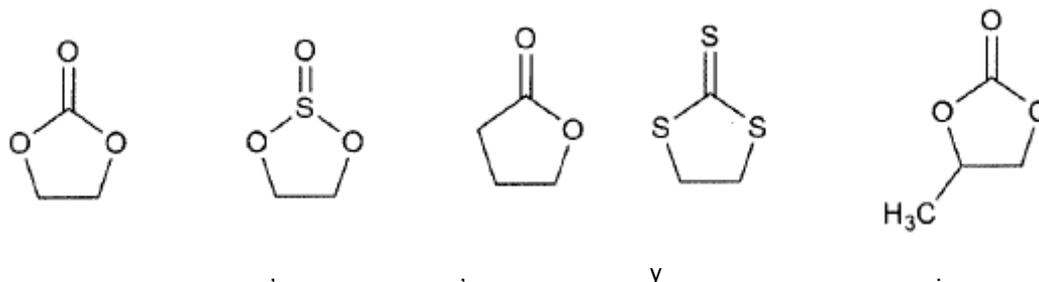
De nuevo, no se observaron bandas de cromosomas (patrón de bandas R) con las composiciones de la invención. Además, no se observó tinción de fondo de los núcleos en interfase o los cromosomas en metafase.

Resumen

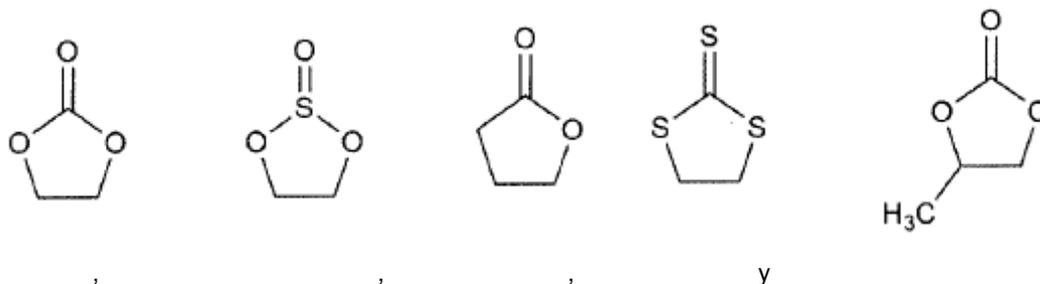
- 25 La presente invención se refiere a composiciones acuosas para su uso en hibridación, por ejemplo, para su uso en hibridación *in situ* (ISH), a métodos para hibridación *in situ* y a usos de dichas composiciones en ensayos de hibridación *in situ*.

REIVINDICACIONES

1. Composición de hibridación que comprende al menos una sonda de hibridación *in situ*, aproximadamente el 1%-95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene estructura base cíclica en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra y una disolución de hibridación que comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, sales, agentes acelerantes, agentes quelantes, detergentes y agentes de bloqueo, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



2. Composición de hibridación según la reivindicación 1, en la que el disolvente polar es no tóxico.
3. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, con la condición de que la composición contenga menos del 10% de formamida, preferiblemente que no contenga formamida.
4. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el disolvente aprótico polar tiene un parámetro de solubilidad en dispersión de entre 17,7 MPa^{1/2} y 22,0 MPa^{1/2}, un parámetro de solubilidad en medio polar de entre 13 MPa^{1/2} y 23 MPa^{1/2}, y un parámetro de solubilidad por enlaces de hidrógeno de entre 3 MPa^{1/2} y 13 MPa^{1/2}.
5. Composición de hibridación según la reivindicación 4, en la que el agente acelerante es sulfato de dextrano y las sales son NaCl y/o tampón fosfato.
6. Composición de hibridación según la reivindicación 5, en la que el sulfato de dextrano está presente a una concentración del 10% al 30%, el NaCl está presente a una concentración de 300 mM a 1200 mM y/o el tampón fosfato está presente a una concentración de 5 mM a 20 mM.
7. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende el 10-20% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar.
8. Método para hibridación *in situ* que comprende:
- proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico,
 - proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico,
 - proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra y una disolución de hibridación que comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, sales, agentes acelerantes, agentes quelantes, detergentes y agentes de bloqueo, en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



- combinar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda y la composición de hibridación al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar las secuencias de ácido nucleico primera y segunda.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la composición de hibridación comprende la segunda secuencia

de ácido nucleico.

10. Método según las reivindicaciones 8 ó 9, en el que el disolvente aprótico polar se define según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 5 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se producen por separado.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que la etapa de hibridación lleva menos de 8 horas, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 15 minutos o menos de 5 minutos.
13. Uso de una composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en ensayos de hibridación *in situ*.

10

Figura 1

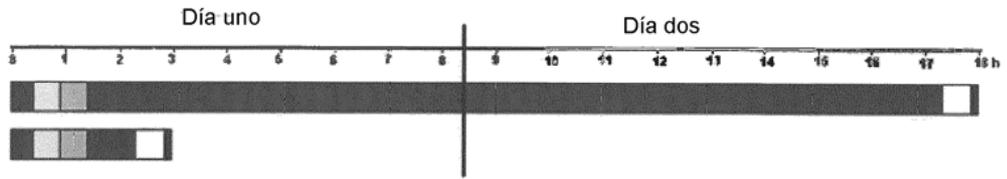


Figura 2

