(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 629 979**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2006** **PCT/US2006/036656**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.05.0007** **WO07053245**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2006** **E 06844178 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 1941050**

(54) Título: **Métodos y composición para generar sondas de ADN de secuencia única, marcaje de sondas de ADN y el uso de estas sondas**

(30) Prioridad:

24.10.2005 US 729536 P
27.03.2006 US 786117 P
20.09.2005 US 718676 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2017

(73) Titular/es:

JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
700 US Highway 202
Raritan, NJ 08869, US

(72) Inventor/es:

CONNELLY, MARK, CARLE;
FOULK, BRAD;
KAGAN, MICHAEL, T.;
SWENNENHUIS, JOOST, F.;
TERSTAPPEN, LEON, W.M.M.;
TIBBE, ARJAN, G.J. y
VERRANT, JOHN, A.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 629 979 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

Métodos y composición para generar sondas de ADN de secuencia única, marcaje de sondas de ADN y el uso de estas sondas

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención se refiere, en líneas generales, al campo de identificación de secuencias de ADN, genes o cromosomas.

Generación de sondas de ADN

El ADN genómico humano es una mezcla de secuencias únicas y secuencias repetitivas que están presentes en múltiples copias en todo el genoma. En algunas aplicaciones, son deseables sondas de hibridación de ácido nucleico para detectar secuencias repetitivas. Estas sondas han demostrado utilidad en los campos de diagnóstico de células fetales, oncología y citogenética. En otras aplicaciones, es deseable generar sondas de hibridación que hibriden solamente con las secuencias únicas de interés en un cromosoma. La preparación de sondas de secuencia única se desbarata por la presencia de numerosas clases de secuencias repetitivas en todo el genoma del organismo (Hood et al., Molecular Biology of Eucar[gamma]otic Cells (Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA 1975). La presencia de secuencias repetitivas en sondas de hibridación reducirá la especificidad de las sondas porque partes de la sonda se unirán a otras secuencias repetitivas encontradas fuera de la secuencia de interés. Por tanto, para asegurar la unión de las sondas de hibridación a una secuencia específica de interés, deben hacerse esfuerzos para asegurar que las secuencias repetitivas en la sonda no hibridan con el ADN diana fuera de la secuencia de interés.

Las recientes contribuciones han abordado esta cuestión inhibiendo la hibridación de las secuencias repetitivas con el uso de ácidos nucleicos de bloqueo no marcados (documento US 5.447.841 y documento US 6.596.479). El uso de ácidos nucleicos de bloqueo en hibridaciones es caro, no evita completamente la hibridación de las secuencias repetitivas y puede distorsionar los patrones de hibridación genómicos (Newkirk et al., "Distortion of quantitative genomic and expression hybridization by Cot-1 DNA: mitigation of this effect," Nucleic Acids Res. Vol. 33 (22):e191 (2005)). Por tanto, son necesarios métodos que eviten la hibridación de secuencias repetidas sin el uso de ADN de bloqueo para una hibridación óptima.

Un medio para conseguir esto es eliminar los fragmentos repetidos indeseados de las sondas de hibridación antes de la hibridación. Las técnicas que implican la eliminación de secuencias altamente repetitivas se han descrito previamente. Los absorbentes, como la hidroxiapatita, proporcionan un medio para eliminar secuencias altamente repetitivas del ADN extraído. La cromatografía con hidroxiapatita fracciona el ADN basándose en las condiciones de re-asociación de dúplex, tales como la temperatura, concentración salina u otras rigurosidades. Este procedimiento es laborioso y varía con diferentes secuencias. El ADN repetido también puede eliminarse por hibridación con ADN inmovilizado (Brison et al., "General Methods for Cloning Amplified DNA by Differential Screening with Genomic Probes", Molecular and Cellular Biology, Vol. 2, pág. 578-587 (1982)). En todos estos procedimientos, la eliminación física de las secuencias repetitivas dependerá de la estrictica optimización de las condiciones con variaciones inherentes basadas en la composición de bases de la secuencia de ADN.

Se han descritos otros varios métodos para eliminar secuencias repetitivas de las sondas de hibridación. Un método implica usar un agente de entrecruzamiento para entrecruzar secuencias repetitivas para evitar directamente la hibridación de las secuencias repetitivas o para evitar la amplificación de las secuencias repetidas en una reacción de PCR. (Documento US 6.406.850). Otro método usa cromatografía de afinidad asistida por PCR para eliminar repeticiones de las sondas de hibridación (documento US 6.569.621). Estos dos métodos dependen del uso de ADN marcado para eliminar las secuencias repetidas, lo que hace que estos procesos sean complejos y difíciles de reproducir. Además, ambos métodos conllevan mucho tiempo, requiriendo múltiples rondas de eliminación de las repeticiones para producir sondas funcionales, adecuadas para su uso en hibridación *in situ* fluorescente (FISH) u otras reacciones de hibridación que requieran alta especificidad de diana.

El uso de nucleasas específicas de dúplex que escinden preferentemente moléculas de ácido desoxirribonucleico bicatenario se ha descrito para aplicaciones de detección de variantes de secuencia tales como polimorfismos de un único nucleótido (documento US 2005/0164216; documento US 6.541.204). La capacidad de la enzima de escindir preferentemente polinucleótidos dúplex de ácido nucleico perfectamente coincidentes en comparación con los monocatenarios proporciona un medio para eliminar ADN bicatenario no diana de la mezcla de muestra.

La capacidad de estas nucleasas de digerir específicamente la forma dúplex de los polinucleótidos en la presente se descubrió que proporcionaba un beneficio sustancial en la fabricación de sondas específicas de diana única que no requieren ADN de bloqueo, eliminando de ese modo los costes y el efecto interferente del ADN de bloqueo, y proporcionando un medio para una producción rápida, eficaz y rentable de sondas de alta especificidad.

La detección de secuencias específicas en un genoma hace uso del hecho de que el ADN consiste en una hélice de dos hebras de ADN y que esta doble hebra es muy estable cuando estas dos hebras son homólogas. El ADN consiste en una estructura de fosfato-fosfato de azúcar y por cada azúcar puede estar presente una de cuatro bases nitrogenadas diferentes, citosina, guanina, timina o adenina. Las hebras homólogas emparejan cada citosina con una guanina y cada timina con una adenina. Cuando se añade una secuencia homóloga marcada a un genoma y el ADN se hace monocatenario, estas secuencias marcadas hibridarán, en las circunstancias correctas, con la secuencia homóloga específica en el genoma. Para esta hibridación *in situ*, están disponibles varias sondas para diferentes fines y aplicaciones de detección.

Cromosomas completos/sondas teñidas (WCP)

La WCP incorpora material de ADN marcado, homólogo a un cromosoma específico. El material se obtiene por clasificación en flujo de cromosomas en metafase o por disección láser de una dispersión en metafase que se amplifica por PCR o una técnica relacionada. Después de marcarla y aplicarla a un núcleo preparado apropiadamente, teñirá el cromosoma diana. Sin embargo, dichas sondas marcadas teñirán además otros cromosomas que no son diana a causa de elementos de secuencia estructurales o repetitivos que están compartidos entre algunos o todos los cromosomas. Por consiguiente, para teñir solamente esas secuencias originarias del cromosoma pretendido de interés, estos elementos repetitivos comunes habitualmente se inhiben por hibridación con ADN de bloqueo u otros métodos que bloquean o eliminan las interacciones no específicas.

También se aplican múltiples tintes de cromosomas a un único núcleo. Las WCP se marcan por diferentes fluorocromos o con una combinación de fluorocromos, sin proporcionar límite a la cantidad de WCP aplicadas en una única hibridación. Las WCP se usan principalmente para el cariotipado y para estudiar translocaciones de fragmentos grandes, regiones y subregiones de cromosomas que se observan mejor en una dispersión en metafase de un núcleo.

Sondas de centrómeros

Las sondas de centrómeros están dirigidas a una secuencia de 171 pb que se produce en orden repetitivo en cada región centromérica de los cromosomas humanos. Todos los cromosomas tienen una secuencia ligeramente diferente y a causa de esto todos los cromosomas se detectan por separado cuando se usa la rigurosidad de hibridación correcta. Solamente dos pares de cromosomas, 13 con 21 y 14 con 22, comparten la misma repetición y no pueden detectarse independientemente. Generalmente, las sondas centroméricas se producen a partir de plásmidos que contienen un inserto de una o unas pocas copias de la repetición de 171 pb. Estas sondas son capaces de hibridar sin la adición de ADN de bloqueo porque las secuencias de 171 pb no se producen fuera de las regiones de interés.

Sondas de telómeros

Los telómeros humanos consisten en una serie de cortas secuencias repetitivas (es decir, TTAGGG). Esto se repite varias veces en diferentes cantidades para cada cromosoma y edad de sujeto de ensayo individual. Esta secuencia repetitiva se usa como sonda que teñirá todos los cromosomas, aunque cada cromosoma no se teñirá igual de fuerte. Para detectar el extremo telomérico de los cromosomas, se usa principalmente un clon de cromosoma artificial bacteriano (BAC) sub-telomérico. Este clon de BAC contiene secuencias repetitivas que deben bloquearse o eliminarse durante o después de la hibridación.

Sondas de hibridación genómica comparativa (CGH)

La CGH es un proceso que implica hibridar un genoma de ensayo con un genoma de referencia. El genoma de referencia puede adoptar la forma de una dispersión de cromosomas en metafase de un individuo sano o puede estar basada en una matriz usando secuencias de sondas que representan todo o parte de un genoma. Las sondas de micromatriz preparadas usando clones de BAC contienen secuencias repetitivas que deben bloquearse antes de la hibridación. Sin embargo, el bloqueo tiene el potencial de causar una desviación en los resultados cuando se comparan con sondas agotadas repetidas (Knol y Rogan, Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, N.º 22). Además, la etapa de bloqueo aumenta el coste de los ensayos de hibridación. Si las secuencias de la sonda se reducen de secuencias repetitivas, la etapa de bloqueo del ADN genómico marcado no es necesaria, provocando una reducción en el coste y la eliminación de cualquier variación.

Sondas específicas de gen

Las sondas específicas de gen se diseñan para detectar una región del genoma que contiene un gen o un grupo de genes diana. Estas sondas se usan para detectar amplificaciones o deleciones de áreas genómicas específicas que se correlacionan con el nivel de expresión del gen específico de interés. La secuencia codificante del propio gen o genes no es suficientemente grande para generar una señal de detección para la sonda que sea visible usando microscopia de fluorescencia convencional. Por lo tanto, dichas sondas específicas de gen no están limitadas a solamente las secuencias génicas codificantes (exones), sino que también implican secuencias no codificantes

(intrones), reguladoras u otras secuencias alrededor del gen. Como las secuencias grandes incluidas dentro de incluso un diseño de sonda específica de gen, a menudo sufren la inclusión indeseable de secuencias repetitivas indeseadas. Cuando dicho material después se marca y se usa en hibridaciones o se usa en hibridaciones y después se marca, las secuencias indeseadas deben bloquearse o eliminarse de la sonda para que sea capaz de detectar el área génica específicamente.

Sondas de micromatriz

Similar a CGH, las sondas de micromatriz se fijan a un portador. En general, las técnicas robóticas automatizadas se usan para depositar puntualmente productos de PCR de ADNc u oligonucleótidos sintéticos en un portaobjetos o una superficie fija similar. Además, existen técnicas para sintetizar secuencias directamente en un portaobjetos (Affimetrix, Inc., Santa Clara). Los portaobjetos se hibridan con ADNc o ARN marcado en combinación con diferentes ADNc o ARN marcados como controles.

Acoplamiento de moléculas indicadoras a sondas de ADN

Las sondas de ADN se visualizan por las moléculas indicadoras acopladas. Estas moléculas tienen que incorporarse o adherirse a la sonda de ADN. Un método utiliza una molécula indicadora, que tiene nucleótidos vinculados a reacciones enzimáticas. Los ejemplos incluyen la incorporación por traslado de mella o una reacción de cebado aleatorio. Además, un nucleótido acoplado a amina, construido de ese modo, se acopla posteriormente directa o indirectamente a moléculas indicadoras. El acoplamiento se hace por marcaje químico del ADN. Un ejemplo es el acoplamiento de una molécula indicadora ligada a un grupo de platino que forma un enlace coordinador en la posición N7 de guanina como se usa en el marcaje ULS (Kreatech Diagnostics, Ámsterdam) y como se describe en los documentos US 5.580.990; US 5.714.327; US 5.985.566; US 6.133.038; US 6.248.531; US 6.338.943; US 6.406.850 y US 6.797.818. Las moléculas indicadoras pueden ser isotopos radiactivos, marcadores no isotópicos, digoxigenina, enzimas, biotina, avidina, estreptavidina, agentes luminiscentes tales como radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fotoluminiscentes (incluyendo fluorescentes y fosforescentes), colorantes, haptenos y similares.

Preparación de muestras

Para ser capaces de detectar las sondas marcadas unidas a cromosomas en interfase, el núcleo debe mantener la morfología durante y después de los procedimientos FISH. Usando la fijación, las células o los núcleos se unen a una capa sólida tal como un portaobjetos de microscopio. La fijación antes, durante o después de la unión a la capa sólida, proporciona referencia para su identificación. Dependiendo del tipo de célula o tejido, los núcleos tienen que ser accesibles para el ADN de la sonda, habitualmente por pre-tratamiento con enzimas proteolíticas, calor, alcoholes, desnaturalizantes, soluciones de detergente o una combinación de tratamientos. La sonda y el ADN nucleico se hacen monocatenarios por calor o por tratamiento con álcali y después se dejan hibridar.

Uso de sondas de ADN

Micromatrices

Un uso común de las micromatrices es determinar el perfil de expresión de ARN de un tejido sospechoso, tumor o microbio. Analizando el perfil de expresión de ARN, se propone un pronóstico para el tratamiento y la supervivencia del paciente. El valor pronóstico de las micromatrices de ARN para uso clínico aún tiene que determinarse. Otro uso común de las micromatrices es CGH basada en matriz. Con esta técnica, puede explorarse un genoma completo para amplificaciones y/o deleciones de regiones cromosómicas.

Microscopia

El análisis citogenético en ensayo pre y postnatal se usa para determinar si un feto tiene o no una anomalía citogenética en una población celular del feto. Las muestras se obtienen frecuentemente a través de amniocentesis, realizada en mujeres embarazadas que se considera que tienen un riesgo aumentado de anomalías citogenéticas. Por consiguiente, estas células se investigan para anomalías citogenéticas. Se realiza el mismo tipo de investigaciones para confirmar las anomalías citogenéticas o para investigar las anomalías citogenéticas sospechosas en poblaciones celulares obtenidas después del parto.

Evaluación de células fetales en sangre materna

Durante el embarazo, las células fetales pueden entrar en la sangre materna, con aumentos en la cantidad de estas células fetales encontrados con embarazos traumáticos, con preeclamsia y anómalos. En evaluaciones rutinarias de hemorragias feto-maternas, el ensayo de Kleihauer-Betke frecuentemente usado se basa en la detección de glóbulos rojos que expresan hemoglobina fetal. Para la detección de anomalías citogenéticas, se necesitan células nucleadas de la sangre materna. La frecuencia de estas células es considerablemente inferior y se estima que está en el intervalo de 1 - 10 células fetales por ml de sangre materna. Los glóbulos rojos nucleados, las células

trofoblásticas y la presencia de progenitores hematopoyéticos que son de origen fetal proporcionan una diana para el aislamiento y la hibridación de sondas en la detección de anomalías citogenéticas de forma prematura en los embarazos. Hasta la fecha, no está disponible un método fiable y reproducible para identificar y evaluar la composición citogenética de estas células. Uno de los problemas principales con este análisis es la pérdida de células fetales en diversas etapas durante todo el procedimiento, provocando información incoherente o poco concluyente.

Oncología

FISH se usa para detectar diversos tipos de aberraciones cromosómicas como translocaciones, deleciones, amplificaciones, inversiones y duplicaciones. Estas aberraciones se detectan en todos los tipos de células y tejido. En leucemia, se aíslan células de la sangre o de la médula ósea para su posterior análisis FISH. En cáncer de vejiga, se aíslan células de la orina. Se obtienen células de tumores sólidos por punción o por escisión del propio tumor. Además, las células que se liberan por los tumores sólidos se aíslan de la sangre y se analizan por FISH. Lo último da la oportunidad de controlar el tratamiento del tumor estrechamente para detectar un cambio cromosómico en el tumor. En algunos tipos de cáncer, FISH proporciona un pronóstico de progresión tumoral o predice la eficacia de la medicación específica. Comercialmente, los ensayos FISH más usados son el FISH de translocación BCR-ABL en leucemia mielógena crónica y FISH de amplificación génica de her2/neu en cáncer de mama.

Células tumorales diseminadas

Los métodos para la caracterización no solamente de células tumorales, sino también de células infrecuentes, u otras entidades biológicas de muestras biológicas se han descrito previamente (documento US 6.365.362). Este método de dos fases requiere el enriquecimiento eficaz para asegurar la adquisición de células diana mientras se elimina una cantidad sustancial de desechos y otras sustancias interferentes antes del análisis, lo que permite el examen celular por técnicas de imágenes. El método combina elementos de enriquecimiento inmunomagnético con citometría de flujo de múltiples parámetros, microscopia y análisis inmunocitoquímico de una manera automatizada de forma exclusiva. El método de combinación se usa para enriquecer y enumerar células epiteliales en muestras de sangre, proporcionando de este modo una herramienta para medir el cáncer.

El método de dos fases tiene aplicaciones en el pronóstico del cáncer y en la supervivencia de pacientes con cáncer metastásico (documento WO 04076643). Basándose en la presencia de células cancerosas en circulación morfológicamente intactas en la sangre, este método es capaz de correlacionar la presencia de células cancerosas en circulación de pacientes con cáncer mama metastásico con el tiempo hasta la progresión de la enfermedad y la supervivencia. Más específicamente, la presencia de cinco (5) o más células tumorales en circulación por 7,5 mililitros proporciona un valor predictivo en el primer seguimiento, proporcionando de este modo un indicador pronóstico prematuro de supervivencia del paciente.

La especificidad del ensayo descrito anteriormente aumenta con la cantidad de células detectadas y no es suficiente en casos en los que se detectan solamente unas pocas (generalmente menos de 5 células tumorales en circulación). Una solución a este problema es proporcionar información genética detallada acerca de las células cancerosas sospechosas. Por consiguiente, un método que incorporaría el enriquecimiento de una muestra de sangre con citometría de imágenes de múltiples parámetros y análisis genético de múltiples parámetros en una célula cancerosa sospechosa individual proporcionaría un perfil completo y un mecanismo de confirmación para mejorar significativamente los procedimientos actuales para la selección de pacientes, la evaluación de recidiva de la enfermedad o supervivencia global.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se ha descrito como un modo único de análisis en la detección de células infrecuentes después del enriquecimiento como se describe en el documento WO 00/60119; Meng et al., PNAS 101 (25): 9393-9398 (2004); Fehm et al., Clin Can Res 8: 2073-2084 (2002) y se incorpora por referencia en este documento. Después del enriquecimiento de células epiteliales, las células capturadas se exploran por métodos conocidos de hibridación y toman imágenes en un portaobjetos de microscopio. A causa de las variaciones técnicas inherentes y de la ausencia de confirmación satisfactoria de la información genética, el patrón de hibridación en solitario no proporciona un nivel de confianza clínica que sería necesario para el análisis sensible, como en la evaluación de muestras con menos de 5 células diana. Además, este método para análisis FISH es difícil de automatizar.

Los métodos basados en hibridación de acoplamiento con inmunocitoquímica en el análisis de células individuales se han descrito previamente (documento 6.524.798). La evaluación fenotípica y genotípica simultánea de células individuales requiere que las características fenotípicas permanezcan estables después de las etapas de preparación de hibridación *in situ* y están limitadas en la elección de marcadores detectables. Típicamente, los ensayos de hibridación *in situ* convencionales requieren las siguientes etapas: (1) desnaturalización con calor o álcali; (2) una etapa opcional para reducir la unión no específica; (3) hibridación de una o más sondas de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico diana; (4) eliminación de fragmentos de ácido nucleico no unidos; y (5) detección de las sondas hibridadas. Los reactivos usados para completar una o más de estas etapas (es decir, lavado con metanol) alterarán el reconocimiento de antígenos en la posterior inmunocitoquímica, causará pequeños

desplazamientos en la posición de las células diana o eliminará completamente las células diana, lo que introduce la posibilidad de una caracterización errónea de las células sospechosas.

Los conjuntos de sondas y métodos para el análisis FISH de múltiples parámetros se han descrito en cáncer pulmonar (documento US 20030087248). También se ha descrito una combinación de 3 sondas que produce una sensibilidad de un 95 % para detectar cáncer de vejiga en pacientes, véanse los documentos US 6.376.188; US 6.174.681. Estos métodos carecen de especificidad y de sensibilidad para evaluar pequeñas cantidades de células diana y, por tanto, de una evaluación de confirmación para detección prematura del estado patológico. Tampoco proporcionan un medio para la automatización conveniente.

Sumario de la invención

Generación de sondas de ADN de repeticiones reducidas

La presente invención proporciona un método para producir sondas de ácido nucleico complementarias a una secuencia diana, de acuerdo con la reivindicación 1.

El método de la invención es capaz de eliminar secuencias repetitivas de ADN. Cualquier ADN bicatenario es una fuente adecuada en la aplicación de los métodos de la presente invención. Para obtener ADN monocatenario, desprovistos de secuencias repetitivas, en primer lugar, se prepara una biblioteca del genoma completo amplificado a partir del ADN fuente de acuerdo con procedimientos convencionales. La biblioteca obtenida consiste en fragmentos seleccionados aleatoriamente que varían en tamaño de aproximadamente 200 a 500 pares de bases. Cada fragmento consiste en ADN bicatenario, que tiene secuencias cebadoras de PCR en cada extremo de una secuencia diana. Generalmente, esta biblioteca es representativa del ADN fuente. Otros métodos que producen fragmentos modificados de ADN para permitir la amplificación también se consideran en esta invención sin límite al tamaño de los fragmentos. Estos incluyen, aunque sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa cebada con oligonucleótido degenerado (DOP PCR), círculos rodantes y métodos de amplificación isotérmica. Los fragmentos de ADN bicatenarios se desnaturalizan por calentamiento hasta 95 ºC u otros medios para obtener fragmentos de ADN monocatenario. Los fragmentos de ADN monocatenario resultantes contienen secuencias repetitivas, secuencias únicas o una combinación de secuencias únicas y repetitivas. Se añade un exceso de ADN Cot o de otro ADN restador apropiado que se una a secuencias repetitivas. La disminución posterior de la temperatura provoca la formación de ADN bicatenario para solamente aquellos fragmentos que contienen secuencias repetitivas. Se añade nucleasa específica de dúplex (DSN) para permitir la digestión de ADN bicatenario. En una realización, la enzima de DSN se añade durante 2 horas a 65 ºC. La composición resultante contiene principalmente ADN monocatenario, que tiene solamente secuencias únicas y ADN digerido. La secuencia única, ahora ADN monocatenario con cebadores de PCR en ambos extremos, se usa como molde para generar grandes cantidades de la secuencia única para su uso en la producción de sondas. Cuando los clones de BAC que contienen una secuencia única deseada se usan como ADN fuente, el molde generado por este método contiene solamente esa secuencia única. Cuando las secuencias de los límites son conocidas, este método es útil en la obtención de sondas que cubren los nucleótidos entre las secuencias del límite en el ADN genómico. Las secuencias de ADN de repeticiones reducidas producidas de acuerdo con la invención funcionan como sondas de hibridación sin el uso de un ADN de bloqueo en ninguna aplicación apropiada que requiera deshabilitar o bloquear secuencias de ADN indeseadas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática que representa la generación de sondas de ADN de repeticiones reducidas a partir de ADN de partida de BAC. Se desnaturaliza una biblioteca de amplificación del genoma completo fragmentado y se permite que vuelva a hibridar en presencia de ADN Cot en exceso. La digestión con DSN del ADN bicatenario produce una mezcla de la secuencia única monocatenaria, disponible como molde para la producción de las sondas.

Figura 2: Representación esquemática que representa la escisión de una secuencia de ADN específica a partir de una fuente de ADN y la producción de clones de la misma. El ADN bicatenario de una fuente apropiada se desnaturaliza y se permite que la secuencia de ADN específica hibride. La digestión con DSN del ADN bicatenario seguida por separación del ADN monocatenario por tamaño provoca el aislamiento del ADN monocatenario deseado. Después de la síntesis de la segunda hebra, el ADN deseado se clona en un vector apropiado para la producción.

Figura 3: Comparación usando sondas de repeticiones reducidas en análisis FISH. Se hibridaron glóbulos blancos con una sonda Her-2 que contenía repeticiones y sin ADN de bloqueo. En ausencia de ADN de bloqueo, la sonda marca el núcleo completo después de la hibridación con regiones repetidas. El panel A muestra los glóbulos blancos hibridados con una sonda FISH de Her-2 que contiene repeticiones y sin ADN de bloqueo. El panel B muestra las mismas células después del marcaje del núcleo con DAPI. El panel C muestra la superposición de las dos señales y la ausencia de resolución de Her-2. El panel D muestra el análisis FISH sobre glóbulos blancos usando una sonda de repeticiones reducidas de Her-2. Las flechas indican las localizaciones de la secuencia cromosómica única para Her-2. El panel E muestra las mismas células después de marcar el núcleo

con DAPI. El panel F muestra la superposición del panel D y E, que visualiza la localización del sitio Her-2 dentro del núcleo de la célula.

Figura 4: El panel A muestra una dispersión de cromosoma hibridado con una sonda libre de repeticiones marcada con PI 6 (CDKN2A) dirigida a 9p21 frecuentemente usada para caracterizar melanoma. Dos cromosomas muestran la presencia de 9p21 y se ilustran por las flechas. El panel B muestra una dispersión de cromosoma hibridado con sonda libre de repeticiones marcada con MLL dirigida a 11q23 usada para identificar un tipo específico de leucemia. Dos cromosomas muestran la presencia de 11q23 como se ilustra por las flechas.

Descripción detallada de la invención

Generación de sondas de ADN de repeticiones reducidas

El ADN contiene secuencias únicas, así como repetitivas. Las secuencias repetitivas se producen por todos los cromosomas y tienen el potencial de impedir las reacciones de hibridación, tal como con hibridación *in situ*, están dirigidas a regiones específicas o secuencias únicas fuera de estas secuencias repetitivas. Para identificar la presencia, cantidad y localización de secuencias específicas en cromosomas, genes o secuencias de ADN es importante que las sondas de hibridación hibriden solamente en la localización de interés. La presencia de secuencias repetitivas en la mezcla de sondas de hibridación reduce la especificidad de la unión, lo que requiere métodos para eliminar las secuencias repetitivas de las sondas o evitar que las sondas hibriden con las secuencias repetitivas en la diana. Por ejemplo, el ADN Cot-1 se añade a menudo durante la hibridación para evitar la unión de las sondas a las secuencias repetitivas (documentos US 5.447.841 y US 6.596.479).

Contribuciones recientes han abordado esta cuestión deshabilitando las secuencias repetitivas. El uso de ADN Cot-1 depende de la capacidad del ADN Cot-1 de formar una estructura dúplex con secuencias repetidas monocatenarias disponibles y, de ese modo, minimiza la interacción de unión no específica de esta parte de la secuencia con la secuencia diana única. El bloqueo del ADN repetitivo, durante una etapa de hibridación con la secuencia diana única o antes como en la etapa previa a la asociación, produce una mezcla que tiene segmentos repetitivos que forman estructuras dúplex con su secuencia complementaria y una forma monocatenaria de la sonda diana, disponible para hibridación con su segmento diana único. Desafortunadamente, la presencia de este dúplex en una amplificación posterior o reacción de marcaje afecta a la señal a través de la introducción de ruido no específico, especialmente en situaciones donde la señal es muy débil. Una alternativa al bloqueo de la secuencia repetitiva es eliminar los segmentos repetidos indeseados de la mezcla de reacción.

La generación de sondas de ADN de repeticiones reducidas de esta invención se representa en la figura 1. Una realización de la presente invención hace uso de nucleasas específicas de dúplex (DSN) que escinde preferentemente moléculas de ácido desoxirribonucleico (documentos US 2005/0164216 y US 6.541.204). La capacidad de la enzima de escindir preferentemente polinucleótidos dúplex de ácido nucleico en comparación con ADN monocatenario proporciona un medio para eliminar el ADN bicatenario que no es diana de la mezcla de muestra. La capacidad de estas nucleasas de digerir preferentemente la forma dúplex de los polinucleótidos proporciona el uso potencial en la fabricación de una sonda específica de diana única, eliminando el efecto interferente del ADN de bloqueo y proporcionando un medio para su producción rápida, eficaz y rentable.

El ADN de partida usado en la práctica de esta invención típicamente está en forma de una o más secuencias de ADN que contienen una multiplicidad de segmentos de ADN. La fuente inicial de material de partida individual en la producción de la composición de sondas se ha descrito en la producción de sondas marcadas directas (documento US 6.569.626). De forma óptima, la fuente del polinucleótido de partida se purifica de un tejido y se fragmenta en segmentos de 150 kb a 200 kb, usando cualquier técnica conocida tal como, aunque sin limitación, tratamiento enzimático (enzimas de restricción), polimerasa, digestión limitada con DNasa I, digestión con nucleasa limitada de la judía mungo, sonicación, corte de ADN y similares. Algunos de estos fragmentos segmentarios serán complementarios a al menos una parte de uno o más segmentos de ADN en la secuencia diana única particular. Los segmentos de ADN individuales se propagan por métodos habitualmente conocidos, tales como clonación en una construcción plasmídica y después se transfectan en bacterias. Después de propagar los fragmentos clonados, las colonias individuales que representan fragmentos aislados se identifican como que contienen al menos una parte de la secuencia de interés. La identificación se consigue por técnicas conocidas tales como hibridación, PCR o búsquedas en bases de datos establecidas de bibliotecas disponibles en el mercado. Cada colonia elegida se cultiva para obtener una construcción plasmídica aislada que tiene un fragmento único, al menos parcialmente complementario a un segmento de la secuencia diana en el cromosoma. Las secuencias diana ejemplares incluyen HER-2, IGF-I, MUC-I, EGFR y AR y pueden estar disponibles a través de vendedores comerciales (es decir, clones de BAC). Una vez los fragmentos clonados de interés se han propagado y aislado, se reducen de sus secuencias polinucleotídicas repetitivas. Usando amplificación de gen completo (WGA), los fragmentos se amplifican como segmentos de 200 a 500 pb de las construcciones plasmídicas aisladas. La DOP PCR disponible en el mercado se considera una realización para esta parte del procedimiento. El ADN Cot-1 se combina con la combinación de biblioteca WGA después de la amplificación calentando primero hasta 95 ºC para desnaturalizar el polinucleótido bicatenario en un estado monocatenario y después enfriando hasta 65 ºC para permitir una re-hibridación selectiva de las secuencias repetidas. Las nucleasas específicas de dúplex (DSN) en condiciones de DSN optimizadas se

añaden después para escindir de forma preferente moléculas de ácido desoxirribonucleico que contienen dúplex de ácido nucleico perfectamente coincidentes sin afectar al mismo tiempo a ningún segmento monocatenario restante. La escisión selectiva de los ácidos nucleicos dúplex se consigue por digestión enzimática de dúplex de ADN-ADN y dúplex de ADN-ARN. Las realizaciones específicas de la presente invención incluyen DSN aislada del cangrejo Kamchatka (documento US 10/845,366) o camarón (documento US 6.541.204), pero se considera cualquier eliminación enzimática de la estructura dúplex en la presente invención. El uso de nucleasas específicas de endonucleasa hidroliza un enlace fosfodiéster en la estructura de ADN dúplex, proporcionando la ventaja de no ser específica de secuencia de nucleótidos y, por lo tanto, aplicable a la mayoría de diana de interés. La digestión con DSN proporciona la eliminación de una cantidad sustancial del dúplex de ácido nucleico para la posterior amplificación del polinucleótido monocatenario restante. Una realización de la presente invención es una digestión de 2 horas con DSN a 65 ºC. La composición resultante contiene ADN monocatenario, correspondiente a partes de la secuencia diana única en el cromosoma, alguna cantidad de ADN bicatenario no digerido y pares de bases digeridas. Preferiblemente, el ADN no digerido se separa del ADN digerido y la DSN por centrifugación (es decir, cromatografía en columna de centrifugación). La mezcla se usa inmediatamente o se almacena a 80 ºC, antes o después de la amplificación de la composición purificada para la posterior utilización, tal como marcaje y uso para hibridación *in situ*. Después de la amplificación, la secuencia de sonda diana resultante se amplifica por PCR produciendo una secuencia de sonda diana de un 90 % a un 99 % pura, y denominada ADN de repeticiones reducidas.

El uso de DSN en el enriquecimiento y aislamiento de un polinucleótido monocatenario a partir de una doble hebra es aplicable en la producción de cualquier polinucleótido monocatenario donde la separación de la entidad monocatenaria de los contaminantes bicatenarios es deseable. Esto es particularmente relevante, aunque sin limitación, en la producción de sondas marcadas para la identificación de genes o de cromosomas, el cariotipado o paneo de una combinación de polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

La producción de las sondas resultantes se incorpora en la materia objeto plasmada en la presente invención. El ADN de repeticiones reducidas, producido de acuerdo con la presente invención, es útil para hibridación *in situ*, incluyendo FISH y todos los demás ensayos de hibridación de ácidos nucleicos. El requisito para la unión competitiva se elimina usando las sondas de repeticiones reducidas producidas de acuerdo con esta invención, provocando una especificidad aumentada de la reacción y una reducción en la cantidad de sondas necesarias para la unión.

El método de nucleasa específica de dúplex

Para preparar una sonda de hibridación hacia una secuencia diana, se obtiene el ADN que contiene la secuencia de interés. Los métodos para obtener ADN que contiene secuencias de interés serán conocidos para los expertos en la materia e incluyen, sin limitación, el aislamiento de ADN genómico de tejidos o de células, la clasificación en flujo de los cromosomas y la exploración de bibliotecas de fragmentos clonados de cromosomas por hibridación, electrónicamente o por PCR.

El ADN de partida usado en la práctica de esta invención se purifica de una fuente por cualquier método. Típicamente, el ADN de partida consiste en genomas, cromosomas, partes de cromosomas o fragmentos clonados de cromosomas. Los cromosomas clasificados en flujo y los cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que se sabe que contienen secuencias diana de genes relacionados con cáncer hacen que la presente invención sea particularmente aplicable. Las secuencias diana ejemplares incluyen HER-2, IGF-I, MYC, EGFR, y AR. Los clones de BAC que contienen estas secuencias están disponibles a través de vendedores comerciales.

Una vez que el ADN que contiene las secuencias de interés se ha identificado y obtenido, se reduce de las secuencias polinucleotídicas repetitivas. Este proceso comienza fragmentando y preparando una biblioteca que contiene la secuencia de interés. Un método es el método de amplificación de genoma completo (WGA) GenomePlex® (WGA) (GenomePlex® es una marca de Rubicon Genomics, Inc.) que escinde aleatoriamente los fragmentos clonados en fragmentos de 200-500 pb y une secuencias conectoras que después pueden usarse para amplificar y volver a amplificar la biblioteca usando PCR. En este ejemplo, la biblioteca amplificada y fragmentada se considera el ADN fuente. Para eliminar las secuencias repetitivas, el ADN fuente se desnaturaliza hasta un estado monocatenario y después se enfría en condiciones que permiten selectivamente que las secuencias repetitivas hibriden para formar moléculas bicatenarias y secuencias únicas que permanecen monocatenarias. Después se añade una nucleasa específica de dúplex (DSN) que escinde preferentemente los fragmentos repetitivos bicatenarios sin escindir las secuencias únicas monocatenarias. La mezcla resultante contiene ADN monocatenario, correspondiente a partes de la secuencia diana única en el cromosoma, alguna cantidad de ADN bicatenario no digerido y pares de bases digeridas. Preferiblemente, el ADN no digerido se separa del ADN digerido y la DSN por cromatografía en columna de centrifugación, extracción cron fenol y cloroformo o por algún otro método similar, pero no se requiere separación. Después, la biblioteca de repeticiones reducidas se usa como sonda de hibridación o se vuelve a amplificar usando PCR para preparar cantidades más grandes de ADN sonda. Después de la amplificación, la secuencia de sonda diana resultante es una secuencia de sonda diana de un 90 % a un 99 % pura, y denominada ADN de repeticiones reducidas.

La fragmentación de la biblioteca y los métodos de amplificación descritos anteriormente no pretenden ser limitantes, sino que en su lugar sirven como ejemplo del modo de uso de un método de fragmentación y amplificación para preparar sondas de repeticiones reducidas. Existen numerosos métodos de fragmentación y amplificación de ácidos nucleicos incluyendo PCR con conector-adaptador, DOP PCR, amplificación por círculo rodante, amplificación mediada por transcripción y todos los demás métodos considerados en esta invención. Se espera que sea necesaria alguna modificación del método anterior para preparar ADN de repeticiones reducidas para adaptar los diferentes métodos de fragmentación de bibliotecas y amplificación y estas modificaciones también se incluyen en la presente invención.

Una consideración en esta invención es el uso de una enzima que es capaz de escindir ADN bicatenario sin escindir ADN monocatenario. Las enzimas incluidas en esta invención pueden escindir ADN bicatenario de cualquier manera, incluyendo lisis de la estructura de azúcar-fosfato, eliminación de una o ambas hebras en un dúplex de ADN o eliminación de bases nitrogenadas para formar sitios apurínicos/apirimidínicos. Los ejemplos no limitantes de estas enzimas incluyen endonucleasas, exonucleasas, enzimas de restricción, enzimas de mellado, enzimas de reparación de ADN, topoisomerasas, ADN girasas y enzimas implicadas en la recombinación homóloga. Las realizaciones específicas de la presente invención incluyen DSN aislada del cangrejo Kamchatka (documento US 10/845.366), camarón (documento US 6.541.204), Endonucleasa I de T7, y exonucleasa III de *E. coli*.

La concentración de enzimas, el tiempo de digestión y las condiciones de tampón tales como concentración salina y de iones magnesio son factores que puede afectar a la especificidad de la DSN hacia ADN bicatenario. La optimización de estas condiciones es necesaria para obtener una reducción eficaz de las repeticiones.

La eficacia y la especificidad de la eliminación de repeticiones en esta invención dependen de las condiciones de reacción usadas para desnaturalizar y re-hibridar, así como de las condiciones presentes durante la digestión con la DSN. La desnaturalización se consigue por álcali o por calentamiento. El grado de re-hibridación de ADN depende de la concentración de ADN presente en las muestras y del tiempo permitido para la re-hibridación. Para que se produzca una re-hibridación selectiva de las secuencias repetitivas, las secuencias repetidas deben estar presentes en una concentración mayor que las secuencias únicas. La relación de secuencias repetidas a únicas dentro de un clon particular variará de una región a otra en todo el genoma. Para normalizar el proceso de reducción entre regiones con cantidades variables de secuencias repetidas, se añade un exceso de ADN restador a la reacción. La masa de ADN restador añadido varía dependiendo de la cantidad deseada de eliminación de repeticiones y es preferiblemente 10-50 veces la masa del ADN fuente. La presente invención considera que un restadores cualquier ácido nucleico o análogo de ácido nucleico que contiene secuencias suficientemente homólogas en la secuencia de nucleótidos a las secuencias repetitivas para permitir la hibridación entre las secuencias restadoras y una parte de las secuencias en el ADN fuente, haciendo que la secuencia restadora sea útil. Una realización de la presente invención incluye ADN Cot-1 como ADN restador que se usa para eliminar las secuencias repetitivas del ADN fuente.

La rigurosidad de la re-hibridación es otro componente en la presente invención. La concentración salina y la temperatura son factores que determinan la rigurosidad de cualquier etapa de re-hibridación. El grado de eliminación de repeticiones se controla ajustando las condiciones de rigurosidad para esta etapa. El ajuste de las condiciones de rigurosidad para permitir algún grado de hibridación entre las secuencias que no son 100 % homólogas, mejora el grado de eliminación de las repeticiones. Las concentraciones salinas varían de 5 milimolar a 1000 milimolar de NaCl con temperaturas de hibridación que varían de 15 ºC a 80 ºC.

En una realización, el proceso de reducción de repeticiones se realiza de modo que la re-hibridación y la digestión con DSN se produzcan de forma secuencial. Por consiguiente, el ADN se desnaturaliza y se deja enfriar durante un periodo de tiempo en condiciones optimizadas para la hibridación. Después, las condiciones de reacción se cambian a condiciones que optimizan la especificidad y la actividad de la digestión con DSN. En otra realización, la re-hibridación y la digestión con DSN tienen lugar simultáneamente, en las mismas condiciones.

También dentro del alcance de esta invención, el ADN fuente o restador se trata con un agente, químico o físico, antes o durante la digestión enzimática para alterar la especificidad de una enzima hacia las fracciones monocatenarias o bicatenarias dentro de la mezcla. Por ejemplo, se añade la proteína RecA de *E. coli* a una mezcla de ADN monocatenario y bicatenario. Esta proteína recubre el ADN monocatenario en la mezcla y protege el ADN monocatenario de la DNasa RecBC de *E. coli* permitiendo al mismo tiempo que el ADN bicatenario en la mezcla se digiera ("Escherichia coli RecA protein protects singles stranded DNA or Gapped Duplex DNA from degradation by RecBC DNase". Williams, JGK, Shibata, T. Radding, CM Journal of Biological Chemistry V246 n.º 14 págs. 7573-7582). También es posible generar ADN fuente o restador usando nucleótidos modificados que alteran la especificidad de una enzima hacia las fracciones de ADN monocatenario o bicatenario.

El uso de DSN en el enriquecimiento y aislamiento de un polinucleótido monocatenario de la doble hebra es aplicable en la producción de cualquier polinucleótido monocatenario donde la separación de la entidad monocatenaria de los contaminantes bicatenarios es deseable. Esto incluye la eliminación de cualquier secuencia indeseable de un ADN fuente. Estas secuencias indeseables incluyen, sin limitación, secuencias repetitivas, secuencias únicas y secuencias de vector. Este método es particularmente relevante en la producción de sondas

marcadas para la identificación de genes o de cromosomas, el cariotipado o el paneo de una combinación de polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

El método de unión selectiva

Desnaturalizando el ADN fuente y permitiendo selectivamente que las secuencias repetitivas hibriden, se usa cualquier agente que se una preferentemente a una estructura de ADN monocatenaria o bicatenaria para eliminar las secuencias repetidas del ADN fuente. Los ejemplos de estos agentes incluyen, sin limitación, polinucleótidos de ADN o de ARN, enzimas, anticuerpos, proteínas de unión a ADN, combinaciones de anticuerpos y agentes de unión a ADN, y compuestos o moléculas naturales o sintéticas. Los agentes de unión a ADN pueden ligarse directa o indirectamente a un soporte sólido que permite la selección cromatográfica positiva o negativa de secuencias únicas o repetitivas. Un ejemplo incluye la separación de ADN monocatenario y bicatenario usando anticuerpos biotinilados contra ADN monocatenario o bicatenario. La población deseada se separa usando partículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Como alternativa, un anticuerpo biotinilado contra un agente de unión a ADN que se une preferentemente a ADN monocatenario o bicatenario se usa de la misma manera.

Otras enzimas específicas de hebra sencilla o doble hebra

La presente invención también puede incluir el uso de cualquier enzima que actúe preferentemente sobre ADN monocatenario o bicatenario en la modificación del ADN fuente o restador al facilitar la eliminación de repeticiones. Un ejemplo no limitante es ligar selectivamente un conector de ADN a la población de ADN bicatenario después de la desnaturalización y re-hibridación selectiva de las repeticiones. Este conector se hibrida a un oligonucleótido homólogo unido a una partícula magnética (o paramagnética) para eliminar las secuencias repetitivas. Un segundo ejemplo es usar una ADN/ARN monocatenario ligasa para circularizar selectivamente ADN monocatenario presente después de la desnaturalización y re-hibridación selectiva del ADN fuente. Los círculos resultantes después se amplifican y enriquecen por amplificación por círculo rodante.

Separación específica de estructura de secuencias repetitivas

Además de los métodos de producción de sondas específicas y basándose en la separación de ADN monocatenario del ADN bicatenario, la presente invención considera cualquier método conocido en la técnica por el cual se produce la separación de secuencias repetidas de secuencias únicas con el establecimiento de alguna estructura de ADN detectable en las secuencias repetidas o en las secuencias únicas y esta estructura detectable se usa para separar una población de la otra. Algunos ejemplos de estructuras de ADN detectable incluyen, sin limitación, ADN de hebra triple o de hebra cuádruple, horquillas, franjas, solapas, ADN-Z, uniones de Holliday y otras estructuras formadas durante la recombinación. Estas estructuras pueden producirse de forma natural dentro de las secuencias de interés o pueden inducirse por modificación del ácido nucleico fuente o del ácido nucleico restador o ambos.

Digestión selectiva de secuencias repetidas

Otro método para eliminar las secuencias repetidas del ADN fuente es digerir una biblioteca de ADN fragmentado y amplificado con una enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento se sabe que existe en las secuencias de ADN repetitivo. Cuando el ADN fuente digerido se vuelve a amplificar por PCR, la biblioteca restante se enriquecerá para las secuencias únicas y se reducirá de secuencias que contienen repeticiones.

Digestión y ligamiento selectivo

Otro método para preparar sondas de repeticiones reducidas es digerir el ADN diana con dos enzimas de restricción para dejar diferentes salientes en la secuencia digerida. La primera enzima de restricción es preferiblemente una enzima que corta dentro de las secuencias repetidas y la segunda es una enzima que no corta dentro de las secuencias repetidas. Después de la digestión, los conectores se unen selectivamente a los extremos de las secuencias cortadas por la segunda enzima de restricción. Estas secuencias conectoras después se usan para amplificar por PCR una biblioteca, reducida de secuencias repetidas. El ADN de repeticiones reducidas resultante, tanto la composición como la producción, se incorporan en la presente invención. El ADN de repeticiones reducidas, como se describe en la presente invención, es útil como sonda para cualquier tipo de ensayo de hibridación donde se desea la unión específica de las secuencias diana. Estas técnicas incluyen, sin limitación, ISH, FISH, CGH, cariotipado espectral, tinción de cromosomas, transferencia de Southern, transferencia de Northern y micromatrices. La producción de sondas de hibridación que solamente contienen secuencias únicas es una realización de la presente invención. Por consiguiente, la necesidad de unión competitiva se elimina, produciendo un aumento en la especificidad de la reacción y reduciendo la cantidad de sondas necesarias para la unión.

Uso de nucleasa específica de dúplex para escindir ADN en una localización deseada

El uso de nucleasas específicas de dúplex tiene utilidad en la escisión de secuencias específicas del ADN. La figura 2 muestra una representación esquemática de esta realización. El ADN monocatenario se obtiene de una fuente de ADN, que contiene la secuencia deseada. Los oligonucleótidos que identifican ambos extremos de la secuencia

deseada se añaden y las nucleasas específicas de dúplex se introducen para cortar la sonda de ADN deseado del ADN fuente. Después de separar la sonda de ADN deseada por exclusión por tamaños, se sintetiza el ADN de segunda hebra y se clona para proporcionar una fuente de sondas de ADN. Por tanto, las nucleasas específicas de dúplex se usan para escindir secuencias de ADN en regiones específicas. Este método es muy útil en la clonación de fragmentos de interés que son demasiado grandes para amplificar por PCR y cuando los fragmentos carecen de sitios apropiados de enzimas de restricción. Estos fragmentos entonces pueden usarse como sondas de hibridación, secuenciarse o usarse para cualquier otro propósito. En la figura 2, se diseñan dos oligonucleótidos para que hibriden con una o ambas hebras del ADN, y para que flanqueen la secuencia de interés. El ADN que contiene una secuencia de interés se desnaturaliza y se deja re-hibridar en presencia de un exceso de los oligonucleótidos flanqueantes. La digestión con una nucleasa específica de dúplex corta selectivamente el ADN en el sitio donde se hibridan los oligonucleótidos. Las moléculas de ADN monocatenario restantes se fraccionan por tamaño para obtener la secuencia de interés. La secuencia de interés se hace bicatenaria usando una ADN polimerasa y clona en un plásmido. Por tanto, se generan posibilidades para clonar o subclonar secuencias de interés a partir de polinucleótidos de ADN más grandes. Un segundo ejemplo de escisión específica de sitio es la recuperación de fragmentos clonados de vectores plasmídicos por digestión selectiva de los vectores. En un ejemplo, el plásmido que contiene el fragmento de ADN clonado se desnaturaliza y se deja re-hibridar en presencia de plásmido en exceso, que carece de ADN clonado. Además, una nucleasa específica de dúplex escinde las secuencias plasmídicas y deja el ADN clonado monocatenario intacto. El ADN monocatenario restante entonces se usa para cualquier aplicación conocida en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, secuenciación o subclonación.

Ejemplo 1 - Detección de cromosomas o partes de cromosomas usando sondas de ADN de repeticiones reducidas

Se seleccionó el clon de BAC CTD-2019C10 para usarse como sonda para el gen Her-2 por selección electrónica del genoma humano usando el software UCSC (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hg- Gateway) y los clones se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se aisló el ADN de BAC usando el kit de construcción grande de Qiagen (Valencia, CA). Se preparó en el ADN fuente usando 10 nanogramos de BAC purificado y el kit de amplificación de genoma total completo Genomeplex® (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se prepararon mezclas de reducción que contenían 2 microgramos de ADN Cot-1, tampón de nucleasa específica de dúplex 1x (Evrogen, Moscú, Rusia), NaCl 0,3 M y 66 nanogramos de ADN fuente. Las mezclas de reducción se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95 ºC, se pusieron en hielo durante 10 segundos y se añadió 1 unidad de nucleasa específica de dúplex (Evrogen, Moscú, Rusia). Las muestras se incubaron a 65 ºC durante 90 minutos. Se purificaron 5 microlitros de la reacción usando el kit de limpieza de PCR Genelute (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) y el ADN purificado se eluyó en alícuotas de 50 microlitros. Después se volvieron a amplificar 15 microlitros de las muestras reducidas por PCR usando el kit de re-amplificación de genoma completo (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). Las reacciones de PCR se purificaron como se describe y se cuantificaron basándose en su A_{260}. Se usaron 10 nanogramos de la primera mezcla de re-amplificación como molde en usa segunda re-amplificación, purificada como se describe. Este material se sonicó hasta un peso molecular promedio de 200-500 pares de bases, se precipitó en etanol y se resuspendió en H_2O destilada. El ADN resultante se marcó de forma fluorescente usando el kit de rojo/naranja brillante de platino Kreatech ULS (Kreatech, Ámsterdam, Países Bajos). Para las comparaciones, también se prepararon sondas con repeticiones del ADN fuente que se usó en el proceso de reducción.

Se prepararon glóbulos blancos estimulados con fitohemaglutinina para FISH por fijación en metanol al 75 %, ácido acético al 25 % y se aplicó puntualmente sobre portaobjetos usando técnicas convencionales. Las sondas de repeticiones reducidas y las sondas de ADN fuente se hibridaron a 2 ng/µl con ADN de bloqueo Cot en un tampón de hibridación que consistía en formamida al 50 %, sulfato de dextrano al 10 % y SSC 1x. Los portaobjetos y la sonda se co-desnaturalizaron a 80 ºC durante 3 minutos y se hibridaron durante una noche a 37 ºC. Después de la hibridación, las muestras se lavaron durante 5 minutos a 50 ºC en SSC 0,5x, SDS al 0,001 %. Las muestras se tiñeron con contraste en 0,5 µg/ml de DAPI durante 5 minutos y se montaron en glicerol al 50 %. Se adquirieron imágenes usando un microscopio fluorescente Leica DM-RXA (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) equipado con filtros apropiados para rodamina y DAPI. Se adquirieron imágenes con una cámara digital en blanco y negro Photometries SynSys (Photometries, Tucson, AZ). Las señales DAPI se potenciaron y se generaron imágenes superpuestas usando el software Leica FW 4000. Las imágenes de Her-2 están sin editar y se capturaron usando configuraciones idénticas de cámara con propósitos de comparación. La figura 3 representa una comparación de las imágenes. El panel A muestra que cuando el ADN fuente que contiene las repeticiones se usa como sonda de hibridación, las sondas tiñen el núcleo completo y no son visibles señales específicas de Her-2. Cuando se usa ADN de repeticiones reducidas como sonda (panel D) son claramente detectables (flechas) señales específicas que corresponden al gen Her-2.

Ejemplo 2 - Las sondas de ADN reducidas de secuencias repetidas de acuerdo con esta invención mejoran la visualización de sondas de ADN marcadas de forma fluorescente en comparación con sondas de ADN tradicionales que contienen repeticiones que se bloquean durante el procedimiento

La relación de señal a ruido de las sondas marcadas de forma fluorescente se mejora significativamente cunado se emplean sondas de ADN de repeticiones reducidas obtenidas de acuerdo con la invención. Para esta comparación, se usaron sondas de ADN dirigidas a 9p21 y 11q23 como saben los expertos en la materia. Estas señales son problemáticas porque son señales relativamente pequeñas y difíciles de discernir. Las sondas se redujeron de

secuencias repetidas de acuerdo con la invención y se usó una molécula indicadora fluorescente unida a un grupo de platino que forma un enlace coordinador en la posición N7 de guanina para marcar de forma fluorescente las sondas (ULS labeling, Kreatech, Ámsterdam). La figura 4 paneles A y B muestra una dispersión de cromosoma hibridado con la sonda 9p21 marcada con rodamina y 11q23 marcada con dGreen respectivamente. Pueden discernirse señales claras de las sondas sin repeticiones con las sondas sin repeticiones como se indica por las flechas en las figuras. Por tanto, la visualización de la presencia de estas sondas es superior a la que se obtiene usando sondas que se obtienen a través de métodos tradicionales. Esta mejora en la visualización proporciona un diagnóstico diferencial más preciso de melanoma (panal A, 9p21, Pl 6 (CDKN2A) de y leucemia (Panel B, 11q23, MLL).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir sondas de ácido nucleico complementarias a una secuencia diana, que comprende las etapas de:

a. obtener polinucleótidos bicatenarios que se sabe que contienen secuencias diana complementarias y secuencias repetitivas;
b. fragmentar dichos polinucleótidos bicatenarios en fragmentos;
c. desnaturalizar dichos fragmentos en hebras individuales;
d. hibridar dichas secuencias repetitivas para formar una mezcla de hebras dobles y hebras individuales;
e. escindir las hebras dobles; y
f. amplificar dichas hebras individuales donde dichas hebras individuales son complementarias a dichas secuencias diana.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional de adición de cebadores de PCR a dichos fragmentos de la etapa (b) antes de la desnaturalización de la etapa (c).

3. El método de la reivindicación 1, en el que dichos fragmentos de la etapa (c) comprenden polinucleótidos seleccionados de un grupo que consiste en fragmentos clonados, fragmentos genómicos amplificados, fragmentos de ADNc y combinaciones de los mismos.

4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha hibridación a dichas secuencias repetitivas es con un competidor no específico de secuencias repetitivas seleccionadas de un grupo que consiste en ADN de esperma de salmón sonicado, ADN COT-1, ARNt de *E. coli*, ADN genómico total placentario, Alu clonado y combinaciones de los mismos.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de escisión se realiza por digestión enzimática específica de ADN bicatenario.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha digestión enzimática resulta de la actividad de una nucleasa específica de dúplex seleccionada de un grupo que consiste en endonucleasas dependientes de cationes, endonucleasa dependiente de Ca y de Mg, nucleasas no específicas de ADN/ARN y combinaciones de las mismas.

7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha endonucleasa dependiente de cationes es ADNasa K del cangrejo Kamchatka.

8. El método de la reivindicación 6, en el que dicha nucleasa no específica de ADN/ARN es ADNasa termoinestable del camarón *Pandalus borealis*.

9. El método de la reivindicación 1, en el que las hebras individuales amplificadas de la etapa (f) se fijan a un marcador que contiene un resto seleccionado de un grupo que consiste en isotopo radiactivo, enzimas, biotina, avidina, estreptavidina, digoxigenina, agente luminiscente, colorante, hapteno o combinaciones de los mismos.

10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho agente luminiscente se selecciona de un grupo que consiste en radioluminiscente, quimioluminiscente, bioluminiscente, fotoluminiscente y combinaciones de los mismos.

11. El método de la reivindicación 1, en el que las hebras individuales amplificadas de la etapa (f) se fijan a un grupo fluoróforo.

12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho grupo fluoróforo se fija a través de un enlace seleccionado de un grupo que consiste en enlace covalente, enlace coordinador metálico, derivados de biotina y combinaciones de los mismos.

13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho enlace coordinador metálico es enlace coordinador de platino.

Figura 1

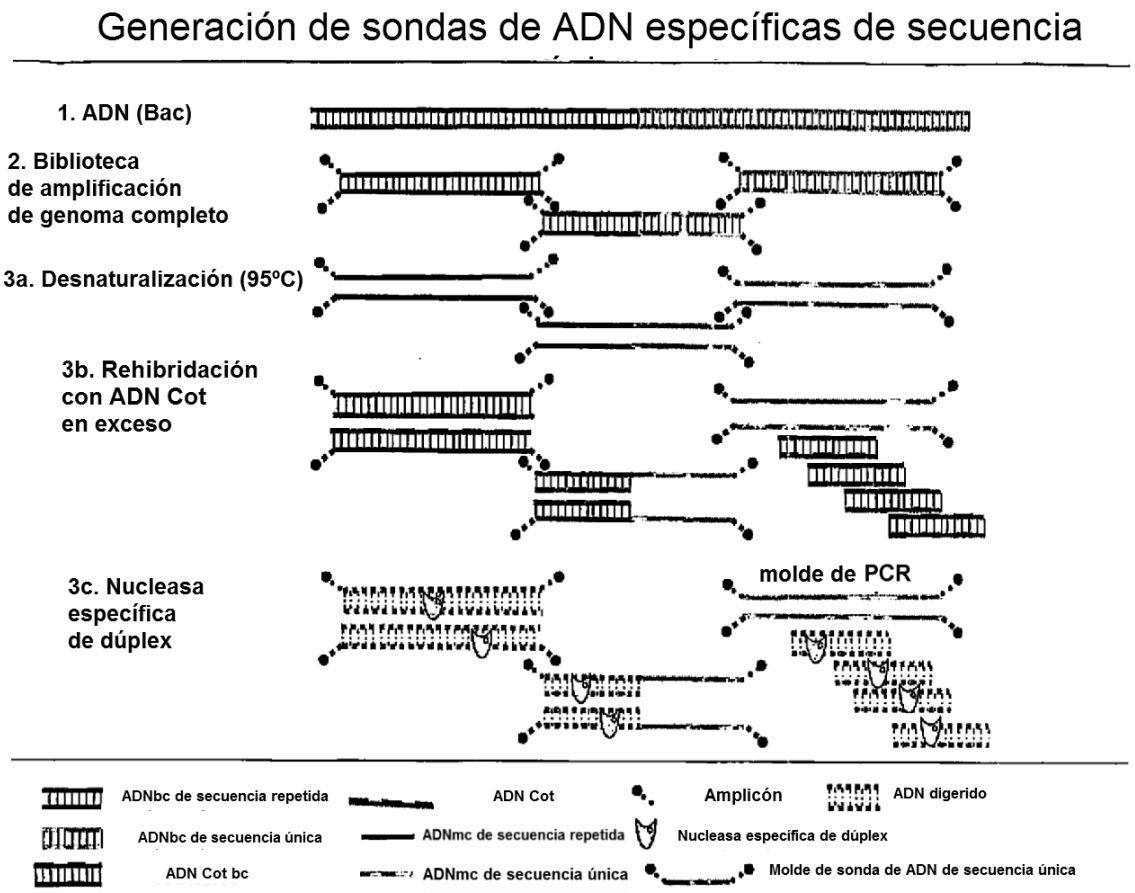

Generación de sondas de ADN específicas de secuencia
1. ADN (Bac)
2. Biblioteca de amplificación de genoma completo
3a. Desnaturalización (95ºC)
3b. Rehibridación con ADN Cot en exceso
3c. Nucleasa específica de dúplex
molde de PCR
ADNbc de secuencia repetida
ADN Cot
Amplicón
ADN digerido
ADNbc de secuencia única
ADNmc de secuencia repetida
Nucleasa específica de dúplex
ADN Cot bc
ADNmc de secuencia única
Molde de sonda de ADN de secuencia única

Figura 2

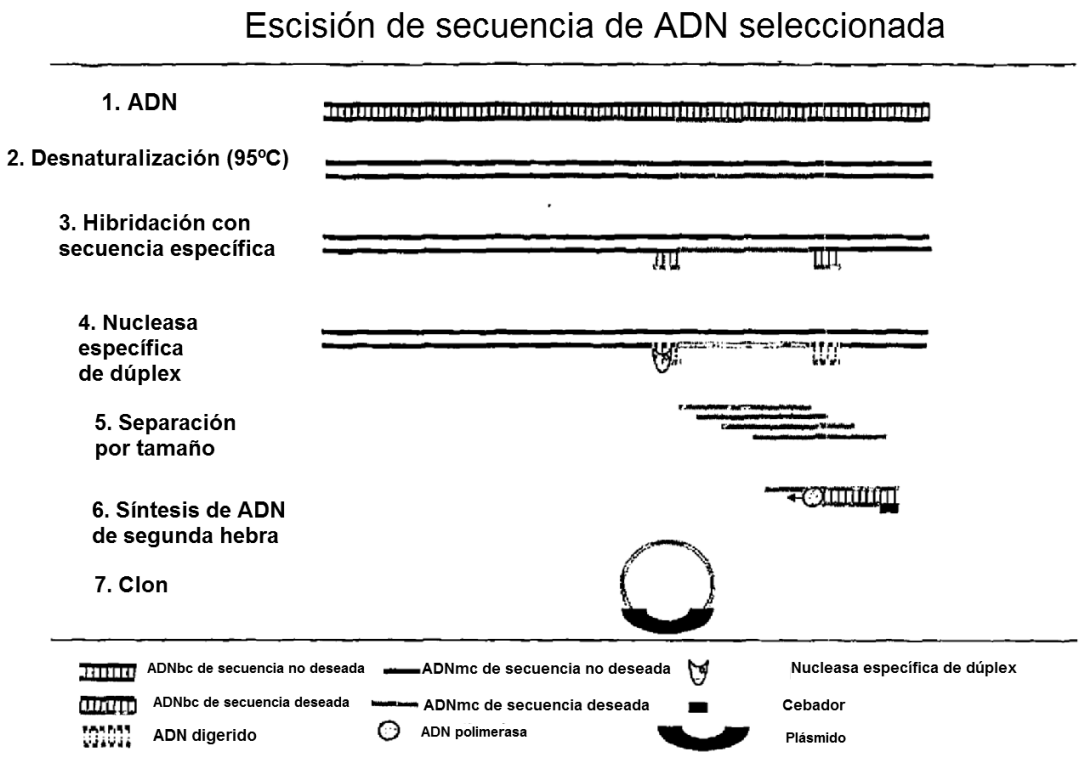
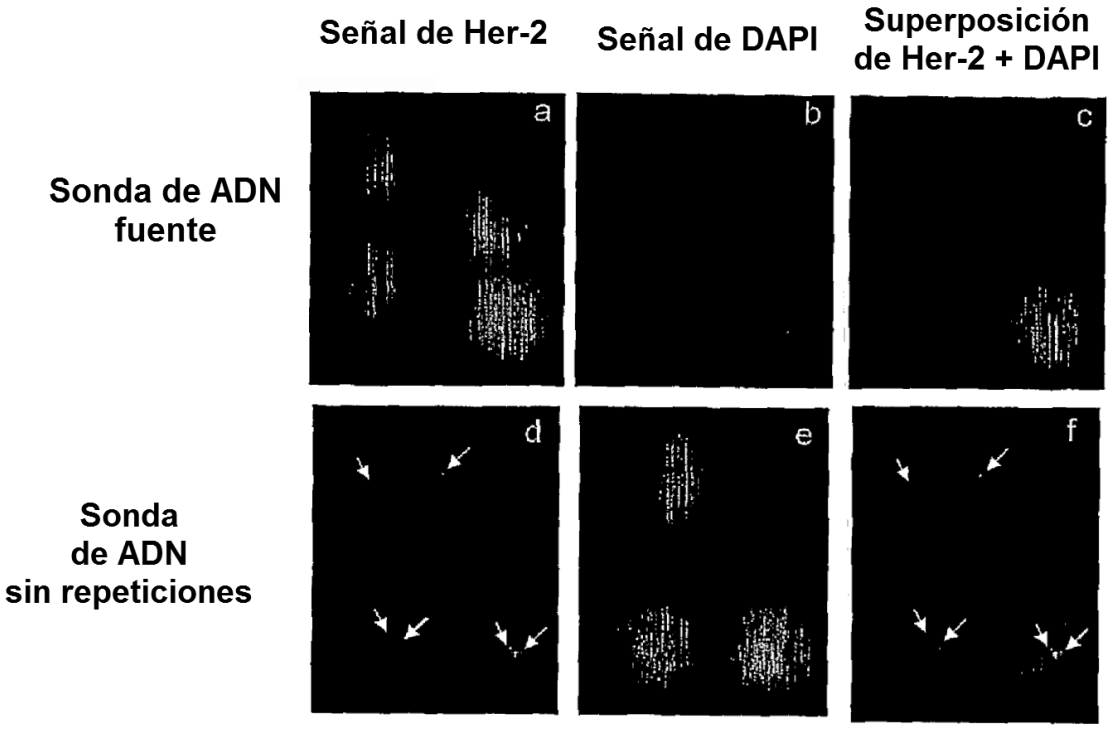

Escisión de secuencia de ADN seleccionada
1. ADN
2. Desnaturalización (95ºC)
3. Hibridación con secuencia específica
4. Nucleasa específica de dúplex
5. Separación por tamaño
6. Síntesis de ADN de segunda hebra
7. Clon
ADNbc de secuencia no deseada
ADNbc de secuencia deseada
ADN digerido
ADNmc de secuencia no deseada
ADNmc de secuencia deseada
ADN polimerasa
Nucleasa específica de dúplex
Cebador
Plásmido

Figura 3


Señal de Her-2
Señal de DAPI
Superposición de Her-2 + DAPI
Sonda de ADN fuente
Sonda de ADN sin repeticiones
a
b
c
d
e
f

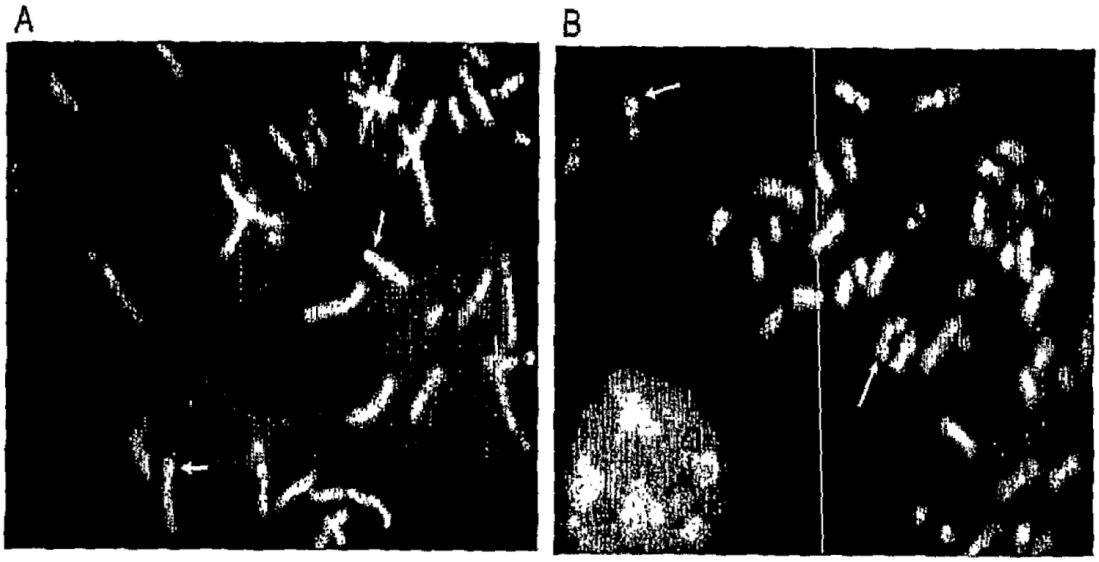



Figura 4