

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 754**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2010 PCT/EP2010/004570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012280**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2010 E 10739866 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2459743**

54 Título: **Conjunto de sondas de oligonucleótidos así como métodos y usos relacionados con el mismo**

30 Prioridad:

30.07.2009 EP 09009970

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

07.12.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, FRANK;
EBERLE, WALTER;
FISCHER, THOMAS y
VON DER ELTZ, HERBERT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 645 754 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

Conjunto de sondas de oligonucleótidos así como métodos y usos relacionados con el mismo

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende (i) un conjunto de sondas de oligonucleótidos adecuado para hibridación *in situ* que comprende al menos 100 sondas de oligonucleótidos de una sola hebra diferentes dirigidas contra una secuencia diana genómica no repetitiva de interés y (ii) una ficha de producto, en la que cada uno de los oligonucleótidos individuales comprende al menos una marca, en los que dicha marca es adecuada para detección por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de dicho kit para detección mediante hibridación *in situ* de una secuencia diana genómica. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para detectar una secuencia diana genómica de interés, comprendiendo dicho método las etapas de incubación de dicho conjunto de sondas de oligonucleótidos con una muestra en condiciones que conducen a la unión del conjunto de sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana genómica de interés en el que no se realiza una etapa de calentamiento adecuada para disolver estructuras secundarias antes de la unión, y detección de la unión de las sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana genómica.

La hibridación *in situ* (ISH) se ha convertido en una herramienta indispensable en una diversidad de áreas de investigación y diagnósticos clínicos. La hibridación *in situ* (ISH) representa una técnica única en la que se combinan técnicas moleculares biológicas e histoquímicas para estudiar la expresión genética en secciones de tejido o preparaciones citológicas ya que permite la detección y localización tanto de ADN como de ARN en células específicas. El análisis de ISH fue descrito en primer lugar en 1969 e implica una reacción de hibridación entre una sonda de nucleótidos marcada y un ADN o ARN complementario, cuyos híbridos se pueden detectar mediante diversos procedimientos dependiendo de la naturaleza de la marca incorporada. La introducción de sistemas de marcado y detección de sondas no radiactivos a finales de la década de 1970 ha hecho que el análisis de hibridación *in situ* sea viable en laboratorios de patología de diagnóstico como una herramienta de diagnóstico molecular. La ISH localiza secuencias genéticas *in situ* y visualiza el producto de expresión genética a la vez que se conserva la integridad celular dentro del tejido heterogéneo. La ventaja principal del método de ISH es su especificidad hacia dianas individuales en un tejido o población celular heterogéneos, así como su sensibilidad para detectar la expresión genética de pocas copias o formación de mapas cromosómicos. La ISH consiste en múltiples etapas que incluyen preparación y marcado de la sonda, preparación del tejido, hibridación, y detección de señales (para una revisión, véase, por ejemplo, Jin *et al.*, 2001, Morphology Methods: Cell and Molecular Biology Techniques: 27-46).

La transferencia de Southern y por ranuras fueron los primeros métodos de detección de HER-2 basados en genes usados en muestras de ensayo de cáncer de mama. La técnica FISH (hibridación de fluorescencia *in situ*), que es dirigida por la morfología y que se puede automatizar como IHC, tiene las ventajas de un sistema de puntuación más objetivo y la presencia de un control interno integrado que consiste en las dos señales genéticas de HER-2 presentes en todas las células no neoplásicas en la muestra de ensayo. Las desventajas del ensayo de FISH incluyen los altos costes de cada ensayo, tiempo requerido para la puntuación del portaobjetos más largo, necesidad de un microscopio de fluorescencia, la incapacidad de conservar los portaobjetos para su almacenamiento y revisión, y ocasionalmente la identificación de las células tumorales invasivas. Hasta ahora, dos versiones de un ensayo ISH están aprobadas por la FDA: el ensayo Inform™ de Ventana que mide solo las copias del gen HER-2 y el ensayo Pathvysion™ de Abbott-Vysis que incluye una sonda del cromosoma 17 en un formato de doble color, y ambos se describen como altamente correlativos (para revisión, véase, por ejemplo, Ross *et al.*, 2004, Molecular and Cellular Proteomics 3.4: 379-398).

El método de hibridación cromogénica *in situ* (también denominado técnica CISH) presenta las ventajas tanto de la inmunohistoquímica (es decir, microscopio de rutina, bajos costes) como FISH (es decir, control interno integrado, puntuación objetiva, la diana de ADN más robusta). Por ejemplo, tanto el método FISH como el CISH se usaron para comparar 31 casos de carcinoma de mama infiltrante con ensayos realizados en laboratorios en dos instituciones y se encontraron resultados idénticos para ambos métodos en 26 (84 %) de los casos (Gupta *et al.*, 2003, Am. J. Clin. Pathol., 119: 381-387). Los métodos de detección CISH e IHC se pueden combinar para proporcionar una evaluación simultánea del número de copias genéticas y expresión de proteínas, pero los métodos de este tipo aún no se han adoptado en la práctica clínica.

Para la hibridación *in situ* se pueden usar tres tipos principales de sondas, que incluyen (i) sondas de ADN complementarias bicatenarias, (ii) sondas de ARN antisentido monocatenarias, y (iii) sondas de oligonucleótidos sintéticas. Al igual que otras técnicas de hibridación, el diseño, la síntesis y el marcado de la sonda desempeñan un papel fundamental para la hibridación *in situ* con éxito con respecto a especificidad y sensibilidad. Los procedimientos de marcado convencionales por lo general incluyen la aplicación de métodos enzimáticos. Aunque las sondas de ADN bicatenario se pueden marcar mediante métodos de traducción de marca enzimática o de cebadores aleatorios, las sondas de ARN antisentido normalmente se sintetizan y marcan mediante métodos de transcripción *in vitro*. Sin embargo, estos métodos dan como resultado la generación de sondas no definidas, en las que las posiciones, así como el número de marcas no están definidas y no son conocidas por el experto. Además, el marcado enzimático requiere habilidades más experimentales de la persona que realiza dicho marcado, ya que la cantidad de marca incorporada depende de una serie de variables que incluyen por ejemplo la actividad enzimática

y/o la cantidad de marca presente. Por último, con respecto a las posiciones exactas y la cantidad de marca incorporada, cada marca podría tener un resultado diferente, ya que la reacción de marcado es el resultado de un procedimiento aleatorio.

5 Las sondas de oligonucleótidos, sin embargo, normalmente se marca mediante métodos de marcado en los extremos de las posiciones 5' o 3' que incluyen, por ejemplo, la "adaptación" de la sonda incorporando relativamente pocos nucleótidos marcados. Debido a la cantidad limitada de marca por sonda, la sensibilidad de las sondas marcadas en el extremo es bastante baja.

10 Las sondas de oligonucleótidos usadas para hibridación *in situ* son en su mayoría de corta duración y a menudo menos sensibles que las sondas de ADNc o ARN antisentido más largas. Por lo tanto, hasta ahora, las sondas de oligonucleótidos se han usado principalmente para la detección de dianas genéticas altamente abundantes y/o repetitivas, o para formación de mapas de la expresión de familias de genes particulares en el cerebro (véase, por ejemplo, Wisden y Morris, 2002, International Review of Neurobiology, Vol. 47, Capítulo 1). Las dianas genéticas que se han analizado mediante procedimientos de hibridación *in situ* usando sondas de oligonucleótidos incluyen adicionalmente, por ejemplo, transcripciones de ARNm abundantes tales como β -actina (Perlette y Tan, 2001, Anal Chem 73: 5544-5550), transcripciones de ARNm de genes que se expresan abundantemente en células neuroendocrinas y tumores con gránulos secretores (Lloyd, R., 1995, Diagnostic Molecular Pathology 4 (2): 143-151), y ARNr ribosómico (Behrens *et al.*, 2004, Systematic and Applied Microbiology, 27, 565-572; Silverman y Kool, 2007, Advances in Clinical Chemistry, Vol. 43: 79-115), así como secuencias diana altamente repetitivas tales como las regiones centroméricas de los cromosomas humanos (véase, por ejemplo, el documento WO 96/00234).

25 Sin embargo, el uso de sondas de oligonucleótidos para la detección y/o el análisis de genes que están presentes solo en una extensión baja que incluyen, por ejemplo, genes marcadores tumorales poco abundantes, mediante la aplicación de rutina y alto rendimiento de métodos de hibridación podría ser de interés en particular en medicina moderna, diagnóstico y terapia para el cáncer, ya que las sondas de oligonucleótidos se pueden sintetizar en cantidades elevadas y con bajos costes. Por consiguiente, existe la necesidad de un método de detección sensible que use sondas de oligonucleótidos.

30 Por lo tanto, un objeto de la presente invención era proporcionar un método alternativo para detección de genes, en particular para secuencias diana de baja abundancia, que requiere métodos de detección sensibles.

35 En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que un método que usa un "cóctel" de al menos 100 sondas de oligonucleótidos monocatenarias diferentes que son complementarias a diferentes regiones de una molécula diana es particularmente adecuado para detectar genes de baja abundancia. En particular, se ha encontrado que un cóctel de este tipo es particularmente adecuado para detectar una secuencia diana genómica de interés en un periodo de tiempo reducido (véase Fig. 1) con la necesidad de una cantidad reducida de sondas (véase Fig. 2) y con especificidad una más elevada (véase Fig. 1-3) en comparación con los métodos de detección conocidos y descritos en la técnica (véase, por ejemplo, Weiss *et al.*, 1990, American Journal of Pathology, Vol. 137, N.º 4: 979-988; Lloyd, R., 1995, Diagnostic Molecular Pathology 4 (2): 143-151). Por consiguiente, es evidente que dichos métodos son superiores a los conocidos y descritos en la técnica por que son más rápidos, más baratos, más sensibles y/o más predecibles.

45 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende

- un conjunto de sondas de oligonucleótidos adecuadas para hibridación *in situ*, conjunto de sondas que comprende al menos 100 sondas de oligonucleótidos de una sola hebra diferentes dirigidas contra una secuencia diana genómica no repetitiva de interés, en el que cada una de las sondas de oligonucleótidos individuales comprenden al menos una marca, en las que dicha marca es adecuada para detección por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta; y
- una ficha de producto.

55 Las sondas de oligonucleótidos de una sola hebra son particularmente ventajosas para detectar una secuencia genómica de interés, ya que (i) no es necesaria ninguna etapa de calentamiento para garantizar la disolución de las estructuras secundarias, y (ii) se omite la rehibridación de las hebras complementarias de la sonda.

60 La expresión "sonda de oligonucleótidos" como se usa en el presente documento se refiere en general a cualquier tipo de molécula de nucleótido sintetizada para que coincida con una secuencia de interés de nucleótido que se puede usar para detectar, analizar, y/o visualizar dicha secuencia de nucleótidos a nivel molecular. Una sonda de oligonucleótidos de acuerdo con la invención por lo general se refiere a una molécula que comprende (i) varios nucleótidos, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 15, y lo más preferentemente al menos 20 nucleótidos, y (ii) al menos una marca. Opcionalmente, la sonda de oligonucleótido también puede comprender cualquier unidad no nucleotídica adecuada y/o un reactivo de unión que puede ser adecuado para incorporar la marca. Para la persona experta será evidente que la sonda de oligonucleótido tiene una longitud adecuada para proporcionar la especificidad requerida. En general, la sonda puede ser una sonda de oligonucleótido de ADN o una

sonda de oligonucleótido de ARN, preferentemente una sonda de oligonucleótido de ADN. Por consiguiente, un nucleótido incluye todo tipo de estructuras formadas por una nucleobase (es decir, una base nitrogenada), un azúcar de cinco carbonos que puede ser cualquiera de una ribosa, una 2'-desoxirribosa, o cualquier derivado de las mismas, y un grupo fosfato. La nucleobase y el azúcar constituyen una unidad denominada nucleósido. Los grupos fosfato pueden formar enlaces con el carbono 2, 3, o el 5, en particular con los carbonos 3 y 5 del azúcar. En el contexto de la presente invención, el término "nucleótido" también se refiere a un ribonucleótido o a un desoxirribonucleótido. Un ribonucleótido contiene una ribosa como resto de azúcar, mientras que un desoxirribonucleótido contiene una desoxirribosa como resto de azúcar. Los nucleótidos pueden contener una base de purina o pirimidina. Por consiguiente, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención pueden estar constituidas por ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o por cualquier combinación de los mismos, y pueden incluir adicionalmente uno o más nucleótidos modificados. Opcionalmente, las sondas de oligonucleótidos pueden comprender además solo nucleótidos modificados. Las formas ribo y desoxi de nucleótidos modificados pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, nucleósidos de 5-propinil-uridina, 5-propinil-citidina, 5-metil-citidina, 2-amino-adenosina, 4-tiouridina, 5-yodouridina, N6-metil-adenosina, 5-fluorouridina, inosina, 7-propinil-8-aza-7-desazapurina y 7-halo-8-aza-7-desazapurina. Las sondas de oligonucleótidos de la invención pueden comprender además modificaciones de la estructura principal tales como, por ejemplo, 2'-O-metil (2'-OMe) ARN, 2'-fluoro (2'-F) ADN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), o ácidos nucleicos bloqueados (LNA). 2'-OMe ARN es una modificación de la estructura principal particularmente adecuada por que se hibrida más fuertemente que el ADN y, a diferencia del ARN natural, es extremadamente estable para RNAsas y DNAsas. El LNA es una clase de análogos de oligonucleótidos conformacionalmente limitados en los que un ribonucleósido está unido con un grupo metileno entre el 2'-O y el 4'-C. Se asemeja a los ácidos nucleicos naturales con respecto al emparejamiento de bases y la formación de dúplex, pero los dúplex de LNA son térmicamente más estables en comparación con los respectivos dúplex de ADN o ARN (Silverman y Kool, 2007, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 43: 79-115). Opcionalmente, las sondas de oligonucleótidos de la invención pueden comprender adicionalmente una o más modificaciones en la cadena principal fosfato tales como, por ejemplo, fosfotioatos o fosfonatos de metilo, que aumentan la estabilidad frente a nucleasas.

Un conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se refiere a una combinación de al menos 100 oligonucleótido diferentes. Estos oligonucleótidos se pueden diferenciar en una o más posiciones del nucleótido, o se pueden diferenciar en su secuencia completa entre sí. Preferentemente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención comprende más 100 oligonucleótidos diferentes, en particular al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 oligonucleótidos diferentes. Más preferentemente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende al menos 1000 sondas de oligonucleótidos diferentes, especialmente al menos 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, o 5000 sondas de oligonucleótidos diferentes.

Por consiguiente, en una realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención comprende al menos 200, 300 o 400 sondas de oligonucleótidos diferentes, en particular al menos 500 sondas de oligonucleótidos diferentes, más en particular al menos 1000 sondas de oligonucleótidos diferentes. Con el número creciente de diferentes sondas de oligonucleótidos, la sensibilidad y la especificidad del método de detección aumenta (véase la Fig. 3).

Además, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se caracteriza adicionalmente por que cada una las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud definida. Esta longitud está constituida por un número definido de nucleótidos, opcionalmente incluyendo adicionalmente un número definido de reactivos de unión no nucleotídicos. La generación de sondas de oligonucleótidos con una longitud definida proporciona una ventaja con respecto a los métodos conocidos en la técnica que emplean etapas de fragmentación y por lo tanto dan como resultado la generación de sondas de oligonucleótidos con una distribución de la longitud aleatoria. Preferentemente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la presente invención se caracteriza por que cada una de las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud definida de 20 a 200 nucleótidos, o de 40 a 175 nucleótidos, o de 60 a 150 nucleótidos, o de 80 a 120 nucleótidos. Sin embargo, para la persona experta es evidente que los límites superiores e inferiores mencionados anteriormente también saben combinar para llegar a diferentes intervalos. Por consiguiente, las sondas de oligonucleótidos también pueden tener una longitud de 20 a 150, o de 60 a 120, o de 80 a 150, o de 30 a 180. El conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención puede comprender sondas de oligonucleótidos que tienen la misma longitud, o puede comprender sondas de oligonucleótidos con diferente longitud si se considerara apropiado.

Por consiguiente, en una realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que cada una de las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud de 20 a 200 nucleótidos, preferentemente de 40 a 175 nucleótidos, más preferentemente de 60 a 150 nucleótidos, especialmente de 80 a 120 nucleótidos.

Se ha encontrado que las sondas de oligonucleótidos con una longitud de aproximadamente 80 a 120 nucleótidos son particularmente adecuadas para detectar una secuencia diana genómica de acuerdo con la presente invención.

65

Como requisito previo para obtener los resultados como se describe en el contexto de la presente invención, el conjunto de sondas de oligonucleótidos debe comprender adicionalmente un número mínimo total de marcas incorporadas. Es decir, cuanto más corta sea la longitud de las sondas de oligonucleótidos, se tienen que incorporar, juntar, conjugar y/o unir más marcas por oligonucleótido a cada una de las moléculas individuales o se deberían usar más sondas de oligonucleótidos para proporcionar un conjunto de oligonucleótidos que sea adecuado para detectar la secuencia diana genómica de interés en las condiciones que se describen en el mismo. Para controlar la incorporación de marcas, las sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se generan preferentemente mediante síntesis química. Las ventajas de la síntesis química con respecto a la aplicación de enfoques enzimáticos son el proceso de generación de sondas rápido y rentable así como el control sobre la longitud exacta del fragmento, secuencia, número y posiciones de marcas. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, se ha encontrado que es particularmente favorable si las sondas de oligonucleótidos comprenden al menos cinco marcas en presencia de aproximadamente 80 a 90 nucleótidos. Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos comprenden al menos incluso ocho o más marcas en presencia de aproximadamente 80 a 90 nucleótidos. Los oligonucleótidos que comprenden un número definido de marcas incorporadas de acuerdo con la presente invención se ejemplifican, por ejemplo, en la Figura 5.

Por consiguiente, en otra realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos se caracteriza por que cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende al menos dos o tres marcas, en particular al menos cinco marcas, más particularmente al menos 10 marcas, y lo más particularmente al menos 15 marcas.

Como se encuentra en el contexto de la presente invención, las sondas de oligonucleótidos desvelan un aumento de la sensibilidad con el aumento de la incorporación de marcas. Sin embargo, se debe tener cuidado para que la presencia de demasiadas marcas, sin embargo, la interfiera con la hibridación satisfactoria y por lo tanto con la funcionalidad. Por consiguiente, se ha encontrado que la presencia de 5 a 15 marcas por oligonucleótido (dependiendo de la longitud de la molécula individual) es importante para establecer resultados óptimos.

Más preferentemente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que (i) cada una de las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud de 20 a 200 nucleótidos, preferentemente de 40 a 175 nucleótidos, más preferentemente de 60 a 150 nucleótidos, especialmente de 80 a 150 nucleótidos, y (ii) por que cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende al menos dos o tres marcas, en particular al menos cinco marcas, más particularmente al menos 10 marcas, y lo más particularmente al menos 15 marcas.

En particular, cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende al menos cinco marcas y tiene una longitud de 20 a 200 nucleótidos, preferentemente de 40 a 175 nucleótidos, más preferentemente de 60 a 150 nucleótidos, especialmente de 80 a 150 nucleótidos.

Más preferentemente, cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende al menos 10 marcas y tiene una longitud de 20 a 200 nucleótidos, preferentemente de 40 a 175 nucleótidos, más preferentemente de 60 a 150 nucleótidos, especialmente de 80 a 150 nucleótidos.

Aún más preferentemente, cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende al menos 15 marcas y tiene una longitud de 20 a 200 nucleótidos, preferentemente de 40 a 175 nucleótidos, más preferentemente de 60 a 150 nucleótidos, especialmente de 80 a 150 nucleótidos.

Como alternativa, cada una de las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud de 60 a 150 nucleótidos y comprende al menos dos o tres marcas, en particular al menos cinco marcas, más particularmente al menos 10 marcas, y lo más particularmente al menos 15 marcas.

Más preferentemente, cada una de las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud de 80 a 150 nucleótidos y comprende al menos dos o tres marcas, en particular al menos cinco marcas, más particularmente al menos 10 marcas, y lo más particularmente al menos 15 marcas.

La expresión "dirigida contra" como se hace referencia en el contexto de la presente invención por lo general se refiere a que la sonda de oligonucleótidos de la presente invención se puede unir a una secuencia diana de interés por medio de pares de bases complementarias. Los pares de bases complementarias se forman entre dos moléculas de nucleótidos (incluyendo opcionalmente modificaciones) que son complementarias entre sí. En el contexto de la presente invención, los pares de bases complementarias formadas entre la sonda de oligonucleótidos y la secuencia diana pueden incluir todos los tipos de pares de bases canónicas o no canónicas, que incluyen, pero no se limitan a, pares de bases A-U de Watson-Crick, A-T de Watson-Crick, G-C de Watson-Crick, G-U de Wobble, pares de bases A-U y A-C de Hoogsteen inversas, o pares de bases de purina-purina y pirimidina-pirimidina tal como pares de bases de G-A cortadas o pares de bases de imino de G-A.

La expresión "secuencia diana genómica" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a una región en particular de un genoma de un organismo eucariota. En el contexto de la presente invención, una secuencia diana genómica se refiere preferentemente a una región definida del genoma humano. El genoma

humano haploide está formado por un número total de más de 3 billones de pares de bases de ADN y contiene un cálculo estimado de aproximadamente 30.000 secuencias codificantes de proteínas. Es decir, solo aproximadamente un 1,5 % del genoma codifican proteínas, mientras que las partes restantes contienen miles de genes de ARN tales como genes que codifican ARNt, ARN ribosómico, microARN u otros ARN no codificantes, secuencias reguladoras, intrones y secuencias repetitivas. Las secuencias repetitivas del genoma humano incluyen, pero no se limitan a, centrómeros, telómeros, repeticiones en tándem tales como ADN satélite, ADN minisatélite, ADN microsátélite, y repeticiones intercaladas tales como los SINE (Elementos nucleares intercalados cortos) y los LINE (Elementos nucleares intercalados largos). Por consiguiente, la expresión "secuencia diana genómica" puede comprender, pero no se limita a, una secuencia de un gen en particular o una parte del mismo, y pueden incluir adicionalmente secuencias reguladoras, secuencias no codificantes, secuencias repetitivas o no repetitivas. En la presente invención, la secuencia diana genómica es una secuencia diana genómica no repetitiva. Preferentemente, la secuencia diana genómica de la presente invención se refiere a un locus genético definido que comprende un gen en particular.

En general, los genes se distribuyen de manera no uniforme a través del genoma del organismo, es decir, a través de los diferentes cromosomas. Es decir, la secuencia diana genómica de la presente invención puede hacer referencia a una región de longitud variable y/o a una región que se extiende con respecto a diferentes regiones de un cromosoma, y/o se extiende con respecto a diferentes cromosomas. En particular, la secuencia diana genómica puede hacer referencia a una o más regiones individuales. Preferentemente, la secuencia diana genómica de la presente invención se refiere a un locus genético, es decir, a una región específica en un cromosoma en la que se localiza un cromosoma. La secuencia diana genómica de la presente invención puede comprender regiones de tamaños variables que incluyen, pero no se limitan, a regiones con un tamaño de hasta 1 MB.

Sin embargo, se debe entender que las sondas de oligonucleótidos se dirigen contra diferentes secuencias diana, es decir, contra una región diferente, dentro de la secuencia diana genómica de la presente invención. Es decir, aunque el conjunto de sondas de oligonucleótidos que comprende al menos 100 sondas de oligonucleótidos individuales diferentes se dirige, en total, contra una secuencia diana genómica, que comprende preferentemente un locus genético en particular, cada una de las sondas de oligonucleótidos individuales se dirige contra una de las subsecuencias en particular que se encuentra dentro de esta región.

La expresión "marca" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a cualquier tipo de sustancia o agente que se puede incorporar y/o unir a las sondas de oligonucleótidos de la presente invención, y que se puede usar para visualizar, detectar, analizar y/o cuantificar la sonda de oligonucleótidos cuando se une a su secuencia diana. De acuerdo con la invención, la marca es adecuada para detección por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta. Una marca de acuerdo con la presente invención puede incluir, pero no se limita, radioisótopos tales como, por ejemplo, ³⁵S, ³²Fósforo (³²P), ³³Fósforo (³³P), ³H o ¹⁴C, cualquier molécula fluorescente o fluoróforo que se pueda detectar y/o visualizar por medio de análisis de fluorescencia tal como colorantes de fluoresceína que incluyen, pero no se limitan a, carboxifluoresceína (FAM), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), tetraclorofluoresceína (TET), y hexaclorofluoresceína, colorantes de rodamina tales como, por ejemplo, carboxi-X-rodamina (ROX), Rojo Texas y tetrametilrodamina (TAMRA), colorantes de cianina tales como colorantes de pirilio cianina, DY548, Quasar 570, o Cy3, Cy5, Alexa 568, y similares. La elección de la marca fluorescente por lo general se determina mediante sus propiedades espectrales y por la disponibilidad de equipo para formación de imágenes. Las marcas fluorescentes están disponibles en el mercado en diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, a Invitrogen™ (USA). Una marca de la presente invención también puede ser un hapteno tal como digoxigenina (DIG), biotina, o 2,4-dinitrofenilo (DNP). Estas marcas así como sus estrategias de detección son bien conocidas por la persona con experiencia en la materia, y se describen, por ejemplo, en Jin *et al.*, 2001 (Morphology Methods: Cell and Molecular Biology Techniques, 27-48), Krick, 2002 (Ann. Clin. Biochem. 39: 114-12), o Grzybowski *et al.*, 1993 (Nucleic Acids Research, Vol. 21, N.º 8: 1705-1712).

Además, la marca de la invención se puede unir a la sonda de oligonucleótidos mediante conjugación química a un nucleótido o a un reactivo de unión no nucleotídico (es decir, marcado directo), o mediante conjugación química del nucleótido o del reactivo de unión no nucleotídico a una molécula que se puede unir a una marca (es decir, marcado indirecto). En el marcado indirecto, la molécula unida directamente a la sonda de oligonucleótidos por lo general es cualquiera de un hapteno tal como 2,4-dinitrofenilo (DNP), digoxigenina (DIG), o biotina. En el marcado directo, la molécula unida a la sonda de oligonucleótidos por lo general es un colorante fluorescente. Las estrategias de detección de las diferentes marcas de acuerdo con la presente invención se describen con detalle a continuación.

La marca de la presente invención se puede unir adicionalmente a cualquiera del extremo en la posición 5' y/o el extremo en la posición 3' de la sonda de oligonucleótidos, o se puede incorporar internamente en la sonda de oligonucleótidos a través de unión a uno o más nucleótidos o fosfatos modificados. Como alternativa, la marca de la presente invención también se puede incorporar en la sonda de oligonucleótidos a través de unión a uno o más reactivos de unión no nucleotídicos. Opcionalmente, la marca se puede incorporar en la sonda de oligonucleótidos en un proceso de 2 etapas, por ejemplo mediante la introducción de grupos reactivos tales como grupos amino, azido o alquino en las sondas de oligonucleótidos y mediante acoplamiento de la marca en una segunda etapa a través de formación de enlaces amida o química click. La expresión "química click" como se usa en el presente

documento por lo general se refiere a cualquier reacción bioortogonal que permita la formación eficaz de un producto específico dentro de un entorno químico altamente complejo. En particular, se refiere a una reacción química que permite la incorporación de una o más marcas reactivas en una diana biomolecular y la posterior selectividad elevada en la derivatización de la marca dentro de una muestra biológica compleja. La persona con experiencia en la materia conoce los principios de la química y se describen, por ejemplo, en Best, M.D. (Biochemistry 2009, 48 (28): 6571-6584). Otra forma de introducir una marca de la presente invención es, por ejemplo, acoplar la marca a través de la etapa de oxidación durante la síntesis de oligonucleótidos basada en fosforamidita como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/059816.

El conjunto de sondas de oligonucleótidos de la presente invención se puede diseñar un modo tal que cada uno de los oligonucleótidos individuales esté presente en una o más copia/copias, preferentemente en múltiples copias. Preferentemente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos se diseña de un modo tal que cada una de las sondas de oligonucleótidos individuales esté presente en cantidades equimolares y/o concentraciones similares. Los métodos sobre cómo calcular la concentración y/o la molaridad de las moléculas de ácido nucleico son de conocimiento convencional para la persona con experiencia en la materia. Además, el conjunto de sondas de oligonucleótidos se diseña preferentemente de un modo tal que cada copia de una sonda de oligonucleótidos individual tenga la misma secuencia idéntica y contenga un algo más marcas en posiciones idénticas. Cada una de las sondas de oligonucleótidos individuales presente en una o múltiples copia/copias constituye un subconjunto de sondas de oligonucleótidos.

Por consiguiente, en otra realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención comprende uno o más subconjuntos de sondas de oligonucleótidos, en el que cada subconjunto consiste en sondas de oligonucleótidos con secuencias idénticas que tienen marcas en posiciones idénticas.

Como se encuentra en el contexto de la presente invención, los subconjuntos de sondas de oligonucleótidos con secuencias idénticas y con marcas en posiciones idénticas son particularmente ventajosos, ya que sus propiedades bioquímicas son conocidas por el investigador, con la consecuencia de que las posiciones más favorables para la incorporación de marcas se pueden elegir y, además, se pueden evitar las posiciones no favorables, por ejemplo las posiciones que podrían dar como resultado una interrupción desventajosa de una señal de fluorescencia.

Las sondas de oligonucleótidos de la presente invención se caracterizan adicionalmente por que la marca se inserta en una posición definida durante la síntesis química del oligonucleótido. Es decir, un número definido de marcas se pueden incorporar en la molécula mediante la incorporación de nucleótidos modificados en una posición definida a la que se une, relaciona y/o conjuga una marca, o mediante la incorporación de reactivos de unión no nucleotídicos que pueden servir como una plataforma para unión de marcas. La inserción de marcas en posiciones definidas también incluye el procedimiento de incorporación de la marca durante la etapa de oxidación en la síntesis de oligonucleótidos basada en fosforamidita (véase, por ejemplo, el documento WO 2007/059816). Preferentemente, la incorporación de una marca se produce de un modo tal que las marcas se distribuyen de manera uniforme a través de la sonda de oligonucleótidos. Más preferentemente, las sondas de oligonucleótidos se diseñan de modo tal que las marcas se insertan en la molécula en posiciones con distancias iguales entre sí, especialmente en las posiciones con una distancia de separación de al menos 5, 10, 15, o 20 o más nucleótidos entre sí. Esta distancia espaciadora puede variar de un subconjunto de sondas de oligonucleótidos al otro, y también puede depender de la longitud total de la sonda de oligonucleótidos individual, es decir, la distancia espaciadora entre marcas individuales puede aumentar con la longitud total de la sonda de oligonucleótidos.

Por consiguiente, en una realización preferente, las sondas de oligonucleótidos de la invención comprenden marcas en posiciones casi a la misma distancia, en particular a una distancia de separación de al menos 5, 10, 15, o 20 nucleótidos.

En otra realización preferente, las sondas de oligonucleótidos pueden comprender marcas en posiciones predeterminadas, opcionalmente en posiciones situadas a una distancia predeterminada entre sí.

La ventaja de la colocación de marcas en distancias separadas en particular se puede evitar cualquier efecto negativo que pudiera surgir si las marcas se colocaran demasiado cerca entre sí (por ejemplo, interferencia y/o interrupción si se usa una marca fluorescente). Además, mediante el control de la incorporación de marcas se puede evitar adicionalmente que se introduzcan demasiadas marcas en ciertas posiciones que podrían influir en la eficacia de la hibridación.

La expresión "predeterminada" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a que las posiciones en las que se incorpora, une, conjuga o relaciona la marca se pueden definir diseñando las sondas de oligonucleótidos individuales. Es decir, el término "predeterminada" se refiere a que las marcas no se distribuyen y/o incorporan de forma aleatoria tal como, por ejemplo, en el caso de enfoque esté marcado enzimático. Una posibilidad del reconocimiento y/o determinación de las posiciones de la marca predeterminadas se produce si la distribución de marcas dentro de una molécula sigue un cierto patrón. Además, las posiciones predeterminadas también pueden ser evidentes cuando se analiza la distribución de las marcas dentro de un subconjunto, por

ejemplo, si cada una de las sondas de oligonucleótidos de uno o más subconjuntos desvela el mismo patrón de marcas incorporadas.

5 Como ya se ha detallado anteriormente, la marca se puede incorporar, unir, conjugar o relacionar directa o indirectamente a la sonda de oligonucleótidos individual.

10 Por lo tanto, en una realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención se caracteriza por que la marca está unida a una base, un azúcar, o un resto de fosfato de un nucleótido, ya sea directa o indirectamente a través de un conector.

15 Mediante la unión de la marca a una a base, un azúcar, o un resto de fosfato, (i) la interrupción y/o alteración potencial del emparejamiento de bases complementarias a la secuencia diana se reduce a un mínimo, e (ii) se pueden usar sondas de oligonucleótidos cortas para conseguir afinidades de unión eficaz.

20 Por ejemplo, una marca de 2,4-dinitrofenilo (DNP) se puede unir directamente a la posición N4 de una citidina. Como alternativa, el nucleótido se puede modificar para permitir y/o facilitar la unión de una marca. Es decir, por ejemplo, un colorante de pirilio cianina se puede unir de forma covalente a un nucleótido de pirimidina modificado con 5-aminoalquilo. La unión directa de una marca a la sonda preferentemente no modifica directamente un sitio en la base purina o una pirimidina que normalmente está implicada en las interacciones de formación de enlaces de hidrógeno de emparejamiento de bases complementarias.

25 La expresión "conector" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a cualquier estructura química que puede servir para acoplar, conjugar, unir covalentemente o añadir una marca a una nucleobase, un azúcar o un resto de fosfato de un nucleótido. Preferentemente, el conector de acuerdo con la presente invención puede incluir, pero no se limita a, estructuras flexibles o rígidas tales como, por ejemplo, conector de etilenglicol, conector de hexaetilenglicol, conector de propargilamino, conector de aminoalquilo, conector de ciclohexilo, conector de arilo, conector de etilenglicol etinilo y conector de etiloxietilamino, o conector de alquilamina. Por lo general, la marca se y a través de un éster activado al conector.

30 Además en otra realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención se caracteriza por que la marca está unida a una unidad no nucleotídica.

35 Una ventaja de unir la marca a una unidad no nucleotídica es que el diseño y la síntesis de las sondas de oligonucleótidos individuales dependen de la secuencia. Es decir, todas las sondas de oligonucleótidos se pueden diseñar de un modo tal que contengan la marca en las mismas posiciones. Además, a diferencia de la aceptación general en la técnica, en el contexto de la presente invención se ha encontrado de forma sorprendente que las suscitadas de unión a la secuencia diana son aún óptimas cuando las marcas se unen a unidades no nucleotídicas.

40 La expresión "unidad no nucleotídica" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a cualquier reactivo o molécula que puede permitir de forma conveniente que un solo resto o múltiples restos, tales como marcas o agentes de intercalado, se una a una sonda de nucleótidos en una posición(s) seleccionada previamente específica en la misma. Una unidad no nucleotídica de acuerdo con la presente invención es preferentemente una unidad monomérica que se puede acoplar de forma sintética con unidades monoméricas nucleotídicas específicas de reactivos nucleotídicos para producir un polímero con una secuencia definida con una estructura principal formada por unidades monoméricas nucleotídicas y no nucleotídicas. Es decir, una unidad no nucleotídica de la invención se puede colocar en cualquier posición deseada dentro de una secuencia de la estructura principal del nucleótido. Una unidad no nucleotídica de la invención puede comprender obligando que es cualquiera de un resto de grupo conector que porta una marca o que puede participar en reacciones de conjugación una vez que se ha desprotegido el grupo conector. Una unidad no nucleotídica de la invención puede contener adicionalmente un resto de azida o alquino adecuado para química click (Best, M.D., Biochemistry 2009, 48 (28): 6571-6584). En la técnica se conoce en grupos protectores adecuados que se pueden usar para proteger el grupo funcional del grupo conector durante la formación de un polímero.

55 Una unidad no nucleotídica de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente dos grupos de acoplamiento para permitir su inclusión en etapas en un polímero de unidades monoméricas nucleotídicas y no nucleotídicas, en la que uno de estos grupos de acoplamiento se define de un modo tal que se pueda acoplar de forma eficaz al extremo de una cadena creciente de unidades monoméricas, y el segundo grupo sea capaz de prolongar adicionalmente, de un modo en etapas, la cadena creciente de monómeros nucleotídicos y no nucleotídicos mixtos. Las unidades no nucleotídicas de acuerdo con la presente invención se conocen bien la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento EP 0313219.

60 De acuerdo con la invención, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención comprenden una marca adecuada para su detección por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta.

65

La expresión "reacción cromogénica" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita, todos los métodos convencionales conocidos en la técnica que dan como resultado la formación de cromóforos en sitios de actividades enzimáticas. Es decir, en una reacción cromogénica sencilla de una etapa o de múltiples etapas, un sustrato incoloro se puede convertir por vía enzimática en un producto coloreado. En el contexto de la presente invención, una reacción cromogénica incluye cualquier reacción o conjunto de reacciones que desvelen zonas separadas, aplicaciones puntuales o bandas de actividad enzimática que se puedan investigar, determinar y/o analizar mediante inspección visual. La detección de sondas de oligonucleótidos biotinilados, por ejemplo, emplea normalmente la visualización colorimétrica o quimioluminiscente mediante avidina o estreptavidina conjugada a enzimas indicadoras tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante (HRP). Por ejemplo, en la técnica se sabe comúnmente que el cloruro de azul 4-Nitro tetrazolio (NBT) y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) son sustratos cromogénicos eficaces para la fosfatasa alcalina que se convierten en un producto de color azul. La detección a través de visualización quimioluminiscente puede incluir, por ejemplo, cualquier reacción quimioluminiscente potenciada (ECL) que implique la emisión de luz durante la oxidación de luminol catalizada por peroxidasa de rábano picante (HRP) y que peróxido de hidrógeno. La luz emitida se puede capturar en película o con una cámara CCD y puede servir para análisis cualitativo o semicuantitativo. Los sistemas de detección de este tipo se usan de manera rutinaria en la técnica y se pueden adquirir, por ejemplo, en GE Healthcare (USA).

La expresión "reacción metalográfica" como se denomina en el presente documento por lo general se refiere a cualquier tipo de reacción enzimática o no enzimática en la que un metal, en presencia de una fuente de metal y agentes de activación apropiados, se deposita de forma selectiva para dar una tinción altamente localizada de color negro. Es decir, una reacción metalográfica se refiere a una deposición de metal catalizada por enzima o catalizada por metal a partir de solución. Preferentemente, una reacción metalográfica enzimática de acuerdo con la presente invención incluye el uso de peroxidasa de rábano picante acoplada a anticuerpo (HRP) e iones de plata (I) en solución. Como alternativa, las partículas de metal, por ejemplo partículas de oro, pueden nuclear la deposición altamente específica de la plata a partir una solución de sal de plata apropiada en presencia de un agente reductor adecuado. Preferentemente, una reacción metalográfica no enzimática de acuerdo con la presente invención incluye el uso de sondas de oligonucleótidos etiquetados directa o indirectamente con partículas de oro e iones de plata (I) en solución. Se ha demostrado que las reacciones metalográficas de este tipo son altamente sensibles para métodos de detección tanto de hibridación *in situ* (ISH) como de inmunohistoquímica (IHC), en los que visualiza fácilmente las copias endógenas de genes individuales. Dado que se usa en el microscopio de campo brillante convencional, no requiere óptica fluorescente, o adaptación a la oscuridad en la parte del usuario. La señal es permanente, y no presenta los problemas de foto blanqueado asociados con las tinciones fluorescentes. Los sistemas de detección de este tipo (por ejemplo, EnzMet™, NanoGold™) se usan en la técnica de forma rutinaria se pueden adquirir en el mercado en diversos proveedores que incluyen, por ejemplo, Nanoprobe Inc. (USA).

La expresión "análisis de fluorescencia" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a todos los tipos de métodos de formación de imágenes conocidos en la técnica que son adecuados para visualizar, detectar, analizar y/o cuantificar una señal fluorescente. En particular, el análisis de fluorescencia de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a, todos los métodos de microscopía de fluorescencia desconvolución y confocal que incluye, por ejemplo, microscopía de múltiples sondas fluorescentes. Las sondas de oligonucleótidos se pueden marcar directamente con colorantes fluorescentes y visualizar con un microscopio de fluorescencia (análisis de fluorescencia directa), o las sondas de oligonucleótidos se pueden marcar con un hapteno y detectar con un anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra el hapteno y a continuación visualizar con un microscopio de fluorescencia (análisis de fluorescencia indirecta). El análisis de fluorescencia indirecta también incluye el uso de un anticuerpo sin conjugar en combinación con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia.

Por lo tanto, en una realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la presente invención se caracteriza por que la marca es una marca fluorescente o un hapteno, en particular un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina, o un colorante de cianina, o una biotina, digoxigenina o un resto de 2,4-dinitrofenilo.

Dependiendo del número de marcas presentes en cada una de las sondas de oligonucleótidos individuales, el conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende un número total de marcas variable. Por ejemplo, como se usa en el Ejemplo 3 a modo de ejemplo, los resultados óptimos se obtienen cuando el conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende un número total de marcas de al menos 1000 a 2000, preferentemente un número total de marcas de al menos 4000 a 8000.

Por consiguiente, en una realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención comprende un número total de marcas de al menos 1000, preferentemente de al menos 2000, más preferentemente de al menos 4000, y lo más preferentemente de al menos 8000.

Al proporcionar un conjunto de sondas de oligonucleótidos que comprende un número de marcas elevado en total, el número de marcas incorporadas en cada una de las sondas de oligonucleótidos individuales se puede reducir con la consecuencia de que cada marca se puede colocar dentro de la molécula de una manera óptima. Es decir, mediante la incorporación solamente de un número limitado de marcas, se pueden evitar efectos de inactivación no deseados, por ejemplo, en el caso de marcas fluorescentes, o haptenos se pueden colocar de un modo tal que la detección posterior se optimiza debido a la unión óptima del anticuerpo.

Hasta ahora, las sondas de oligonucleótidos se han usado de forma satisfactoria para la detección de secuencias diana altamente abundantes tales como ARNm expresados abundantemente o secuencias genómicas repetitivas que incluyen, por ejemplo, secuencias centroméricas, mientras que se ha descrito que el uso de sondas de oligonucleótidos para la detección de secuencias de baja abundancia s presenta desventajas (véase, por ejemplo, Jin *et al.*, 2001; Morphology Methods: Cell and Molecular Biology Techniques: 27-46).

En el contexto de la presente invención, sin embargo, las sondas de oligonucleótidos se han usado de forma satisfactoria para detectar secuencias genómicas no repetitivas. De acuerdo con la invención, las sondas de oligonucleótidos se dirigen contra una secuencia diana genómica no repetitiva de interés.

Por consiguiente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención son complementarias a regiones no repetitivas de la secuencia diana genómica.

Una de las ventajas del uso de un conjunto de sondas de oligonucleótidos complementarias a regiones no repetitivas de una secuencia diana genómica es que los genes de baja abundancia se pueden detectar y/o visualizar con alta sensibilidad.

La expresión "regiones no repetitivas" usada en el presente documento por lo general se refiere a cualquier secuencia distinta de un elemento de ADN repetitivo en un genoma de interés. En particular, las regiones no repetitivas de acuerdo con la presente invención se refieren a cualquier región distinta de la secuencias repetitivas del genoma (por ejemplo, genoma humano) que incluyen, pero no se limitan a, centrómeros, telómeros, repeticiones en tándem (por ejemplo, ADN satélite, ADN minisatélite, y ADN microsátélite), y elementos de repetición intercalados tales como los SINE (elementos nucleares intercalados cortos) y los LINE (elementos nucleares intercalados largos). Los elementos repetitivos que se han encontrado en la mayoría de los genomas eucariotas analizados, están principalmente presentes en múltiples copias, y no codifican proteínas o ARN. Los elementos repetidos intercalados normalmente están presentes como copias individuales y se distribuyen ampliamente en todo el genoma.

En una realización preferente adicional, el conjunto de sondas de oligonucleótidos puede ser complementario a cualquiera de la hebra sentido o antisentido de la secuencia diana genómica. Mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son complementarias a la hebra sentido o antisentido de la secuencia diana genómica, la hibridación óptima se asegura ya que no es posible que las sondas se vuelvan a hibridar.

El término "sentido" como se usa en el presente documento se refiere a que la secuencia de la sonda de oligonucleótidos es la misma y la secuencia diana, por ejemplo como la hebra codificante de la secuencia genómica.

El término "antisentido", por el contrario, se refiere a la secuencia de la hebra opuesta. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que las sondas de oligonucleótidos que son complementarias a cualquiera de la hebra sentido o antisentido de la secuencia diana genómica se puede usar para detectar una secuencia diana genómica de interés.

El oncogén del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico o genes *erb* y codifica un receptor de tirosina quinasa transmembrana que ha evolucionado como un clasificador principal de cáncer de mama invasivo y como una diana para terapia para el cáncer. El gen de HER-2 (*C-erbB-2*) está localizado en el cromosoma 17q. El HER-2 se ha relacionado con el pronóstico de la respuesta a la terapia con el anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER-2 (trastuzumab) en pacientes con cáncer de mama metastásico avanzado. El estado de HER-2 también se ha sometido ensayo para su capacidad para predecir la respuesta del cáncer de mama a otras terapias incluyendo terapias hormonales, inhibidores de topoisomerasa, y antraciclinas. Las técnicas tanto basadas en morfología como basadas en contexto molecular se han usado para medir el estado de HER-2 en muestras clínicas de cáncer de mama. Hasta ahora, la tinción inmunohistoquímica (IHC) ha sido el método predominante utilizado. A diferencia de la mayoría de los ensayos de IHC, sin embargo, la evaluación del estado de HER-2 es cuantitativa en lugar de cualitativa, porque HER-2 se expresa en todas las células epiteliales de mama. Los estudios han mostrado que cuando un ensayo de IHC estandarizado se realiza en muestras de ensayo que se fijan de forma cuidadosa, se procesan, y se embeben, existe una correlación excelente entre el estado de copias genéticas y niveles de expresión de proteínas.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado de forma sorprendente que el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la presente invención es particularmente adecuado para detectar el locus del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 humano). El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) está altamente expresado en aproximadamente un 30 % de pacientes con cáncer de mama, y las evidencias sustanciales apoyan la relación entre la sobreexpresión de HER2 y una escasa supervivencia global. Por consiguiente, siempre existe una necesidad de un método mejorado para detectar una expresión genética de HER-2 humano normal o anómala. La detección del locus del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo, en los Ejemplos 1 a 3.

Además, en el contexto de la presente invención se ha encontrado que la detección metalográfica de una secuencia diana genómica es particularmente favorable cuando el conjunto de sondas de oligonucleótidos se dirige contra regiones agrupadas de la secuencia diana de interés. El término "agrupado" como se usa en el presente documento se refiere a que las sondas de oligonucleótidos diferentes se dirigen contra secuencias diana individuales que pueden permanecer en estrecha cercanía entre sí. Esta estrecha cercanía puede incluir, pero no se limita a, una distancia de aproximadamente 50 a 500 nucleótidos. El agrupamiento de las sondas de oligonucleótidos se refiere además a que estas regiones no se distribuyen de manera uniforme con respecto a la secuencia diana genómica de interés, sino que las sondas de oligonucleótidos pueden estar distribuidas de forma no uniforme, cubriendo de ese modo las regiones en estrecha cercanía dentro del locus del gen (es decir, grupos) así como regiones que están situadas a más distancia. El agrupamiento de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se ejemplifica en la Figura 3 (véase, por ejemplo, combinaciones 2 y 4).

Por consiguiente, en otra realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la presente invención se caracteriza por que las sondas de oligonucleótidos están agrupadas dentro de la secuencia diana genómica.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado de forma sorprendente que el análisis y/o visualización de una secuencia diana genómica es particularmente sensible cuando se usan sondas de oligonucleótidos agrupadas y procedimientos de detección metalográfica.

En otra realización preferente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de la invención se caracteriza por que las sondas de oligonucleótidos se dirigen contra una secuencia diana genómica, en el que la secuencia diana genómica comprende el locus del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 humano).

La expresión "locus del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 humano)" como se usa en el presente documento por lo general incluye todas las secuencias genómicas y/o regiones genómicas que constituyen el gen que codifica receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Estas secuencias puede ser o no esenciales para la expresión genética. Las secuencias que constituyen el locus del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 humano) son conocidas por la persona con experiencia en la materia y se pueden identificar, por ejemplo, mediante búsqueda en bases de datos que incluyen, pero no se limitan a, la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado de forma sorprendente que el agrupamiento de las sondas de oligonucleótidos es particularmente favorable cuando se aplican métodos de detección metalográfica. Es decir, el agrupamiento de sondas de oligonucleótidos permite una detección altamente sensible de la secuencia genética ya que se supone que la deposición de metal mediada por enzimas se acelera por la estrecha proximidad de las marcas entre sí.

En el contexto de la presente invención, se ha demostrado que un conjunto de sondas de oligonucleótidos que comprende al menos 100 sondas de oligonucleótidos diferentes se puede usar de forma satisfactoria para detectar una secuencia diana genómica, en particular una secuencia diana genómica que comprende el locus del gen de HER-2. La detección de una secuencia diana genómica, en particular una secuencia diana que comprende el locus del gen de HER-2 de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo, en las Figuras 1 a 4.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un uso del kit de la presente invención para la detección mediante hibridación *in situ* de una secuencia diana genómica.

En el contexto de la presente invención, los términos "detección" o "detectar" por lo general hacen referencia a la visualización, análisis y/o cuantificación de la unión de una sonda de oligonucleótidos a su secuencia diana. La detección de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a, inspección visual de las muestras sondeadas incluyendo el uso de técnicas microscópicas convencionales así como cualquier tipo de análisis de fluorescencia. En particular, la inspección visual de la muestra se realiza después de haber hibridado la sonda de oligonucleótidos a su secuencia diana. En el caso de marcas radiactivas, la detección o medio para detectar se refiere a la exposición de las muestras sondeadas a una película de rayos X incluyendo la generación de un autorradiograma. Preferentemente, la detección o medio para detectar de acuerdo con la presente invención se realiza por medio de reacción cromogénica, reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado de forma sorprendente que un conjunto de sondas de oligonucleótidos que comprende al menos 100 sondas de oligonucleótidos diferentes permite un método de detección que proporciona diversas ventajas con respecto a la técnica. Es decir, con el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención, la secuencia diana genómica de interés se puede detectar (i) con una cantidad de sonda reducida, (ii) después de un tiempo de hibridación reducido, y/o (iii) con un fondo reducido en comparación con los métodos conocidos y disponibles en la técnica. Los métodos convencionales conocidos para detectar secuencias diana genómicas emplean, por ejemplo, técnicas de hibridación *in situ* cromogénica (CISH) e inmunohistoquímica (IHC) (Inform™ de Ventana, Ventana Medical Systems Inc., USA; SpotLight™, Zymed Laboratories Inc., CA, USA).

Por consiguiente en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para detectar una secuencia diana genómica de interés mediante hibridación *in situ*, comprendiendo dicho método las etapas de

5 a) incubar un conjunto de sondas de oligonucleótidos como se define en el contexto del kit de acuerdo con la presente invención con una muestra en condiciones que conducen a la unión del conjunto de sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana genómica de interés en el que no se realiza una etapa de calentamiento adecuada para disolver estructuras secundarias antes de la unión; y

10 b) detectar la unión de las sondas de oligonucleótidos to la secuencia diana genómica.

10 Todos los aspectos y realización como se ha definido anteriormente también pertenecen al método para detectar una secuencia diana genómica de interés.

15 La expresión "en condiciones que conducen a la unión" por lo general se refiera condiciones en las que las sondas de oligonucleótidos marcadas de la invención se puede hibridar a su secuencia diana, es decir, condiciones en las que las sondas de oligonucleótidos se pueden unir a su secuencia diana. En particular, en el contexto de la presente invención, las condiciones que conducen a la unión se refiere a la formación de pares de bases complementarias entre las sondas de oligonucleótidos y la secuencia diana. La hibridación entre las sondas de oligonucleótidos y la secuencia diana y por lo tanto la formación de pares de bases complementarias se define mediante formación de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas en equilibrio. Es decir, la hibridación y la separación de las dos hebras complementarias depende de una diversidad de factores, incluyendo temperatura, concentraciones de sal, pH, la naturaleza de las sondas y moléculas diana, y la composición de la solución de hibridación y de lavado. La temperatura óptima para hibridación está preferentemente en el intervalo de 15-25 °C por debajo del valor de T_f que define la temperatura de fusión (T_f) de los híbridos, es decir, la temperatura a la que un 50 % de las cadenas de ácidos nucleicos de doble hebra se separan. La persona experta en la materia conoce diversas fórmulas para calcular los valores de T_f . Por lo general los híbridos de ARN-ARN son 10-15 °C más estables que los híbridos de ADN-ADN o ADN-ARN y por lo tanto requieren condiciones más rigurosas para la hibridación y el lavado. Las condiciones que conducen a la unión de acuerdo con la presente invención también incluyen el uso de reactivos que contienen tampón de hibridación para maximizar la formación de dúplex y para inhibir la unión no específica de la sonda al tejido o las células. La concentración de la sonda se debe optimizar para cada sonda y para cada tejido. Las condiciones que conducen a la unión también se refieren a la incubación de las sondas con la secuencia diana durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir una hibridación óptima incluyendo la retirada de sondas no unidas mediante la aplicación de una o más etapas de lavado.

35 En particular, en el contexto de la presente invención, las condiciones que conducen a la unión de acuerdo con la presente invención se refieren a las condiciones de hibridación en las que las sondas de oligonucleótidos se incuban con la muestra diana en solución. Es decir, las condiciones que conducen a la unión no se refieren a ninguna condición en la las sondas de oligonucleótidos se incuban con la muestra diana a la vez que se inmovilizan, por ejemplo tal como en el contexto de una matriz de ADN. Las condiciones que conducen a la unión de acuerdo con la presente invención se describen por ejemplo en el Ejemplo 3.

45 El análisis de la expresión genética puede ser indicativo de la presencia de enfermedades, para evaluar diferentes estadios de enfermedades, o para el éxito o fracaso de tratamientos terapéuticos. Por ejemplo, se ha descrito que la sobreexpresión genética de HER-2 está asociada con un grado más elevado y formas extensas de carcinoma ductal, mientras que la amplificación genética de HER-2 se ha relacionado con un resultado adverso en el carcinoma lobular invasivo. Además, la amplificación genética de HER-2 y la sobreexpresión de proteínas se han asociado de forma coherente con un grado de tumor elevado, aneuploidía de ADN, tasa de proliferación celular elevada, ensayos negativos para receptores de proteínas nucleares para estrógenos y progesterona, dotación de p53, amplificación de la topoisomerasa IIa y alteraciones en una diversidad de otros biomarcadores moleculares de invasión y metástasis de cáncer de mama (véase, por ejemplo, Ross *et al.*, 2004). El estado de la expresión genética de HER-2 se ha relacionado adicionalmente con el pronóstico de respuesta a la terapia con el anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER-2, trastuzumab (Herceptin®, Genentech, CA, USA).

55 Por consiguiente, en una realización preferente, el método para detectar una secuencia diana genómica de acuerdo con la presente invención se caracteriza adicionalmente por que la detección es para un fin de diagnóstico, en particular para una enfermedad humana y/o para la eficacia de un tratamiento terapéutico en un paciente.

60 La fiabilidad de los métodos de detección sensibles para su uso con fines de diagnóstico y para la evaluación de trata mitos médicos es de importancia en particular.

60 El uso de la invención o el método de la presente invención se caracteriza por que la detección por la realización de detección se realiza por medio de hibridación *in situ*.

65 La hibridación *in situ* es un método convencional y por lo tanto es de importancia en particular.

La expresión "hibridación *in situ*", como se usa en el contexto de la presente invención, por lo general se refiere a cualquier tipo de ensayo de hibridación de ácido nucleico en el que se usa una sonda de oligonucleótido marcada para localizar una secuencia de ADN o de ARN específica en una parte o sección de un tejido (*in situ*), una célula o, si el tejido es lo suficientemente pequeño (por ejemplo, semillas de plantas o embriones de *Drosophila*), en todo el organismo. Por consiguiente, la hibridación *in situ* de acuerdo con la presente invención se requiera cualquier método para localizar y detectar secuencias de nucleótidos específicas en secciones de tejidos morfológicamente conservados o preparaciones celulares para hibridar la hebra complementaria de una sonda de nucleótidos a la secuencia de interés.

Por lo general existen dos tipos de sondas marcadas que se pueden usar en un método de hibridación *in situ*, en particular oligonucleótidos marcados ya sea de forma directa o indirecta. Un oligonucleótido se puede marcar de forma indirecta mediante su conjugación a una molécula que se puede detectar con una molécula secundaria o anticuerpo tal como, por ejemplo, biotina. Los oligonucleótidos marcados con biotina se usan frecuentemente para técnicas de hibridación *in situ* y se pueden detectar, por ejemplo, mediante unión de avidina conjugada con fluorocromo a la sonda marcada con biotina e hibridada. Otro tipo de oligonucleótidos marcados de forma indirecta puede incluir los conjugados a digoxigenina o dinitrofenilo. Estas marcas se pueden detectar, por ejemplo, mediante anticuerpos anti-digoxigenina o anti-dinitrofenilo conjugados con fluorocromo. Otros oligonucleótidos se pueden marcar directamente mediante unión covalente de fluorocromos a nucleótidos individuales o reactivos de unión no nucleotídicos en una posición definida que elimina la necesidad de moléculas de detección contrarias. El marcado de sondas de oligonucleótidos después de la síntesis de ADN a menudo es más fácil que la incorporación de nucleótidos marcados durante la síntesis. La detección de sondas marcadas directamente, por el contrario, requiere menos tiempo ya que se puede omitir el uso de moléculas de detección secundarias. Por lo tanto, existen ventajas y desventajas evidentes para las sondas marcadas tanto de forma directa como indirecta.

Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención se marcan con dinitrofenilo y se detectan mediante el uso de anticuerpos anti-dinitrofenilo.

La sonda de oligonucleótidos usada para hibridación *in situ* puede ser ADN o ARN o una combinación de ambos y puede estar marcada o no con fluorescencia. Por consiguiente, la hibridación *in situ* de la presente invención incluye técnicas tanto de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) así como todos los métodos conocidos de hibridación *in situ* cromogénica (CISH) que se pueden usar, por ejemplo, en diagnósticos médicos para evaluar la integridad cromosómica. La hibridación *in situ* también se puede realizar usando sondas de oligonucleótidos marcadas con hapteno o radio, en las que la detección se realiza, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos marcados con fluoróforo, avidina, o exposición a rayos X. Los métodos de hibridación *in situ* son bien conocidos por la persona con experiencia en materia y se describen, por ejemplo, en Silverman y Kool, 2007, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 43: 79-115.

La hibridación *in situ* de acuerdo con la presente invención incluye adicionalmente todos los procedimientos conocidos de hibridación *in situ* múltiplex o multicolor, es decir, todos los procedimientos en los que se usan las sondas de oligonucleótidos con marcas fluorescentes coloreadas de formas diferentes o en los que se usan sondas de oligonucleótidos con diferentes haptenos y diferentes sistemas de enzimas/sustrato. Estas marcas múltiples se pueden detectar de forma simultánea o en una serie de etapas de detección. Los métodos de este tipo son conocidos por la persona con experiencia en la materia y se describen, por ejemplo, en Wiegant *et al.*, 1993 (*Cytogenet Cell Genet* 63: 73-76).

Como se ejemplifica, por ejemplo, en el Ejemplo 1 de la presente invención, la detección de una secuencia diana genómica se consiguió de zona satisfactoria en un breve periodo de tiempo, es decir, después de un tiempo de hibridación significativamente inferior a 4 horas. Además, en comparación con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, el método de detección Inform™ de Ventana), se obtuvieron mejores resultados incluso después de un tiempo de hibridación de 1 hora o 30 minutos.

Por consiguiente, en una realización preferente, el método de la presente invención se caracteriza adicionalmente por que la detección de la etapa b) se realiza por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta; y/o la incubación de la etapa a) se completa después de como máximo 4 horas, 3 horas, o 2 horas, en particular después de como máximo 1 hora o 30 min.

Como se ha encontrado de forma sorprendente en el contexto de la presente invención, la detección de la secuencia diana genómica se podría conseguir en un periodo más corto de tiempo de hibridación en comparación con los métodos de detección convencionales conocidos en la técnica (véase por ejemplo la Figura 2). La detección de una secuencia diana genómica por medio de análisis de fluorescencia indirecta se ejemplifica, por ejemplo, en la Figura 4.

La expresión "completada" como se denomina en el presente documento no se debe entender como que la incubación de la etapa a) está esencialmente acabada. Se refiere aquí un aumento del tiempo de incubación podría no dar como resultado una mejora o aumento significativo de la señal. Por el contrario, el término "completada" en su

lugar se refiere a que la hibridación de las sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana de interés se completa de modo que se puede obtener un resultado detectable.

5 Como se ejemplifica, por ejemplo, en el Ejemplo 3, en el contexto de la presente invención se ha observado adicionalmente que la elección de diferentes subconjuntos de sondas de oligonucleótidos, que dan como resultado diversas composiciones de "cóctel" de sonda de oligonucleótidos, permite una mejora de la detección en comparación con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Inform™ de Ventana).

10 También se desvela un método para generar un conjunto de sondas de oligonucleótidos dirigidas contra una secuencia diana genómica de interés, comprendiendo dicho método las etapas de diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos complementarias al menos a 100 regiones diferentes de una secuencia diana genómica de interés, en particular en las que las regiones comprenden secuencias no repetitivas; y sintetizar el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención.

15 Todos los aspectos y realización como se ha definido anteriormente también se refieren al método para generar un conjunto de sondas de oligonucleótidos dirigidas contra una secuencia diana genómica de interés.

20 Una de las ventajas del presente método es que las sondas de oligonucleótidos se pueden generar de una manera altamente reproducible. Además, el diseño de las sondas de oligonucleótidos se puede adaptar a diversas secuencias genéticas diferentes.

25 La expresión "diseñar" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a la identificación de secuencias diana diferentes con las que son complementarias las sondas de oligonucleótidos. Como se ha detallado anteriormente, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención se pueden diseñar de un modo tal que puedan ser complementarias a cualquiera de la hebra sentido o antisentido de la secuencia diana. Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos se diseñan de un modo tal que no sean complementarias a ninguna región repetitiva del genoma humano. Diseñar se refiere adicionalmente a que las sondas de oligonucleótidos pueden formar cualquier tipo de pares de bases complementarias con la secuencia diana de interés incluyendo, pero no limitándose a, pares de bases canónicas y no canónicas y faltas de coincidencias de bases. Es decir, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención se puede diseñar preferentemente, pero no necesariamente, para que desvele una complementariedad con respecto a la secuencia diana de un 100 %. Las sondas de oligonucleótidos también se pueden diseñar para que desvele en menos de un 100 % de complementariedad con respecto a la secuencia diana, si se considera apropiado. La complementariedad entre la sonda de oligonucleótidos y la secuencia diana de interés, sin embargo, tiene que ser lo suficiente como para proporcionar unión a y, en consecuencia, detección de la secuencia diana de interés. Con los índices crecientes de genes clonados, las sondas de oligonucleótidos se pueden diseñar fácilmente basándose en cualquier secuencia de ADNc publicada y/o entrada en banco genético. Las bases de datos con secuencias genómicas de diversos organismos c son conocidas por la persona con experiencia en la materia e incluyen, por ejemplo, todas las bases de datos públicas del NCBI (National Center of Biological Information, USA).

40 La expresión "sintetizar" como se usa en el presente documento se refiere preferentemente a la generación de sondas de oligonucleótidos por medio de síntesis química que incluye, pero no se limita a, el uso de sintetizadores de ADN y/o ARN automatizados y química de fosoramidita. La persona con experiencia en la materia usa de forma rutinaria sintetizadores de ADN o ARN automatizados y están disponibles en el mercado en diversos proveedores tales como, por ejemplo, Applied Biosystems (Darmstadt, Alemania), Biolytic (Newark, CA, USA), o BioAutomation (Plano, TX, USA). Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención se sintetizan en una o más placas de 96 pocillos, proporcionando de este modo una síntesis de alto rendimiento rápida y resistente. La síntesis química de las sondas de oligonucleótidos en formato de placas de 96 pocillos no solamente permite una síntesis rápida de diversos oligonucleótidos diferentes, sino también la selección altamente eficaz y combinatoria de diferentes subconjuntos de oligonucleótidos. Como ya se ha detallado anteriormente, el método para detectar una secuencia diana genómica de interés de acuerdo con la presente invención se puede optimizar adicionalmente mediante elección individual y combinatoria de al menos 100 subconjuntos de oligonucleótidos diferentes a partir de una combinación grande de oligonucleótidos generados mediante síntesis múltiple en formato de 96 pocillos que a continuación se puede usar para formar el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención. La selección combinatoria de diferentes subconjuntos de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo, en el Ejemplo 3. Este proceso de optimización se puede evaluar adicionalmente mediante lectura experimental.

60 Opcionalmente, las sondas de oligonucleótidos se pueden purificar adicionalmente mediante cualquier tipo de método convencional aplicable y conocido en la técnica. Los métodos de este tipo incluyen, pero no se limitan a, métodos cromatográficos tales como, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

65 Opcionalmente, la purificación de las sondas de oligonucleótidos se realiza a través de uno o más grupos protectores unidos tales como, por ejemplo, DMT (dimetoxitritilo). El grupo DMT se usa ampliamente para la protección de los nucleósidos en síntesis de oligonucleótidos. En principio, cada una de las sondas de

oligonucleótidos se puede purificar de forma individual y/o por separado. Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos de la invención se purifican como un conjunto o como una combinación de diferentes subconjuntos.

5 Por ejemplo, una alícuota de una combinación de sonda de MWP que consiste en 96 oligonucleótidos en bruto se puede purificar en una columna RP 18 de HPLC (Hypersil, 8 x 240 mm) usando un gradiente de acetato de trietilamonio 0,1 M a pH 7/acetronitrilo. El DMT en el máximo se puede recoger, desalar mediante diálisis, evaporar y disolver en Tris 10 mM a pH 8,0. La DO 260 nm se puede determinar mediante medición de UV.

10 El método se puede caracterizar adicionalmente por que la síntesis de la etapa b) comprende la incorporación de al menos una marca

- i) a través de un componente básico modificado con fosforamidita, o
- ii) a través de la etapa de oxidación durante la síntesis de oligonucleótidos basada en fosforamidita.

15 La expresión "componente básico modificado con fosforamidita" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a cualquier estructura química que comprende una fosforamidita o un derivado de fosforamidita que se puede usar para introducir una o más marca(s) en una molécula de oligonucleótidos. En particular, los componentes básicos modificados con fosforamidita se pueden usar para preparar oligonucleótidos mono- o polimarcados de forma satisfactoria y rutinaria directamente en un sintetizador automático mediante unión covalente de componente básico al oligonucleótidos sintético creciente con el mismo procedimiento que la síntesis clásica.

Preferentemente, el componente básico modificado con fosforamidita de la presente invención se refiere a una desoxinucleósido fosforamidita tal como, por ejemplo, N4-aminoalquil-2'-desoxicidina o pirimidina sustituida en C-5.

25 La desoxinucleósido fosforamidita puede portar un grupo aminoalquilo con N protegido en cualquiera de la posición en C-5 o de la posición en C-4 de una pirimidina, la posición en C-8 de una desoxiadenosina o una desoxiguanosina, o la posición en C-7 de una 7-desazapurina. Como alternativa, la desoxinucleósido fosforamidita puede portar un resto de azida o alquino adecuado para química click basándose en la incorporación de una marca. En particular, el componente básico modificado con fosforamidita de la presente invención comprende adicionalmente restos no nucleotídicos. Opcionalmente, el componente básico modificado con fosforamidita se puede marcar antes de su incorporación en el oligonucleótido. Las marcas que se pueden unir a un componente básico de fosforamidita de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos, biotina, y 2,4-dinitrofenilo (DNP). Los ejemplos de componentes básicos modificados con fosforamidita marcados con fluorescencia incluyen, pero no se limitan a, fosforamidita de Fluoresceína-dT, fosforamidita de cx-FAM, y fosforamidita de Quasar 570-dT. Estos compuestos son conocidos por la persona con experiencia en la materia y se puede en adquirir, por ejemplo, en diversos proveedores tales como, por ejemplo, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Biosearch Technologies (Novato, CA, USA), Biogenex Laboratories (San Ramon, CA, USA), o Glen Research (Sterling, CA, USA).

40 En una realización particularmente preferente, el componente básico modificado con fosforamidita es una fosforamidita de 2,4-dinitrofenilo (DNP).

45 Las fosforamiditas de 2,4-dinitrofenilo (DNP) son fosforamiditas están unidas a 2,4-dinitrofenilo (DNP). El 2,4-dinitrofenilo (DNP) es una marca pequeña barata que se puede detectar de forma inmunogénica mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-DNP de IgG. El 2,4-dinitrofenilo se puede incorporar en oligonucleótidos unidos a fosforamiditas durante la síntesis en fase sólida. En la técnica se describen diversas estructuras de fosforamiditas de DNP (véase por ejemplo Grzybowski *et al.*, 1993, Nucleic Acid Research, Vol. 21, N.º 8: 1705-1712). Para obtener una sensibilidad máxima en la detección del anticuerpo, el resto de DNP se une preferentemente al componente básico de fosforamidita a través de un conector que puede tener un tamaño variable.

50 La síntesis y la detección de oligonucleótidos mediada por anticuerpo que contienen múltiples grupos indicadores de 2,4-dinitrofenilo es bien conocida por la persona con experiencia en la materia y se describe, por ejemplo, en Grzybowski *et al.*, 1993.

55 La marca se puede incorporar adicionalmente en la sonda de oligonucleótidos a través de la etapa de oxidación durante la síntesis de oligonucleótidos basada en fosforamidita. El proceso de oxidación durante la síntesis de oligonucleótidos basada en fosforamidita es un procedimiento conocido por la persona experta en la materia que se describe, por ejemplo, en el documento WO2007/059816.

60 La presente invención proporciona un kit que comprende a conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención y una ficha de producto. Además, el kit puede comprender al menos un componente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en agente de desparafinación, agente de tratamiento previo, agente de lavado, y agente de detección.

65 Para una persona con experiencia en la materia es evidente que el kit de la invención puede comprender una diversidad de componentes convencionales tales como tampones, anticuerpos, y/o reactivos para parar una reacción en particular. La persona experta será capaz de ajustar los componentes del kit para el uso común previsto, que

depende, por ejemplo, del sistema de detección, las células o tejidos examinados, la secuencia diana, la marca, la muestra examinada, etc. En particular, algunos de los componentes se ilustran a continuación.

5 La expresión "agente de desparafinación" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a cualquier tipo de sustancia que es adecuada para retirar la acera de muestras biológicas embebidas en cera. Un agente de desparafinación de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más disolventes orgánicos solubilizantes de parafina, uno o más disolventes orgánicos polares, uno o más tensoactivos, y además puede comprender opcionalmente agua.

10 La expresión "agente de tratamiento previo" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a cualquier tipo de agente o sustancia que se puede usar para bloquear sitios de una unión no específicos en solución o que es adecuado para mejorar la unión de las sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana cuando se incuban con la muestra antes de la adición de la sonda de oligonucleótidos al tampón de hibridación.

15 La expresión "agente de lavado" por lo general se refiere a cualquier tipo de composición líquida que se puede usar para retirar sondas de oligonucleótidos no unidas después de la hibridación. Los agentes de lavado de la invención pueden contener, por ejemplo, sales mono- o divalentes tales como NaCl, sales tampón tales como citrato sódico y/o formamida a diversas concentraciones. En este sentido, las concentraciones de formamida más elevadas y las concentraciones de NaCl más bajas normalmente se usan para rigurosidad más elevada. Los agentes de lavado de acuerdo con la presente invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 20 93/06245.

25 La expresión "agente de detección" como se denomina en el presente documento por lo general se refiere por qué sustancia o agente que puede ser necesario o relevante para la detección del conjunto marcado de sondas de oligonucleótidos después de hibridación a la secuencia diana. Un agente de detección de la presente invención puede incluir, pero no se limita a, anticuerpos marcados con fluorescencia o sin fluorescencia, sustratos para reacción enzimática tal como, por ejemplo, sustratos cromogénicos para peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, o sustancias tales como avidina o estreptavidina.

30 Las siguientes Figuras y Ejemplos pretenden ilustrar diversas realizaciones de la invención. Como tal, las modificaciones específicas discutidas no se deben interpretar como limitaciones del alcance de la invención. Para la persona con experiencia en la materia será evidente que se pueden realizar diversas equivalencias, cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención, y por lo tanto se debe interpretar que las realizaciones equivalentes de ese tipo están incluidas en el presente documento.

35 Figuras

40 La Fig. 1 muestra la visualización de la amplificación genética genómica de HER-2 en Xenoinjertos obtenidos a partir de células Calu3, ZR-75-1, y MCF7 tal como se investiga mediante hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con DNP a diversas concentraciones. (A) Sin amplificación genética. Panel izquierdo: detección de secuencias genómicas de HER-2 usando el sistema de detección Inform™ de Ventana (N.º de Cat. 780-001, Ventana Medical Systems Inc., USA); sonda de HER-2/neu de Ventana: concentración de 10 µg/ml; panel derecho: detección de secuencias genómicas de HER-2 usando un conjunto de 1440 sondas de oligonucleótidos diferentes a una concentración de 4 µg/ml. Cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende 81 nucleótidos y 6 marcas, respectivamente. Número total de marcas: 8640. (B) Amplificación genética baja. Panel izquierdo: sistema de detección Inform™ de Ventana; concentración de la sonda de HER-2/neu de Ventana de 10 µg/ml; panel derecho: véase (A), panel derecho. (C) Amplificación genética elevada. Panel izquierdo: sistema de detección Inform™ de Ventana; concentración de la sonda de HER-2/neu de Ventana 10 µg/ml; panel derecho: al igual que (A), panel derecho.

50 La Fig. 2 muestra la visualización de secuencias genéticas genómicas de HER-2 en Xenoinjertos obtenidos a partir de células ZR-75-1 tal como se investiga mediante hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con DNP después de diversos tiempos de hibridación usando detección metalográfica enzimática. (A) Tiempo de hibridación: 32 min; panel izquierdo: detección de secuencias genómicas de HER-2 usando el sistema de detección Inform™ de Ventana (n.º de Cat. 780-001; Ventana Medical Systems Inc., USA); panel derecho: detección de secuencias genómicas de HER-2 usando un conjunto de 1440 sondas de oligonucleótidos diferentes, comprendiendo cada una 81 nucleótidos y 6 marcas. Número total de marcas: 8640. (B) Tiempo de hibridación: 1 hora; panel izquierdo: detección genética de HER-2 usando el sistema de detección Inform™ de Ventana; panel derecho: véase (A), panel derecho. (C) Tiempo de hibridación: 2 horas; panel izquierdo: detección genética de HER-2 usando el sistema de detección Inform™ de Ventana; panel derecho: véase (A), panel derecho.

60 La Fig. 3 muestra la visualización de secuencias genéticas genómicas de HER-2 en Xenoinjertos obtenidos a partir de células ZR-75-1 tal como se investiga mediante hibridación *in situ* con diferentes conjuntos de sondas de oligonucleótidos marcadas con DNP que comprenden diversos índices totales de marcas incorporadas. La hibridación *in situ* se realizó como se ha descrito en la Figura 2. (A) Figura esquemática de los diferentes

conjuntos de composiciones de sondas de oligonucleótidos usadas para detección genética de HER-2. Se generaron diferentes subconjuntos de sondas de oligonucleótidos por combinación de diversas sondas de oligonucleótidos de diferentes placas de 96 pocillos. Cada caja indica una placa de 96 pocillos que comprende 96 sondas de oligonucleótidos diferentes. (B) Hibridación *in situ* usando el sistema de detección Inform™ de Ventana que comprende aproximadamente 15000 marcas (panel izquierdo superior) en comparación con los resultados obtenidos con diferentes conjuntos de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención. Las sondas de oligonucleótidos de la presente invención se generaron en un formato de placas de 96 pocillos (15 placas en total), y diferentes conjuntos de sondas de oligonucleótidos (por ejemplo, diferentes combinaciones) generadas por combinación de diferentes placas. Combinación 1: combinación de placas 1 a 15; número total de marcas: 8640; Combinación 2: combinación de placas 1 a 4 y 12 to 15; número total de marcas: 4608; Combinación 4: combinación de placas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, y 15; número total de marcas: 4608.

La Fig. 4 muestra la visualización de la amplificación genética de HER2 en Xenoinjertos obtenidos a partir de células MCF7 y Calu tal como se investiga mediante hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con DNP usando detección fluorescente indirecta. La sonda hibridada al locus del gen de HER2 se visualizó usando un filtro de Cy5 (filtro Cy5), y la contratinción se visualizó a través de un filtro DAPI (DAPI). Superposición: filtro de Cy5 y de DAPI. (A) sin amplificación genética. Detección de la secuencia genómica de HER2 usando IgG anti-conejo conjugada con DyLight™ 649 en Xenoinjertos obtenidos a partir de células MCF7. (B) Amplificación genética elevada. Detección de la secuencia genómica de HER2 usando IgG anti-conejo conjugada con DyLight™ 649 en Xenoinjertos obtenidos a partir de células Calu.

La Fig. 5 muestra la figura esquemática de sondas de oligonucleótidos marcadas a modo de ejemplo usadas para hibridación *in situ*. (A) Secuencias primarias y diseño de cinco sondas de oligonucleótidos de ADN de 87 mer diferentes dirigidas contra el locus del gen de HER-2 humano, comprendiendo cada una 81 nucleótidos y 6 marcas de DNP fosforamidita (1 en el extremo en la posición 5' y 5 incorporadas internamente). La posición de cada marca se indica con "X", en la que X indica 2,4-dinitrofenilo (DNP). El DNP se coloca en un espaciamiento de 16 nts en las posiciones 2, 19, 36, 53, 70 y 87, tal como se hace el recuento desde el extremo en la posición 3'-terminal. (B). Estructura química de un componente básico modificado con fosforamidita unido a 2,4-dinitrofenilo (X). DMP indica dimetoxitritilo.

Ejemplos

Síntesis de sonda

La síntesis de sondas de ADN en placa de 15 x 96 pocillos de oligonucleótidos con 87 mer marcados con 6 DNP se realizó en un Sintetizador de ADN Biolytic Dr. Oligo 192 MWP en una escala de 50 nmoles usando química de fosforamidita convencional y ciclos de síntesis de Biolytic. La síntesis se realizó en modo encendido de DMT. Un soporte de 2000 A CPG dT (Glen Research™, n.º de cat. 20-2032) se cargó en todos los pocillos de una placa de síntesis de micropocillos (placa de filtro Orochem™ de 96 pocillos, n.º de cat. OF1100). Los demás reactivos estándar necesarios para síntesis de oligonucleótidos basada en fosforamidita se adquirieron en Proligo™ o Glen Research™, acetonitrilo en Baker™. La calidad de la síntesis de oligonucleótidos se comprobó regularmente mediante detección de color de catión de DMT liberado. Después de completar la síntesis, los oligonucleótidos se escindieron y se desprotegeron con amoníaco (20 h, 40 °C), a continuación se evaporó en un concentrador de vac de velocidad y se volvió a suspender en 600 µl de Tris 10 mM a pH 8,0. A partir de ese momento, la concentración se determinó mediante medición a DO 260 nm. Rendimiento: 7-16 DO 260 nm. Esta cualidad en bruto se usó para constituir diferentes combinaciones de sondas.

Hibridación *in situ*

El ensayo de hibridación *in situ* se realizó en un Sistema Ventana Discovery XT (n.º de Cat. 750-701) usando reactivos Ventana™ para desparafinación, tratamiento previo, lavado y lavados rigurosos. Las muestras se hibridaron con composiciones de sonda de acuerdo con la presente invención o con la Sonda de ADN INFORM HER2 de Ventana™ (Ventana, n.º de cat. 780-4332). A menos que se indique de otro modo, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención constaba de 1440 sondas de oligonucleótidos comprendiendo cada una 81 nucleótidos y portando 6 marcas de DNP no nucleotídicas en posiciones idénticas con una distancia de 16 nucleótidos entre sí. El número total de marcas en esta sonda fue 8640.

Las sondas se detectaron mediante detección metalográfica enzimática, mediante detección cromogénica o mediante detección fluorescente indirecta. Las composiciones de sonda de acuerdo con la presente invención se diluyeron en tampón de hibridación (que contenía formamida, sulfato de dextrano, cloruro sódico, citrato sódico en tampón Tris) a una concentración final de 4 µg/ml. El fabricante proporciona la Sonda de ADN INFORM HER2 de Ventana™ (Ventana, n.º de cat. 780-4332) como una solución lista para usar en tampón de hibridación a una concentración final de 10 µg/ml. Las muestras eran portaobjetos de Control de Xenoinjerto 3 en 1 con HER2 embebido en parafina fijado en formalina (Ventana, n.º de cat. 783-4332). Cada portaobjetos lleva 3 secciones de tejido de Xenoinjertos obtenidos a partir de células Calu3 (amplificación genética de HER2 elevada), ZR-75-1 (amplificación genética de HER2 intermedia) y MCF7 (sin amplificación genética de HER2), respectivamente.

Los portaobjetos se desparafinizaron usando EZ Prep (Ventana, n.º de cat. 950-102) for 20 minutos a 65 °C seguido de 4 x 4 minutos a 75 °C. Los portaobjetos se trataron previamente un tampón de reacción (Ventana, n.º de cat. 950-300) durante 3 x 8 minutos a 90 °C y a continuación se digirieron con Proteasa 3 (Ventana, n.º de cat. 760-2020) durante 20 minutos a 37 °C. La sonda se hibridó a 52 °C durante 2 horas a menos que se indique de otro modo. Se realizaron lavados rigurosos usando SSC (Ventana™, n.º de cat. 950-110) durante 3 x 8 minutos a 78 °C. A continuación los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anti-DNP de conejo (Ventana™, n.º de cat. 780-4335) durante 20 minutos a 37 °C.

Para los experimentos mostrados en la Fig. 2, el protocolo descrito anteriormente se modificó de un modo tal que el tiempo de hibridación fuera 32 min (A), 1 hora (B) y 2 horas (C), respectivamente.

10 Detección metalográfica enzimática

La detección metalográfica enzimática de las sondas se realizó usando el Kit de Detección ultra View SISH (Ventana, n.º de cat. 780-001), comenzando con una incubación con ultra View SISH-HRP (Kit de Detección ultra View SISH Ventana™, n.º de cat. 780-001) durante 16 minutos a 37 °C. A continuación los portaobjetos se incubaron con Cromógeno A de Plata ultra View SISH, Cromógeno B de Plata ultra View SISH y Cromógeno C de Plata ultra View SISH durante 12 minutos a 37 °C (Kit de Detección ultra View SISH Ventana™, n.º de cat. 780-001). Se hizo una contratinción de los portaobjetos con Hematoxilina II (Ventana, n.º de cat. 790-2208) durante 4 minutos a 37 °C seguido de Reactivo de Tinción Azul (Ventana, n.º de cat. 760-2037) durante 4 minutos a 37 °C. A continuación, los portaobjetos se lavaron 2 x en solución de detergente suave, se deshidrataron en una serie de diluciones con alcohol (70 %, 96 %, 100 %) seguido de dos lavados en xileno y a continuación se montaron con Permout (Fisher Scientific™, n.º de cat. SP15-100).

25 Detección cromogénica

La detección cromogénica de las sondas se realizó usando reactivos BlueMap™ de Ventana (Ventana, n.º de cat. 760-120). Los portaobjetos se incubaron con IgG anti-conejo UltraMap conjugada con fosfatasa alcalina (Ventana n.º de cat. 760-4314) durante 12 min a 37 °C, seguido de incubación con Activador, BlueMap1 y BlueMap2 (Ventana, n.º de cat. 760-120) durante 20 min a 50 °C. A continuación, los portaobjetos se lavaron 2x en solución de detergente suave, se deshidrataron en una serie de diluciones con alcohol (70%, 96%, 100%) seguido de dos lavados en xileno y a continuación se montaron con Permout (Fisher Scientific, n.º de cat. SP15-100).

35 Análisis de fluorescencia

La detección fluorescente indirecta de las sondas se realizó usando IgG anti-conejo conjugada con DyLight™ 649 durante 20 min a 37 °C. Se hizo una contratinción de los portaobjetos con DAPI (Ventana, n.º de cat. 760-4196) durante 8 min a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron 2x en solución de detergente suave, se deshidrataron en una serie de diluciones con alcohol (70%, 96%, 100%) seguido de dos lavados en xileno y a continuación se montaron con Permout (Fisher Scientific, n.º de cat. SP15-100). La microscopía fluorescente se realizó con un microscopio de fluorescencia (Leica DM5500) usando una lámpara de fluorescencia halógena (Leica EL6000) y un cubo de filtro de fluorescencia con Cy5 (excitación a 620 nm, espejo dicromático a 660 nm, supresión a 700 nm) para visualización de señales de secuencia genética de HER2 y un cubo de filtro de fluorescencia con DAPI (excitación a 360 nm, espejo dicromático a 400 nm, supresión a 470 nm) para visualización de la contratinción. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD (Leica DFC 350FX) usando un objetivo de 60 x.

45 Ejemplo 1

El experimento mostrado en la Figura 1 demuestra que, con un tiempo de hibridación de 2 horas, el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención daba como resultado una intensidad de la señal similar incluso a una concentración de sonda más baja (4 µg/ml con respecto a 10 µg/ml) cuando se comparaba con la Sonda de ADN INFORM HER2 de Ventana™ (Ventana Medical Systems Inc., USA).

50 Ejemplo 2

Usando el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención, una señal de tinción más intensa se observaba después de 32 minutos o después de 1 hora de hibridación en comparación con la Sonda de ADN INFORM HER2 de Ventana™ a una concentración más baja (4 µg/ml con respecto a 10 µg/ml). Aunque el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención daba como resultado una tinción óptima después de un tiempo de hibridación solamente de 32 minutos, la tinción óptima usando la Sonda de ADN de HER2 INFORM™ se consiguió solamente después de 2 horas, y la tinción subóptima se consiguió después de 1 hora (véase la Figura 2).

60 Ejemplo 3

El experimento que se expone en la Figura 3 muestra que, cuando se usa detección metalográfica, el agrupamiento de subconjuntos de sondas de oligonucleótidos en ambos extremos del locus diana (dejando la parte media del

locus diana sin marcar) proporciona una tinción más intensa que una distribución uniforme de los subconjuntos de sondas de oligonucleótidos con respecto a todo el locus diana (véase la Figura 3, Combinación 2 con respecto a la Combinación 4). Se observa que el número total de marcas, sin embargo, es igual en ambas combinaciones. Esto y frustra claramente la ventaja del conjunto de sondas de oligonucleótidos de la presente invención porque proporciona la posibilidad de diseñar composiciones óptimas de subconjuntos de oligonucleótidos para obtener una intensidad de señal óptima a la vez que se minimiza el número necesario de subconjuntos de sondas de oligonucleótidos.

Ejemplo 4

El experimento mostrado en la Figura 4 desvela que el conjunto de sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se puede visualizar usando detección fluorescente indirecta.

Listado de secuencias

<110> Roche Diagnostic GmbH/F.Hoffman-La Roche AG

<120> Conjunto de sondas de oligonucleótidos así como métodos y usos relacionados con el mismo

<130> R66512PC

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 81

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda 0001 de Her2

<220>

<221> misc_unión

<222> <1

<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<220>

<221> misc_unión

<222> 16¹⁷

<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<220>

<221> misc_unión

<222> 32³³

<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<220>

<221> misc_unión

<222> 48⁴⁹

<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<220>

<221> misc_unión

<222> 64⁶⁵

<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<220>

<221> misc_unión

<222> 80⁸¹

<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<400> 1

tcacctttcg acctctgctc caaacacac tctttgtttt tcttgagaaa cctgctgata 60
aatatctgta cttcgatgct t 81

5 <210> 2
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sonda_0002 de Her2

15 <220>
<221> misc_unión
<222> <1
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

20 <220>
<221> misc_unión
<222> 16^17
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

25 <220>
<221 > misc_unión
<222> 32^33
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

30 <220>
<221 > misc_unión
<222> 48^49
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

35 <220>
<221 > misc_unión
<222> 64^65
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

40 <220>
<221 > misc_unión
<222> 80^81
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

<400> 2

tacgtttaca cacagcccta aatttattca ggcgtctctt ctggaacgag atgtaagctg 60
attttgatt catttgcccc t 81

45 <210> 3
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> sonda_0003 de Her2

55 <220>
<221> misc_unión
<222> <1
<223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

60

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 16¹⁷
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

5

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 32³³
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

10

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 48⁴⁹
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

15

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 64⁶⁵
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

20

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 80⁸¹
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

25

<400> 3

cctgagcttt catcctgaag gcgaggagaa gctagatccg ccacaaaagg ataagccctt
60

ccccaccact aacggaggaa t
81

30

<210> 4
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> sonda 0004 de Her2

40

<220>
 <221> misc_unión
 <222> <1
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

45

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 16v17
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

50

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 32³³
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

55

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 48⁴⁹
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

60

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 64⁶⁵
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

ES 2 645 754 T3

<220>
 <221> misc_unión
 <222> 80 ^81
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"
 5
 <400> 4

caggcctcgc gccgctggat attaaacctg ccggccggta gctttcggct cccctgcgga 60
aaccgccatt ttttttttat t 81

 10 <210> 5
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> sonda 0005 de Her2

 20 <220>
 <221> misc_unión
 <222> <1
 <223> */resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

 25 <220>
 <221> misc_unión
 <222> 16 ^17
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

 30 <220>
 <221> misc_unión
 <222> 32 ^33
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

 35 <220>
 <221> misc_unión
 <222> 48 ^49
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

 40 <220>
 <221> misc_unión
 <222> 64 ^65
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

 45 <220>
 <221> misc_unión
 <222> 80 ^81
 <223> /resto unido = "2,4-dinitrofenilo (DNP)"

 <400> 5

atgactagat tttcaaaggc tattggtatc aggagtgtct tatgaaagat aagtttaacc 60
tgagatacta gatgcaataa t 81
 50

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende

- 5 - un conjunto de sondas de oligonucleótidos adecuadas para hibridación *in situ*, conjunto de sondas que comprende al menos 100 sondas de oligonucleótidos de una sola hebra diferentes dirigidas contra una secuencia diana genómica no repetitiva de interés, en la que cada uno de los oligonucleótidos individuales comprende al menos una marca, en los que dicha marca es adecuada para detección por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta; y
- 10 - una ficha de producto.

2. El kit de la reivindicación 1,

- 15 i) en el que cada una de las sondas de oligonucleótidos tiene una longitud de 20 a 200 nucleótidos, preferentemente de 40 a 175 nucleótidos, más preferentemente de 60 a 150 nucleótidos, especialmente de 80 a 120 nucleótidos, y/o
- ii) en el que cada una de las sondas de oligonucleótidos comprende al menos dos o tres marcas, en particular al menos cinco marcas, más particularmente al menos 10 marcas, y lo más particularmente al menos 15 marcas,
- 20 iii) en el que el conjunto comprende al menos 200, 300 o 400 sondas de oligonucleótidos diferentes, en particular al menos 500 sondas de oligonucleótidos diferentes, más particularmente al menos 1000 sondas de oligonucleótidos diferentes,
- iv) en el que cada sonda comprende una unidad no nucleotídica,
- v) en el que la marca se selecciona entre un radioisótopo, una molécula fluorescente y un hapteno, y/o
- 25 vi) en el que la secuencia diana genómica no repetitiva de interés es un gen con poca abundancia.

3. El kit de la reivindicación 1 o 2,

- 30 i) en el que el conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende uno o más subconjuntos de sondas de oligonucleótidos, en el que cada subconjunto consiste en sondas de oligonucleótidos con secuencias idénticas que tienen marcas en posiciones idénticas, o
- ii) en el que las sondas de oligonucleótidos comprende marcas en posiciones casi a la misma distancia, en particular a una distancia de separación de al menos 5, 10, 15 o 20 nucleótidos, o
- 35 iii) en el que las sondas de oligonucleótidos comprende marcas en posiciones predeterminadas, opcionalmente en posiciones situadas a una distancia predeterminada entre sí.

4. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la marca está

- 40 i) unida a una base, un azúcar, o un resto de fosfato de un nucleótido, ya sea directa o indirectamente a través de un conector, o
- ii) unida a una unidad no nucleotídica.

5. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la marca es una marca fluorescente o un hapteno, en particular un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina, o un colorante de cianina, o una biotina, digoxigenina o un resto de 2,4-dinitrofenilo; y/o en el que el conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende un número total de marcas de al menos 1000, preferentemente de al menos 2000, más preferentemente de al menos 4000 y lo más preferentemente de al menos 8000.

6. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

- 50 i) en el que las sondas de oligonucleótidos son complementarias a regiones no repetitivas de la secuencia diana genómica, o
- ii) en el que las sondas de oligonucleótidos del conjunto son complementarias a cualquiera de la hebra sentido o antisentido de la secuencia diana genómica.

7. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

- 55 i) en el que las sondas de oligonucleótidos están agrupadas dentro de la secuencia diana genómica, o
- ii) en el que la secuencia diana genómica comprende el locus del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 humano).
- 60

8. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además al menos un componente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en agente de desparafinación, agente de tratamiento previo, agente de lavado y agente de detección.

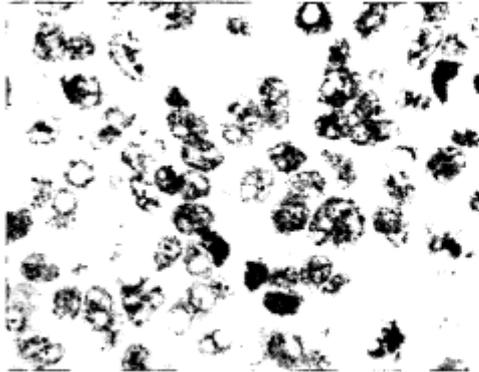
9. Uso del kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para detección mediante hibridación *in situ* de una secuencia diana genómica.

10. Un método para detectar una secuencia diana genómica de interés mediante hibridación *in situ*, comprendiendo dicho método las etapas de
- 5 a) incubar un conjunto de sondas de oligonucleótidos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con una muestra en condiciones que conducen a la unión del conjunto de sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana genómica de interés, en el que no se realiza una etapa de calentamiento adecuada para disolver estructuras secundarias antes de la unión; y
- b) detectar la unión de las sondas de oligonucleótidos a la secuencia diana genómica.
- 10 11. El método de la reivindicación 10, en el que la detección es para un fin de diagnóstico, en particular para una enfermedad humana y/o para la eficacia de un tratamiento terapéutico en un paciente.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que
- 15 (i) la detección de la etapa b) se realiza por medio de una reacción cromogénica, por medio de una reacción metalográfica, o por medio de análisis de fluorescencia directa o indirecta; y/o
- (ii) la incubación de la etapa a) se completa después de como máximo 4 horas, 3 horas, o 2 horas, en particular después de como máximo 1 hora o 30 min.

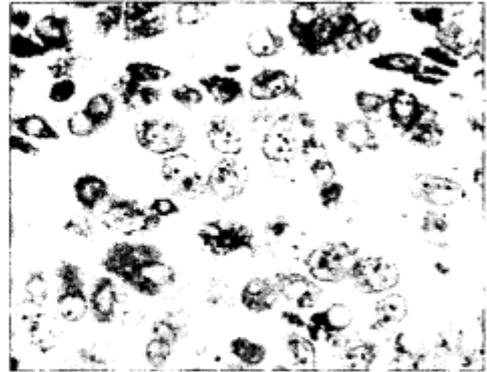
Figura 1

A

izquierda

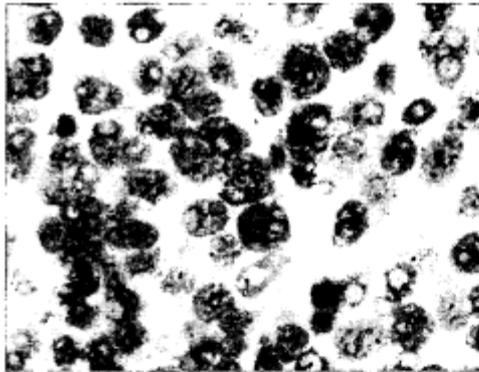


derecha

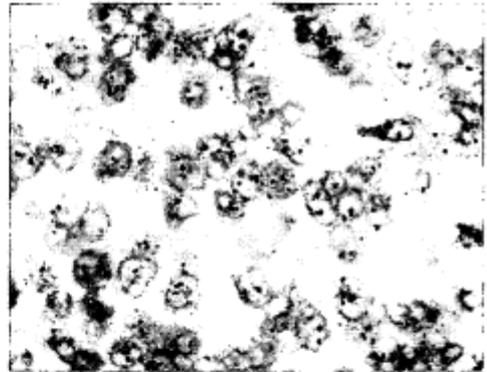


B

izquierda

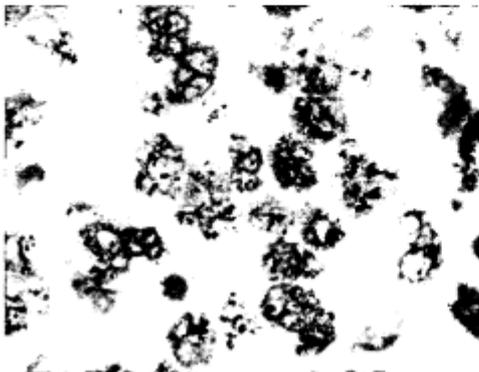


derecha



C

izquierda



derecha

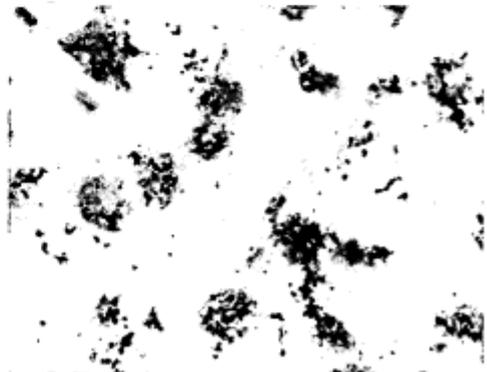
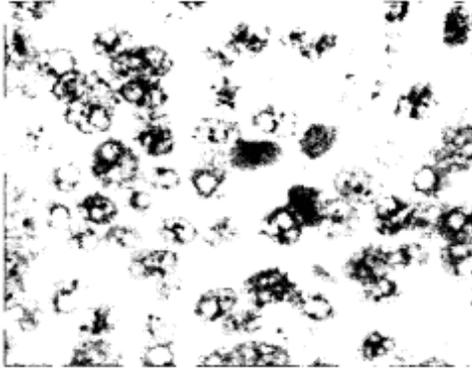


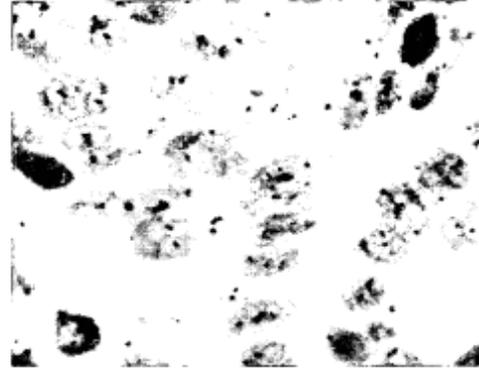
Figura 2

A

izquierda

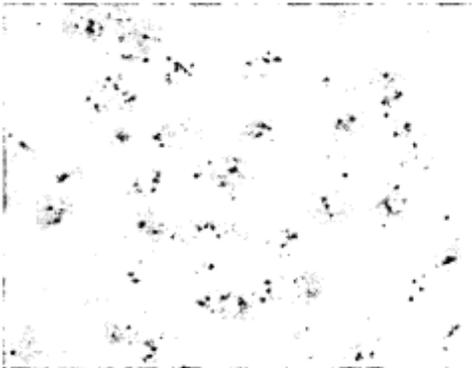


derecha

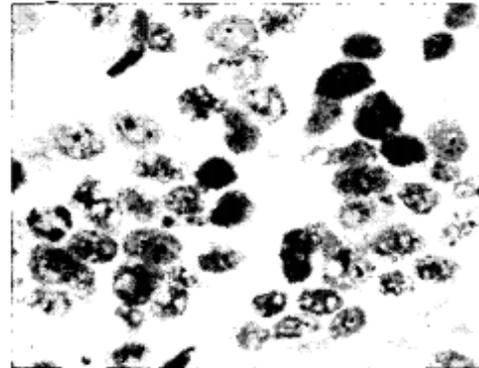


B

izquierda

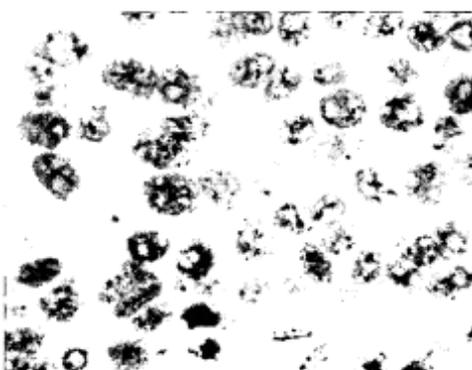


derecha



C

izquierda



derecha



Figura 3

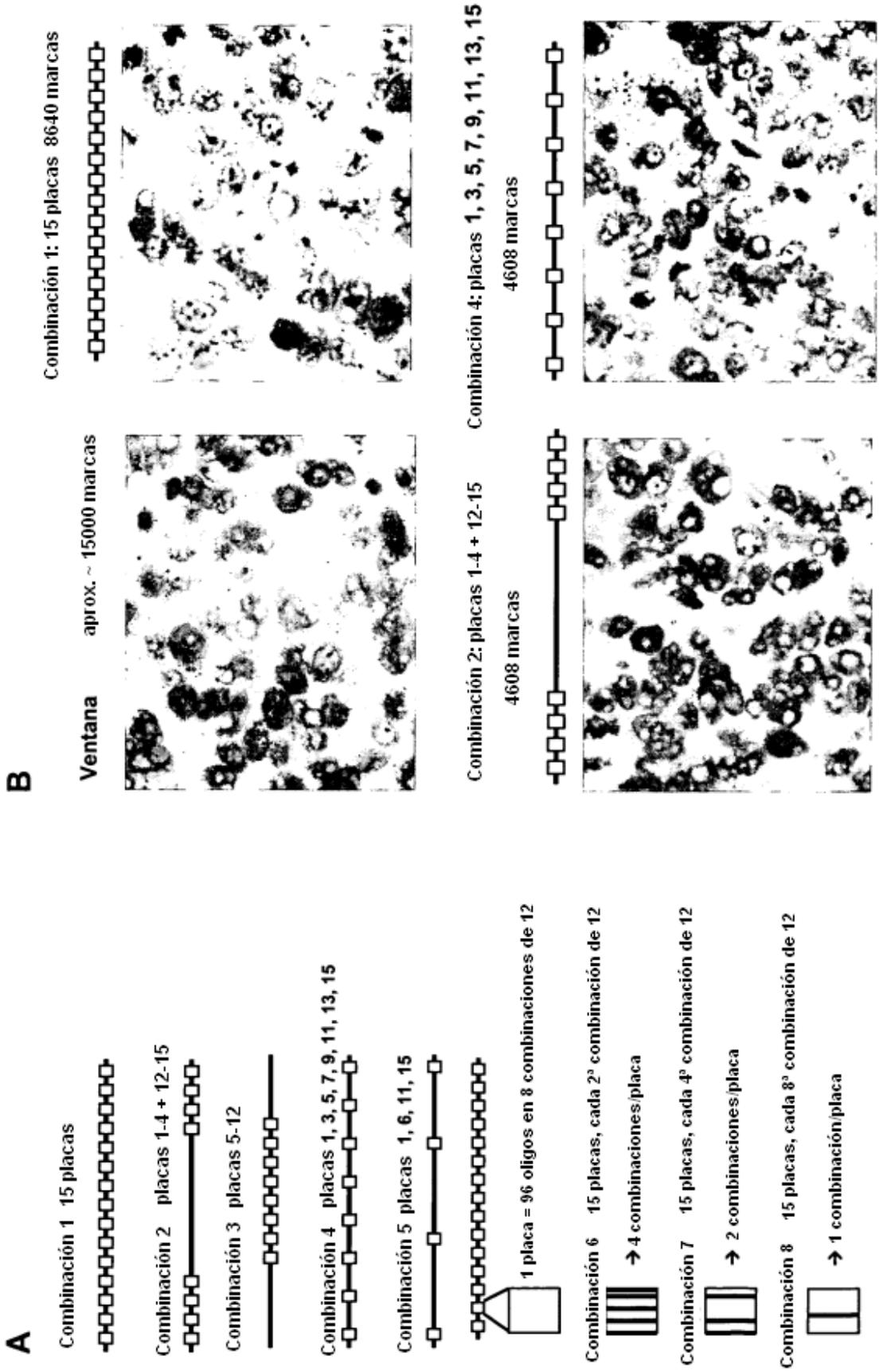
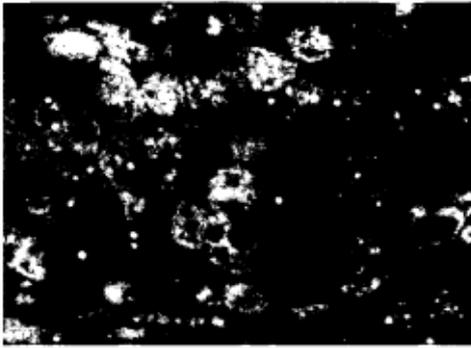


Figura 4

A

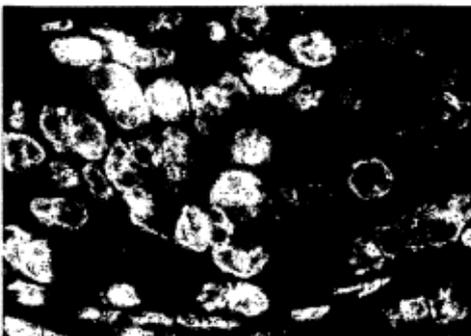
Superposición



Filtro de Cy5



Filtro de DAPI



B

Superposición



Filtro de Cy5



Filtro de DAPI

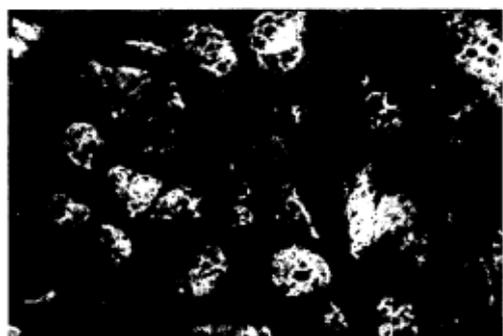


Figura 5

A

Her2 0001	X TCACCTTTCGACCTCT X GCTCCAAAACACACTC X TTTGTTTTTCT TGAGAXAACCTGCTGATAAATA X TCTGTACTTCGATGCT X T
Her2 0002	X TACGTTTACACACAGC X CCTAAATTTATTCAGG X CGTCTCTTCTG GAACG X AGATGTAAGCTGATTT X TGTATTCATTTGCCCC X T
Her2 0003	X CCTGAGCTTTCATCCT X GAAGGCGAGGAGAAGC X TAGATCCGCCA CAAA X GGATAAGCCCTTCCCC X ACCACTAACGGAGGA X T
Her2 0004	X CAGGCCTCGCGCCGCT X GGATATTAACCTGCC X GGCCGGTAGCT TTCGG X CTCCCCTGCGGAAACC X GCCATTTTTTTTTTAT X T
Her2 0005	X ATGACTAGATTTTCA X AGGCTATTGGTATCAG X GAGTGTCTTAT GAAAG X ATAAGTTTAACCTGAG X ATACTAGATGCAATA X T

B

