

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 555**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2009 PCT/IB2009/006548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009 E 09757890 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2285982**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de aberraciones cromosómicas con tampones de hibridación novedosos**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 668 555 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la detección de aberraciones cromosómicas con tampones de hibridación novedosos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para detectar aberraciones cromosómicas *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden sondas moleculares para la detección de secuencias de nucleótidos particulares (incluyendo secuencias normales y aquellas asociadas con aberraciones cromosómicas y/o enfermedad infecciosa) y a composiciones acuosas que comprenden del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar definido para su uso en hibridación, particularmente para su uso en hibridación *in situ* (ISH). La invención se refiere además a kits que comprenden una primera sonda molecular y una composición de hibridación.

10 En una realización, la presente invención se refiere a sondas moleculares para su uso en, por ejemplo, los campos de la citología, histología y biología molecular, y a kits que comprenden tales sondas moleculares. En otras realizaciones, la presente invención se refiere a métodos de detección de aberraciones cromosómicas o enfermedad infecciosa usando tales sondas moleculares, a métodos de diagnóstico de un defecto genético o estado de enfermedad usando tales sondas moleculares, y a métodos de provisión de un pronóstico usando tales sondas moleculares.

Antecedentes y descripción

20 Muchos estados patológicos, tanto defectos congénitos como enfermedades adquiridas, se asocian con aberraciones cromosómicas tales como amplificaciones, aneuploidía, posibles puntos de rotura, inserciones, inversiones, deleciones, duplicaciones, redistribuciones y translocaciones. Además, las infecciones por patógenos generalmente dan como resultado la presencia de secuencias de ácido nucleico de la bacteria, el virus u hongo infeccioso en el organismo infectado.

25 El establecimiento de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos asociada con un defecto congénito, una enfermedad adquirida o un patógeno infeccioso, a través de análisis *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de ADN genómico, cromosomas, fragmentos de cromosoma o genes, puede asistir a un médico clínico en la obtención de un diagnóstico apropiado. Por ejemplo, la expansión de una repetición de trinucleótido CGG en la 5'UTR (región no traducida) de ARNm del gen de retraso mental 1 del cromosoma X frágil (*FMR1*) permite que el médico clínico diagnostique el síndrome del cromosoma X frágil. Esta expansión conduce a silenciamiento transcripcional del gen. Sin embargo, otros mecanismos, por ejemplo deleciones de *FMR1* y mutaciones, también podrían provocar el síndrome del cromosoma X frágil. El resultado, la ausencia o cantidades reducidas del producto génico, *FMRP*, que conducen a la enfermedad, son iguales tanto para el silenciamiento provocado por expansión como para la deleción génica. Un ejemplo de un estado provocado por una anomalía numérica es el síndrome de Down, también conocido como trisomía 21 (un individuo con síndrome de Down tiene tres copias del cromosoma 21, en vez de dos). El síndrome de Turner es un ejemplo de una monosomía en la que el individuo nace sólo con un cromosoma sexual, un cromosoma X. Otros ejemplos incluyen el síndrome de Wolf-Hirschhorn, que está provocado por la deleción parcial del brazo corto del cromosoma 4, y el síndrome de Jacobsen, también denominado el trastorno por deleción terminal 11q. Algunos síndromes, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A, pueden estar provocados por duplicaciones, por ejemplo, del gen que codifica para la proteína de mielina periférica 22 (*PMP22*) en el cromosoma 17. En otros síndromes, tales como la translocación robertsoniana, se ha unido todo un cromosoma a otro en el centrómero. Sólo pueden producirse translocaciones robertsonianas con los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 y la progenie de un portador heterocigoto de una translocación robertsoniana podría, por ejemplo heredar una trisomía 21 desequilibrada, provocando síndrome de Down.

45 El establecimiento de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos asociada con un defecto congénito, una enfermedad adquirida o un patógeno infeccioso, a través de análisis *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de ADN genómico, cromosomas, fragmentos de cromosoma o genes, también puede ser valioso para el médico clínico en la selección de un ciclo de tratamiento apropiado cuando se ha diagnosticado un estado patológico. Por ejemplo, una paciente con cáncer de mama en la que se ha amplificado el gen *HER2* puede beneficiarse del tratamiento con Herceptin™ (trastuzumab), un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína *HER2*. En otro ejemplo, un médico clínico puede elegir prescribir Erbitux® (cetuximab) o Vectibix™ (panitumumab) (anticuerpos monoclonales terapéuticos que reconocen específicamente el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*)) a un paciente con cáncer colorrectal en el que se amplifica el gen *EGFR*.

55 El establecimiento de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos asociada con un defecto congénito, una enfermedad adquirida o un patógeno infeccioso, a través de análisis *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de ADN genómico, cromosomas, fragmentos de cromosoma o genes, también puede asistir a un médico clínico en la provisión de un pronóstico. Por tanto, las pacientes con cáncer de mama en las que se amplifica o deleciona el gen *TOP2A* tienen un peor pronóstico que aquellas en las que no.

Detectar la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos generalmente conlleva el reconocimiento de la

secuencia mediante hibridación, o estabilización de una estructura de doble hélice de nucleótidos mediante enlaces de hidrógeno entre bases en hebras opuestas (A+T o G+C). En un ejemplo básico de hibridación, secuencias o fragmentos de ácido nucleico se unen a una secuencia o un fragmento complementario de ácido nucleico. La detección mediante hibridación implica generalmente el uso de sondas de ácido nucleico diseñadas para unirse a, o "hibridar" con, una diana de ácido nucleico tal como, por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN.

Existen técnicas bien conocidas en la técnica de la biología molecular para detectar aberraciones cromosómicas. Sin embargo, hasta la fecha no ha estado disponible una prueba rápida, conveniente, económica y fácil de usar que permita la detección generalizada y de rutina de aberraciones cromosómicas.

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

Los experimentos de hibridación tradicionales, tales como ensayos de ISH, usan un tampón que contiene formamida para desnaturalizar cadenas de ácido nucleico de doble hebra. La formamida es un disolvente que tiene un efecto desestabilizante sobre el estado de hélice de, por ejemplo, ADN, ARN, y análogos de los mismos, desplazando moléculas hidratadas unidas de manera suelta y de manera uniforme. Además, la formamida estabiliza el estado helicoidal de ADN, ARN, y análogos de los mismos mediante "formamidación" de los sitios de unión de Watson-Crick de las bases.

La etapa de desnaturalización va seguida por el reapareamiento de dos hebras complementarias de cadenas de ácido nucleico, que es con mucho el aspecto que consume más tiempo de un ensayo que usa hibridación. Por ejemplo, en un protocolo de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) tradicional, el reapareamiento lleva 14-24 horas, y puede llevar incluso hasta 72 horas. Se muestran ejemplos de tiempos de hibridación tradicionales en las figuras 1 y 2.

Hasta ahora se creía que el uso de agentes caotrópicos, tales como formamida (otros agentes caotrópicos incluyen guanidinio, hidrógeno y urea), que interfieren en los sitios de unión de Watson-Crick de bases de ácido nucleico y perturban de ese modo los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias de ácido nucleico, era el único modo de disminuir la temperatura de fusión (T_f) de las cadenas complementarias, ya que es necesario para la etapa de desnaturalización. Sin embargo, aunque el uso de agentes caotrópicos disminuye la T_f, estos agentes parecen prolongar significativamente el tiempo de hibridación, en comparación con la hibridación en una disolución acuosa sin un agente caotrópico.

La formamida tiene desventajas aparte de un largo tiempo de procesamiento. La formamida es un material tóxico, peligroso, sujeto a regulaciones estrictas para su uso y sus desechos. Además, el uso de una alta concentración de formamida parece provocar la destrucción morfológica de la estructura celular, nuclear y/o cromosómica.

Las composiciones acuosas descritas en el presente documento permiten la detección de secuencias de ácido nucleico en condiciones que tienen varias posibles ventajas con respecto a la técnica anterior, tales como tiempos de hibridación más rápidos, menores temperaturas de hibridación y composiciones de hibridación menos tóxicas.

El documento WO 92/07956 describe un procedimiento para amplificar ácido nucleico. El documento US 5521061 describe la potenciación de una señal de sonda en estudios de hibridación *in situ* mediada por ácido nucleico. Olson *et al.* (2004). Acta Oncologica 43, 35-42 describen la amplificación de HER2 y TOP2A y la delección de genes TOP2A en cáncer de mama investigadas mediante nuevas sondas para FISH.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones, kits y métodos para la detección de secuencias de ácido nucleico asociadas con aberraciones cromosómicas. La presente invención proporciona además el uso de dicha composición. Las composiciones y los métodos de la invención son aplicables a cualquier técnica de hibridación, y a cualquier sistema molecular que se hibrida o se une usando apareamiento de bases, tal como, por ejemplo, ADN, ARN, PNA, LNA, y análogos naturales y sintéticos de los mismos. Las composiciones y los métodos de la invención permiten la detección altamente sensible, técnicamente fácil, flexible, fiable y/o rápida de secuencias de ácido nucleico asociadas con aberraciones cromosómicas. En una realización, la invención proporciona la capacidad para adaptar el tiempo de hibridación variando la temperatura de la reacción de hibridación en un grado mucho mayor de lo que está disponible usando métodos de la técnica anterior. Las composiciones y los métodos de hibridación de la invención conservan la morfología de una muestra biológica, proporcionan una composición y un procedimiento de hibridación no tóxicos, proporcionan una técnica de hibridación con baja evaporación, reducen y/o eliminan la necesidad de bloquear la unión no específica y/o permiten el uso de sondas heterogéneas sin necesidad de bloquear, eliminar o inhabilitar de otro modo la unión de, por ejemplo, secuencias repetitivas en una muestra biológica.

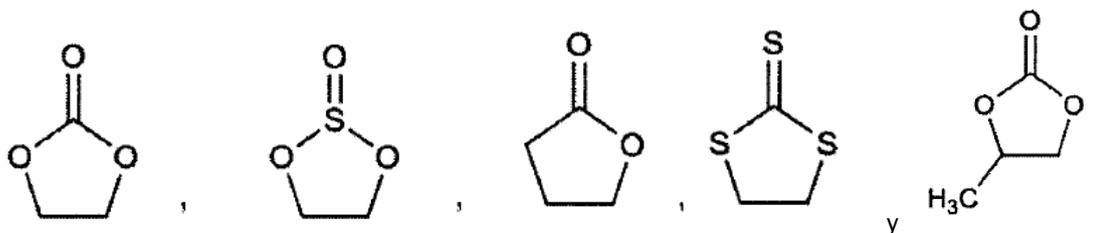
Por consiguiente, la invención proporciona un método de hibridación *in situ* para determinar la presencia de una aberración cromosómica en ADN cromosómico, que comprende:

- proporcionar al menos una sonda molecular que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico asociada con aberraciones cromosómicas,

- proporcionar ADN cromosómico,

5 - proporcionar una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación,

donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



10 donde la disolución de hibridación comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo, y

con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida,

- combinar la sonda molecular, el ADN cromosómico y la composición de hibridación durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular con la diana, y

- detectar la al menos una sonda molecular,

15 - y determinar la presencia de la aberración cromosómica.

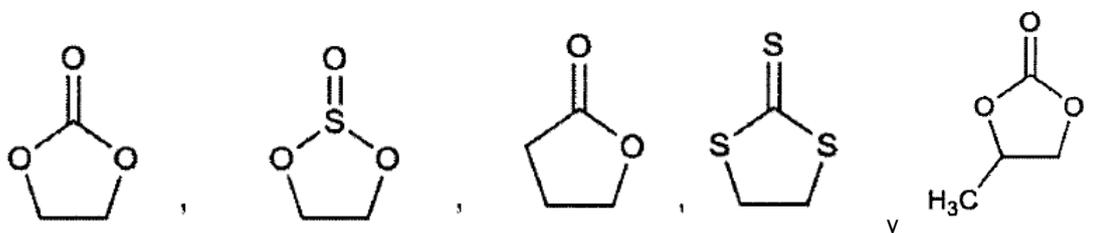
La invención proporciona además una composición de hibridación que comprende:

(a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica,

(b) del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y

20 (c) una disolución de hibridación, conteniendo dicha disolución de hibridación un agente acelerante, siendo el agente acelerante sulfato de dextrano,

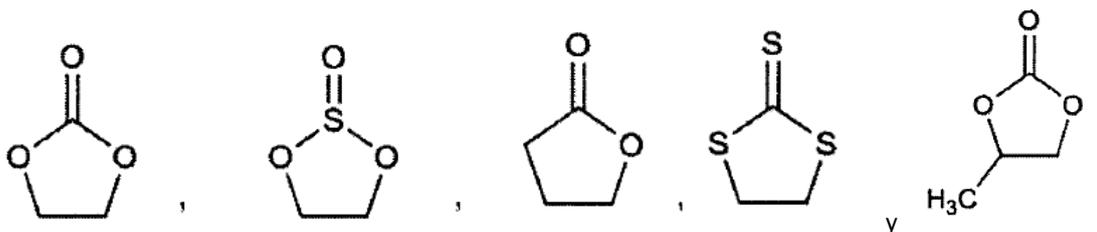
donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



y con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

25 La invención proporciona además un uso de una composición que comprende una sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica y una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación, en un ensayo de hibridación para detectar la secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica,

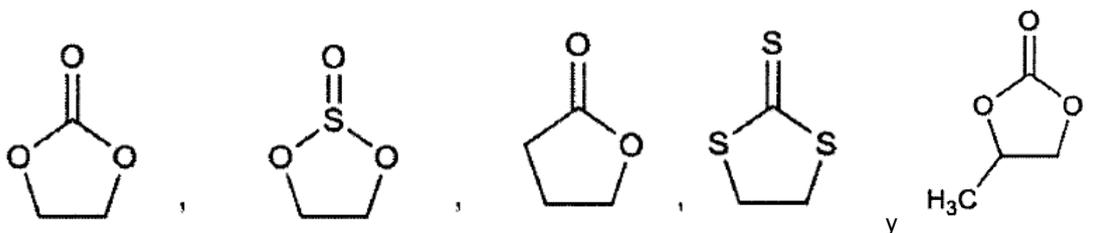
30 donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



y con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

La invención proporciona además un kit que comprende:

- 5 (a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica, y
- (b) una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación, conteniendo dicha disolución de hibridación un agente acelerante, siendo el agente acelerante sulfato de dextrano, donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



10

y con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

En una divulgación, la solicitud da a conocer una composición que comprende una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica, y una composición acuosa que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra. En otra divulgación, la solicitud da a conocer además un kit que comprende una composición de este tipo. En aún otra divulgación, la solicitud da a conocer además un kit que comprende una primera composición que comprende una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica, y una segunda composición, donde la segunda composición es una composición acuosa que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra.

Las composiciones y los kits proporcionados en el presente documento son útiles para el análisis *in vivo*, *in vitro* y/o *in situ* de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, ADN genómico, cromosomas, fragmentos de cromosoma y genes usando técnicas tales como PCR, PCR *in situ*, transferencia de tipo Northern, transferencia de tipo Southern, citometría de flujo, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, quimioluminiscencia, inmunohistoquímica, cariotipo virtual, ensayo génico, microalineamiento de ADN (por ejemplo, hibridación genómica comparativa con alineamientos (CGH con alineamientos)), obtención de perfiles de expresión génica, ID génica, alineamiento Tiling, electroforesis en gel, electroforesis capilar e hibridaciones *in situ* tales como FISH, SISH, CISH. En una realización, las composiciones y los kits son útiles para el análisis *in vivo*, *in vitro* o *in situ* de ácidos nucleicos para determinar aberraciones cromosómicas tales como aneuploidía, posible punto de rotura, inserción, inversión, delección, duplicación, amplificación génica, redistribución y translocación asociadas con un estado normal o una enfermedad (tal como, por ejemplo una enfermedad congénita, cáncer o infección). Las composiciones y los kits proporcionados en el presente documento también son útiles para la detección de cambios en los niveles de expresión de ARN, por ejemplo, ARNm y su ADN complementario (ADNc). Las composiciones y los kits de la invención pueden usarse con muestras *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo, por ejemplo, muestras de mamíferos tales como, por ejemplo, muestras de ser humano) tales como frotis de médula ósea, frotis de sangre, preparaciones tisulares incrustadas en parafina, muestras tisulares disociadas enzimáticamente, médula ósea, amniocitos, preparaciones en Cytospin, impresiones, etc.

Otros usos incluyen ensayos de hibridación basada en disolución usando FRET y otras técnicas de extinción; detección de marcadores de biotina con conjugados de estreptavidina, por ejemplo, usando el sistema de detección amplificada *in situ* Dako GenPoint™ o el sistema de amplificación de la señal de tiramida (TSA) (K0620, Dako); o el marcaje directo con metales, por ejemplo, oro y plata.

En una divulgación, la solicitud da a conocer un método de detección de una diana en ADN cromosómico que comprende:

- proporcionar al menos una sonda molecular que se hibrida con la diana en ADN cromosómico,
- proporcionar ADN cromosómico,

5 - proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra, donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO),

- combinar la sonda molecular, el ADN cromosómico y la composición de hibridación al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular con la diana, y

10 - detectar la diana.

En otra divulgación, la solicitud da a conocer un método de determinación de la presencia de una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

- proporcionar al menos una sonda molecular,
- proporcionar la secuencia de ácido nucleico,

15 - proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra, donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO),

- combinar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico y la composición de hibridación al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y

20 - detectar la al menos una sonda molecular,

- y determinar la presencia de la aberración cromosómica.

En aún otra divulgación, la solicitud da a conocer un método de determinación de la presencia de una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

- proporcionar la secuencia de ácido nucleico,

25 - proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos una sonda molecular y al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra,

- aplicar la composición de hibridación a dicho ácido nucleico al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y

- detectar la al menos una sonda molecular,

30 - y determinar la presencia de la aberración cromosómica,

donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

En otra divulgación, la solicitud da a conocer un método de determinación de la presencia de una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

- proporcionar la secuencia de ácido nucleico,

35 - aplicar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50 a dicha secuencia de ácido nucleico al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y

- determinar si está presente la aberración cromosómica en la secuencia de ácido nucleico.

40 En una divulgación adicional, la solicitud da a conocer un método de diagnóstico de un trastorno genético congénito, cáncer o una infección asociados con una aberración cromosómica, comprendiendo el método proporcionar una muestra tisular de un sujeto, donde la muestra tisular comprende una secuencia de ácido nucleico, determinar si está presente una aberración cromosómica en la secuencia de ácido nucleico, y diagnosticar el trastorno genético congénito, cáncer o la infección si está presente la aberración cromosómica en la muestra tisular. La muestra puede ser una muestra de mamífero. En una divulgación, la muestra es una muestra de ser humano.

45 Las composiciones y los métodos de hibridación de la invención pueden, por ejemplo, eliminar el uso de, o reducir la dependencia de, formamida. Por ejemplo, los métodos y las composiciones de la invención pueden disminuir la

barrera de energía para la hibridación sin el uso de formamida. La menor barrera de energía puede reducir el tiempo y/o la temperatura necesarios para la hibridación. Por ejemplo, la invención puede permitir la hibridación a menores temperaturas, incluyendo temperatura ambiente, o puede permitir una rápida hibridación a mayores temperaturas. Por tanto, en algunos aspectos, la presente invención supera una etapa que lleva mucho tiempo principal en ensayos de hibridación.

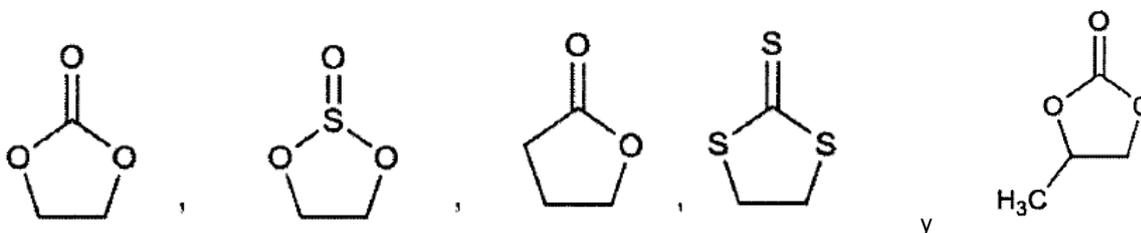
Un aspecto de la invención es una composición o disolución para su uso en hibridación. Las composiciones dadas a conocer incluyen una composición acuosa que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico y al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias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

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

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

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

Según la presente invención, los disolventes apróticos polares adecuados para su uso en la invención son compuestos cíclicos, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en



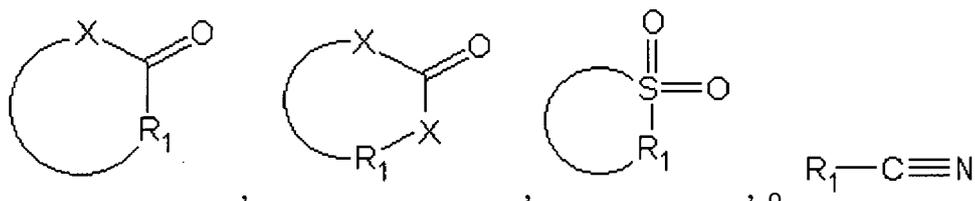
Un compuesto cíclico tiene una estructura de base cíclica. Los ejemplos incluyen los compuestos cíclicos dados a conocer en el presente documento. En otras divulgaciones y realizaciones, el disolvente aprótico polar puede elegirse de las fórmulas 1-4 a continuación:

Fórmula 1

Fórmula 2

Fórmula 3

Fórmula 4

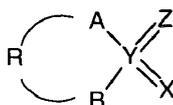


en las que X es O y R1 es alquildiilo.

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

5

Fórmula 5



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

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

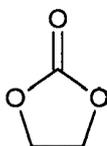
en la que A y B son independientemente O o N o S o parte del alquildiilo o una amina primaria;

10 en la que R es alquildiilo; y

en la que Y es O o S o C.

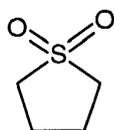
Se proporcionan ejemplos de disolventes apróticos polares dados a conocer y de la invención adicionales según la fórmula 5 en las fórmulas 6-9 a continuación:

Fórmula 6



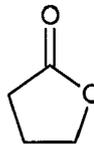
en la que:
X no existe;
A, B y Z son O;
Y es C; y
R es etano-1,2-diilo
(un disolvente aprótico polar de la invención);

Fórmula 7



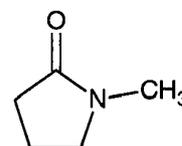
en la que:
Z y X son O;
A y B forman parte del alquildiilo;
Y es S; y
R es butano-1,4-diilo (no un disolvente aprótico polar de la invención);

Fórmula 8



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

Fórmula 9



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

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

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

Breve descripción de los dibujos

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

la etapa de pretratamiento térmico; la tercera barra representa la etapa de digestión; la cuarta barra representa la etapa de desnaturalización e hibridación; la quinta barra representa la etapa de lavado de rigurosidad; y la sexta barra representa la etapa de montaje.

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

10 Descripción detallada

I. Definiciones

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

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

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

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico peptídico” o “PNA” significa un polímero sintético que tiene una estructura principal de poliamida con nucleobases colgantes (que se producen de manera natural y modificadas), incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera de los segmentos de oligómero o polímero a los que se hace referencia o se reivindican como ácidos nucleicos peptídico en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.539.082, 5.527.675, 5.623.049, 5.714.331, 5.718.262, 5.736.336, 5.773.571, 5.766.855, 5.786.461, 5.837.459, 5.891.625, 5.972.610, 5.986.053, 6.107.470, 6.201.103, 6.228.982 y 6.357.163, documento 30 WO 96/04000. La nucleobase colgante, tal como, por ejemplo, una base de purina o pirimidina en PNA puede conectarse a la estructura principal mediante un ligador tal como, por ejemplo, uno de los ligadores que se enseñan en el documento PCT/US02/30573. En una realización, el PNA tiene una estructura principal de N-(2-aminoetil)-glicina). Pueden sintetizarse PNA (y opcionalmente marcarse) tal como se enseña en el documento 35 PCT/US02/30573. Los PNA se hibridan fuertemente y con alta especificidad de secuencia, con ADN y ARN, porque la estructura principal de PNA no está cargada. Por tanto, sondas de PNA cortas pueden presentar especificidad comparable con sondas de ADN o ARN más largas. Las sondas de PNA también pueden mostrar mayor especificidad en la unión a ADN o ARN complementario.

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

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

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

55 “Alquidiilo” se refiere a un radical hidrocarbonado saturado o insaturado, ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene dos centros radicálicos monovalentes derivados mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original.

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

“Hibridación” ha de entenderse como incorporar tanto las etapas de desnaturalización como de reapareamiento del procedimiento de hibridación a menos que se especifique de otro modo.

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

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

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

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

20 El término “detectar”, tal como se usa, por ejemplo, en el contexto de una sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica, significa que la sonda molecular se hibrida con al menos una parte de la secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos en proximidad a tal secuencia, lo que permitiría a un usuario determinar la presencia o ausencia de la secuencia.

25 El término “marcador”, tal como un marcador para una aberración cromosómica, es cualquier secuencia que se asocia con una aberración cromosómica que puede usarse para detectar la presencia o ausencia de una aberración cromosómica con, o sin, el uso de uno o más de otros marcadores.

30 “Parámetros de solubilidad de Hansen” y “HSP” se refieren a los siguientes parámetros de energía de cohesión (solubilidad): (1) el parámetro de solubilidad en dispersión (δ_D , “parámetro D”), que mide interacciones apolares derivadas de las fuerzas atómicas; (2) el parámetro de solubilidad en medio polar (δ_P , “parámetro P”), que mide interacciones de dipolo permanente-dipolo permanente; y (3) el parámetro de solubilidad por enlaces de hidrógeno (δ_H , “parámetro H”), que mide el intercambio de electrones. Los parámetros de solubilidad de Hansen se definen adicionalmente a continuación.

35 “Secuencias repetitivas” ha de entenderse como que se refiere al rápido reapareamiento (aproximadamente el 25%) y/o reapareamiento intermedio (aproximadamente el 30%) de componentes de genomas de mamíferos. Los componentes de rápido reapareamiento contienen secuencias altamente repetitivas pequeñas (de unos pocos nucleótidos de largo) que se encuentran habitualmente en tándem (por ejemplo, ADN satélite), mientras que los componentes de reapareamiento intermedio contienen ADN repetitivo disperso. Las secuencias repetidas dispersas se clasifican como o bien SINE (secuencias repetidas dispersas cortas) o LINE (secuencias repetidas dispersas largas), que se clasifican ambas como retrotransposones en primates. Las SINE y LINE incluyen, pero no se limitan a, repeticiones de Alu, repeticiones de Kpn, repeticiones de dinucleótido, repeticiones de trinucleótido, repeticiones de tetranucleótido, repeticiones de pentanucleótido y repeticiones de hexanucleótido. Las repeticiones de Alu componen la mayoría de SINE humanas y se caracterizan por una secuencia consenso de aproximadamente 280 a 40 300 pb que consisten en dos secuencias similares dispuestas como dímero de cabeza a cola. Además de SINE y LINE, también existen secuencias repetidas en telómeros de cromosomas en los extremos terminales de 45 cromosomas y centrómeros de cromosoma, que contienen distintas secuencias repetidas que sólo existen en la región central de un cromosoma. Sin embargo, a diferencia de las SINE y LINE, que se dispersan aleatoriamente en la totalidad del genoma completo, las secuencias repetidas de telómero y centrómero se localizan en una determinada región del cromosoma.

50 “No tóxico” y “toxicidad reducida” se definen con respecto al etiquetado de toxicidad de formamida según “Directive 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council of 31 May 1999 concerning the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging, and labelling of dangerous preparations” (ecb.jrc.it/legislation/1999L0045EC.pdf) (“Directiva”). Según la Directiva, la toxicidad se define usando el siguiente orden de clasificación: T+ “muy tóxico”, T “tóxico”, C “corrosivo”, Xn “dañino”, Xi “irritante”. Las frases de riesgo (“frases R”) describen los riesgos de la toxicidad clasificada. La formamida se 55 enumera como T (tóxico) y R61 (puede provocar daños al feto). Todos los productos químicos siguientes se clasifican como menos tóxicos que la formamida: acetonitrilo (Xn, R11, R20, R21, R22, R36); sulfolano (Xn, R22); γ -butirolactona (Xn, R22, R32); y carbonato de etileno (Xi, R36, R37, R38). En el momento de presentar esta solicitud,

no están etiquetados actualmente el tritio carbonato de etileno y sulfito de glicol.

Una "sonda molecular" se refiere a una sonda de "ácido nucleico" o a una sonda de "análogo de ácido nucleico". Tal como se usa en el presente documento, el término "sonda" ha de entenderse como una cadena de ácido nucleico, que puede componerse por completo por ADN, ARN, PNA, LNA, análogos naturales o sintéticos de los mismos, o mezclas de los mismos, que detecta una secuencia de nucleótidos particular. Además, pueden unirse bases en una sonda mediante una unión distinta de un enlace fosfodiéster, siempre que no impida la hibridación. Una sonda molecular que detecta una mutación particular es una que se une a una secuencia diana característica de esa mutación. El término "unir" es sinónimo de "hibridar". Cuando dos moléculas se hibridan, forman una combinación de las dos moléculas a través de uno o más tipos de enlaces químicos, a través del apareamiento complementario de bases, o a través de la formación de enlaces de hidrógeno. El término "secuencia diana" se refiere a la secuencia de nucleobases que trata de determinarse.

Una "aberración cromosómica" o anomalía cromosómica es una variación de una secuencia cromosómica normal, tal como, por ejemplo un cambio en el número de cromosomas (aneuploidía), un cambio en el número de copias de genes (amplificación, delección, duplicación, aneuploidía), posible punto de rotura, inserción, inversión, redistribución o translocación.

II. Composiciones

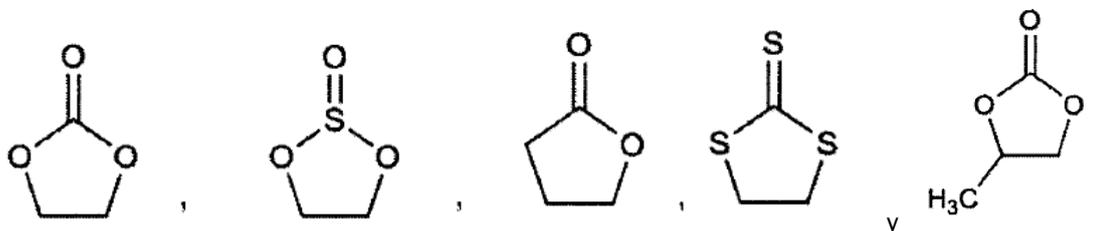
La invención proporciona una composición de hibridación que comprende:

(a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica,

(b) del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y

(c) una disolución de hibridación, conteniendo dicha disolución de hibridación un agente acelerante, siendo el agente acelerante sulfato de dextrano,

donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



y con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

Una divulgación de la solicitud proporciona composiciones que comprenden sondas moleculares y composiciones acuosas (que comprenden al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra) para su uso en hibridación. En general, tales composiciones pueden comprender cualquier sonda molecular y cualquier composición acuosa descrita en el presente documento.

A. Sondas moleculares

Se describen sondas moleculares que son adecuadas para su uso en la invención, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0266459. En general, una sonda molecular es normalmente un ácido nucleico de doble o de una sola hebra, incluyendo, por ejemplo, ADN, ARN, PNA y LNA. Una sonda puede tener cualquier longitud adecuada para detectar la diana. Generalmente, una sonda se compone de fragmentos más pequeños de tamaños variables (por ejemplo, de aproximadamente 50 pb a aproximadamente 500 pb cada uno) de manera que la sonda abarcará, en total, de aproximadamente 30 kb a aproximadamente 2 Mb. Por ejemplo, una sonda puede tener 1-100, 1-10, 7-15, 10-200, 10-20, 10-30, 10-50, 20-40, 30-50, 40-60, 50-70, 50-100, 50-150, 60-80, 70-90 ó 80-100 kb de longitud. Las sondas pueden usarse para detectar, cuantificar, identificar o analizar moléculas de ácido nucleico u otras moléculas que se unen a las sondas.

En general, pueden prepararse sondas mediante síntesis química o amplificando una secuencia de ADN específica mediante clonación, insertando el ADN en un vector, y amplificando el vector y el inserto en células huésped apropiadas. Los vectores usados comúnmente incluyen plásmidos bacterianos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC) o cromosomas artificiales de levadura (YAC). Entonces se extrae el ADN amplificado y se purifica para su uso como sonda. Se conocen en la técnica métodos para preparar y/o sintetizar sondas, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento PCT/US02/30573.

Las sondas usadas en los métodos y las composiciones de la invención comprenderán, en una realización, tanto fragmentos únicos así como fragmentos repetidos. Las sondas de análogo de ácido nucleico, tales como sondas de PNA, son generalmente sondas más cortas, bien definidas que comprenden normalmente desde aproximadamente 10 hasta 15 nucleobases. Una sonda de PNA se compone habitualmente de varias sondas individuales, cada una de las cuales tiene de 10 a 25 unidades de nucleobase.

La solicitud da a conocer una única sonda molecular. La solicitud también da a conocer un par de sondas moleculares. La solicitud da a conocer 2, 3, 4, 5, 10 o más sondas o pares de sondas. En una realización, se usa un par de sondas distinto y equilibrado, tal como se enseña en el documento de patente estadounidense n.º 6.730.474. Cada uno de los pares distintos y equilibrados de sondas puede, por ejemplo, hibridarse con diferentes cromosomas implicados en una translocación, o con regiones flanqueantes de un posible punto de rotura. En otra realización, pueden emplearse dos conjuntos de sondas de hibridación, uno o más de los cuales comprenden sondas de PNA, como en la patente estadounidense n.º 7.105.294. En una realización, se usan al menos dos conjuntos de sondas de hibridación, pudiendo al menos un conjunto hibridarse con secuencias de ácido nucleico específicas relacionadas con una posible aberración en un cromosoma, y pudiendo al menos otro conjunto hibridarse con secuencias de ácido nucleico específicas relacionadas con otra o la misma posible aberración en un cromosoma.

Existen varios tipos de sondas que pueden usarse para hibridarse con una muestra de ácido nucleico (véase generalmente Szeles, Acta Microbiol. Immunol. Hungarica, 49:69-80 (2002)). Estas sondas incluyen secuencias cortas de ADN genómico o ADNc, representaciones cromosómicas completas, repeticiones cromosómicas y genomas completos. En el caso de sondas genómicas, las secuencias repetidas frecuentemente en genomas de mamíferos tienen una conservación evolutiva relativamente baja. Por tanto, puede usarse ADN nuclear total o genómico como sonda específica de especie. Las representaciones cromosómicas son colecciones de secuencias de ADN derivadas de un solo tipo de cromosoma y pueden identificar ese tipo de cromosoma específico en núcleos en metafase e interfase. Diferentes tipos cromosómicos también tienen secuencias repetidas únicas que pueden seleccionarse como diana para hibridación con sonda (véase Cremer *et al.*, Hum. Genet., 74:346-52 (1986)). Las sondas de inserción grandes que seleccionan como diana secuencias de una sola copia únicas son otro ejemplo de un tipo de sonda que puede usarse en ensayos de hibridación. Estas sondas pueden estar en cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC) o cromosomas artificiales de levadura (YAC). Con estas sondas grandes, la eficacia de hibridación es inversamente proporcional al tamaño de la sonda. No obstante, se han usado sondas de tan sólo 2 kb (véase *id.*).

En general, el tipo de sonda determina el tipo de característica que puede detectar la sonda. Se usan sondas que se hibridan a lo largo de todo un cromosoma (representación cromosómica completa) para contar el número de un determinado cromosoma, muestran translocaciones o identificar fragmentos extracromosómicos de cromatina. También pueden usarse sondas más pequeñas para detectar aberraciones tales como deleciones, amplificaciones, inversiones, duplicaciones y aneuploidía. En otro ejemplo, pueden usarse mezclas de sondas específicas de locus para detectar y contar cromosomas específicos. Dos o más sondas específicas de locus coloreadas de diferente manera, por ejemplo, pueden usarse para detectar translocaciones mediante hibridación de señales separadas *in situ*, y pueden usarse mezclas de sondas centroméricas específicas de secuencias repetitivas para detectar y contar cromosomas específicos.

En general, la capacidad para discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas es inversamente proporcional a la longitud de la sonda de hibridación debido a que la diferencia de estabilidad térmica disminuye entre los complejos silvestres y mutantes a medida que aumenta la longitud de la sonda. Se requieren generalmente sondas de más de 10 pb de longitud para obtener la diversidad de secuencia necesaria para identificar correctamente un organismo único o un estado clínico de interés. Por ejemplo, secuencias de ADN específicas, tales como el gen ABL, pueden teñirse de manera fiable usando sondas que tienen 15 kb de largo. Por otra parte, diferencias de secuencia tan sutiles como una sola base (mutación puntual) en oligómeros muy cortos (<10 pares de bases) pueden ser suficientes para posibilitar la discriminación de la hibridación con secuencias diana de ácido nucleico complementarias en comparación con secuencias no diana.

En una realización, al menos un conjunto de las sondas de hibridación *in situ* puede comprender una o más sondas de PNA, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.105.294. PNA es un polímero sintético que tiene una estructura principal peptídica (*N*-(2-aminoetil)-glicina) con bases de purina y pirimidina colgantes. Debido a que la estructura principal de PNA no está cargada, a diferencia del ADN y ARN, las interacciones PNA/ADN y PNA/ARN son más intensas de lo que serían las interacciones ADN/ADN o ADN/ARN correspondientes. Por consiguiente, las sondas de PNA pueden ser más cortas que las sondas de ADN o ARN al tiempo que conservan una especificidad similar. Las sondas de PNA también muestran mayor especificidad en la unión a ADN o ARN complementario, puesto que los apareamientos erróneos de bases de PNA/ADN (o PNA/ARN) son más desestabilizantes que apareamientos erróneos similares en un dúplex ADN/ADN (o ARN/ARN). Además, los PNA son relativamente resistentes a la degradación enzimática por proteasas y nucleasas.

Alternativamente, o además, al menos un conjunto de las sondas de hibridación en cualquiera de las técnicas comentadas anteriormente puede comprender una o más sondas de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como se describe en el documento WO 99/14226. Los LNA contienen un enlace en puente adicional entre los carbonos en 2' y 4', lo que da como resultado una conformación 3'-endo rígida y la consiguiente preorganización de la estructura

principal de nucleótidos para la hibridación. Las interacciones LNA/ADN y LNA/ARN son más intensas que las interacciones ADN/ADN y ADN/ARN correspondientes, tal como se indica mediante una mayor temperatura de fusión. Por tanto, los métodos y las composiciones de la invención, que disminuyen la energía requerida para la hibridación, son particularmente útiles para hibridaciones con sondas de LNA.

5 En una realización, una sonda puede comprender un marcador detectable (una molécula que proporciona una señal identificable analíticamente que permite la detección del híbrido sonda-diana). Tal como se usa en el presente documento, un marcador detectable se refiere a restos que pueden unirse directa o indirectamente a un oligómero o polímero para hacer de ese modo que el oligómero o polímero sea detectable mediante un instrumento o método. Cualquier método de marcaje conocido por los expertos en la técnica, incluyendo procesos enzimáticos y químicos, puede usarse para el marcaje de sondas usadas en los métodos y las composiciones de la invención.

En una realización, un marcador detectable puede unirse directamente a una sonda. En otra realización, un marcador detectable puede unirse indirectamente a una sonda, por ejemplo, usando un ligador. En otras realizaciones, las sondas no se marcan.

15 Un marcador detectable puede ser, por ejemplo, un fluorocromo, un cromóforo, un marcador de espín, a radioisótopo, una enzima, un hapteno, punto cuántico, perlas, aminohexilo, pireno y un compuesto con quimioluminiscencia, tal como naranja de acridina. Los fluorocromos que pueden usarse en el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, colorantes IR, colorantes de Dyomics, ficoeritrina, Cascade blue, Oregon green 488, Pacific blue, verde de rodamina, 5(6)-carboxifluoresceína, colorantes de cianina (es decir, Cy2, Cy3, Cy 3.5, Cy5, Cy5.5, Cy 7) (dietil-amino)cumarina, fluoresceína (es decir, FITC), tetrametilrodamina, Lissamine, Texas Red, AMCA, TRITC y colorantes Alexa. Los haptenos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 5(6)-carboxifluoresceína, 2,4-dinitrofenilo, digoxigenina, rodamina, bromodesoxiuridina, acetilaminofluoreno, mercurio trinitrofenol, estradiol y biotina. Las enzimas que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de soja, fosfatasa alcalina y peroxidasa del rábano picante. En una realización, el marcador puede ser un marcador radiactivo tal como, por ejemplo, ³¹P, ³³P o ³²S. En otra realización, una sonda puede marcarse con un hapteno tal como, por ejemplo, digoxigenina o biotina. Una sonda también puede marcarse con partículas de metales pesados o con una enzima que tiene sustratos cromogénicos o fluorogénicos. Una sonda también puede marcarse con cualquier otro marcador conocido por los expertos en la técnica.

30 Cuando está presente más de una sonda, cada sonda puede marcarse con un marcador distinto. Por ejemplo, en una realización, cuando se realiza FISH y la mezcla de hibridación contiene conjuntos de pares distintos y equilibrados de sondas, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.730.474, las sondas pueden marcarse con distintos marcadores de intensidad comparable.

35 En una realización usando hibridación cromogénica *in situ* (CISH), la mezcla de hibridación puede contener al menos un conjunto de sondas configurado para la detección con uno o más cromógenos orgánicos convencionales, y para hibridación con plata *in situ* (SISH), la mezcla de hibridación puede contener al menos un conjunto de sondas configurado para la detección con partículas de plata, tal como se describe en Powell RD *et al.*, "Metallographic *in situ* hybridization", Hum. Pathol., 38:1145-59 (2007).

40 En una realización, la formación de un híbrido sonda-secuencia de ácido nucleico se detecta tras la adición de un reactivo de visualización, tal como, por ejemplo, un anticuerpo (que puede ser monoclonal, y que puede comprender a su vez un marcador), un sustrato fluorogénico o cromogénico para una enzima, o cualquier otro reactivo de visualización adecuado conocido por el experto en la técnica.

45 En algunas realizaciones, las sondas pueden usarse para detectar cambios en la estructura cromosómica detectando un cambio en el patrón de tinción de la muestra en comparación con una muestra de control normal. Los ejemplos no exhaustivos de alteraciones cromosómicas que pueden detectarse con sondas moleculares incluyen aneuploidía, amplificaciones génicas, deleciones incluyendo deleciones génicas, fusiones génicas, translocaciones, duplicaciones, inserciones o inversiones. Tal como se usa en el presente documento, aneuploidía se refiere a cualquier desviación del estado euploide normal o la condición de tener menos de o más del número diploide normal de cromosomas. Tal como se usa en el presente documento, una amplificación se refiere a un aumento del número de copias de un fragmento de ADN específico. Tales fragmentos de ADN incluyen, por ejemplo, un gen o todo un cromosoma. Tal como se usa en el presente documento, una deleción se refiere a un acontecimiento genético en el que se ha retirado una secuencia de ácido nucleico de un cromosoma. Tal como se usa en el presente documento, una fusión génica se refiere a una unión accidental del ADN de dos genes. Pueden producirse fusiones génicas mediante translocaciones o inversiones y pueden dar lugar a proteínas híbridas o a la desregulación de la transcripción de un gen debido a la yuxtaposición de elementos reguladores en cis (por ejemplo, potenciadores o promotores) de otro gen. Tal como se usa en el presente documento, una translocación se refiere a un acontecimiento genético en el que una parte de la secuencia de ácido nucleico de un cromosoma se retira de ese cromosoma y se une a un cromosoma diferente. Tal como se usa en el presente documento, una duplicación se refiere a la repetición de una secuencia de nucleótidos en un cromosoma o un segmento de cromosoma. Una duplicación puede dar como resultado la repetición de una secuencia de nucleótidos en yuxtaposición lineal con respecto a la secuencia duplicada. Tal como se usa en el presente documento, una inserción se refiere a un

acontecimiento genético en el que una secuencia de ácido nucleico se ha introducido entre dos puntos en un cromosoma. Tal como se usa en el presente documento, una inversión es un acontecimiento genético en el que se ha invertido la orientación de una secuencia de ácido nucleico en un cromosoma. Tal como se usa en el presente documento, un punto de rotura cromosómico se refiere a una ubicación en el cromosoma en la que el cromosoma se rompe en dos fragmentos.

En algunas realizaciones, las sondas moleculares pueden flanquear regiones, por ejemplo, de aproximadamente 500.000 pb a cada lado del gen. Un ejemplo de sondas para el marcador TYMS que comprenden regiones flanqueantes de aproximadamente 500.000 pb son: CTD-2304H22; RP11-841C6; RP11-464L8; RP11-631M21; CTD-2573M23; CTD-3162G8G8; CTD-3232F7; RP11-170J2; RP11-252G7; RP11-699P24; RP11-805B24; CTD-3237F7; RP11-230P17; CTD-2359H18; RP11-1120H10; CTD-2509F1; RP11-431C15; RP11-36106; RP11-1066C16; CTD-2359H18; RP11-1066G14; RP11-1034P14; RP11-1034P22; CTD-3114P12; RP11-787A12; RP11-787C12; CTD-3149J12; RP11-195P12; CTD-2595P20; CTD-2168E8; RP11-621G7; CTD-3023M8; RP11-748B19; CTD-2064P19; RP11-461K16; RP11-630F5; CTD-3021E11; CTD-302817; RP11-1021K17; RP11-729G15; RP11-10415; RP11-595D13; RP11-43607; CTD-2646F10; RP11-104A15; CTD-2024F12; CTD-2169M24; RP11-140D22; RP11-848A7; CTD-2060D6; CTD-2298K5; CTD-3022J6; RP11-29P22; RP11-790010; RP11-89P6; RP11-9118; RP11-694N4; RP11-752I11; RP11-324G2; CTA-186D6; RP11-88C10; RP11-608N7; RP11-732L14; RP11-324G2; RP11-705O1; RP11-839O23; RP11-683J11; RP11-815L4; RP11-720L2; RP11-179K3; RP11-778P8; RP11-823F8; RP11-791M5; RP11-672L10; RP11-827M19; RP11-19J12; RP11-607C2; RP11-267C19; CTD-3214N24; RP11-1035E2; CTD-2004F18; CTD-3155L20; CTD-2281A22; CTD-3231L23; CTD-2014P18; RP11-1150C18; RP11-1170J1; CTD-790I9; RP11-76H24; RP11-48I21; CTC-775A10; CTD-2034018; RP11-431C11; RP11-50C2; CTD-2208G7; CTD-2345G8; RP11-797C9; RP11-133D9; RP11-655D4; RP11-14P20; RP11-103B23; RP11-806L2; RP11-145B19; CTD-2593J12; CTD-3215I7; RP11-381D10; RP11-769O8; RP11-95H4; RP11-552E8; RP11-914P23; RP11-904F1; RP11-164C14; CTD-3040A20; RP11-1152E8; CTD-3065D24; CTD-3243B17; CTD-3243D18; CTD-3243D19; CTD-3113H2; RP11-1120E20; CTD-3046I16; RP11-635J20; RP11-114M20; RP11-1018M4; CTA-344N3; RP11-137K7; RP11-689C9; RP11-1005B18; RP11-126M20; CTD-2134I3; RP11-701F4; CTD-3236J23; CTD-3047L19; CTD-3240G16; CTD-3148N6; RP11-22J24; RP11-1094D2; CTD-2182K19; RP11-107A13; RP11-134P22; RP11-636P15; RP11-78F17; CTD-2221P22; CTD-2011M14; RP11-626B11; y RP11-27K24.

En otras realizaciones, las sondas pueden unirse dentro de una región cromosómica que codifica para un gen o que no codifica para un gen. Por ejemplo, las sondas pueden unirse a regiones cromosómicas asociadas con la ruta de 5-FU incluyendo timidilato sintasa (TYMS), dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina fosforilasa (TP), dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), timidina cinasa (TK) y 5-metil-tetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa, MTR).

En una realización, una sonda molecular detecta un trastorno genético congénito tal como, por ejemplo, síndrome del cromosoma X frágil. Otros trastornos genéticos congénitos que pueden detectarse incluyen, por ejemplo, síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Wolf-Hirschhorn, síndrome de Jacobsen, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A y translocación robertsoniana.

En una realización, una sonda molecular detecta un estado canceroso tal como, por ejemplo, un tumor sólido incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, mama, cervicouterino, colorrectal, de hígado, pulmón, páncreas, próstata, piel o uterino. En una realización, la sonda molecular detecta un tumor maligno hematopoyético, tal como, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma, mieloma múltiple o linfoma no Hodgkin. En una realización, la sonda molecular detecta un tumor maligno de células B o un tumor maligno de células T.

En otra realización, una sonda molecular detecta un patógeno infeccioso, tal como, por ejemplo, una bacteria, un virus u hongo. Por ejemplo, el patógeno puede ser, por ejemplo, virus de Epstein-Barr, virus de papiloma humano o virus del herpes simple. En otro ejemplo, el patógeno puede ser, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, especies de *Coccidioides*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* o virus del herpes simple.

En una realización, la sonda molecular detecta aberraciones (incluyendo, por ejemplo, redistribuciones, amplificaciones o deleciones) de *ALK*, *BCL2*, *BCL3*, *BCL6*, *BCL10*, *BCL12*, *BCR* (22q11), *CCND1*, *cyclinD1* (11q23), *E2A* (19p13), *EGFR* (7p11.2), *ETV6* (TEL) (12p13), *FIP1L1*, *HER2* (ERBB2) (17q21.1), *IGH* (14q32), *IGK* (2p11), *IGL* (22q11), *MALT1*, *MLL* (*ALL-1*, *HTRX1*, *HRX*) (11q23), *MYC* (*c-Myc*) (8q24), *PAX5*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *SIL*, *TCF3* (*E2A*, *ITF1*), *TCL1A*, *TCRAD*, *TCRB*, *TCRG*, telómero, *TLX1*, *TLX3* (*HOX11L2*, *RNX*) o *TOP2A*. Por ejemplo, las sondas pueden usarse para detectar una redistribución génica común en cáncer infantil caracterizada por la fusión de *ETV6* y *AML1* (también conocido como *RUNX1* y *CBFA2*).

En una realización (incluyendo, por ejemplo, en el contexto de un tumor maligno hematopoyético), una sonda molecular detecta una translocación, tal como, por ejemplo, una translocación elegida de t(1;14) (q34;q11), t(1;19) (q23;p13), t(2;5), t(2;18) (q12;q21), t(2;8), t(4;11), t(4;11) (q21;q23), t(6;11) (q27;q23), t(7;22) (p22;q12), t(8;14), t(8;22), t(9;11) (p22;q23), t(9;22) (q34;q11), t(10;14) (q24;q11), t(11;14), t(11;14), t(11;14) (p13;q11), t(11;19) (q23;p13), t(14;18) (q23;q21), t(14;18), t(18;22) (q21;q11) y t(21;22) (q22;q12). En otra realización, una sonda molecular detecta una deleción, tal como una deleción de *TAL1*. En aún otra realización, una sonda molecular detecta una amplificación génica, tal como una amplificación de *EGFR*, *MYC*, *TOP2A* o *HER2*. En tales casos, una sonda puede

aparearse con una sonda de referencia. Por ejemplo, una sonda que detecta *EGFR* pueden aparearse con una sonda que detecta *CEN-7*, una sonda que detecta *MYC* puede aparearse con una sonda que detecta *CEN-8*, y una sonda que detecta *HER2* puede aparearse con una sonda que detecta *CEN-17*.

5 Las dianas para sondas a modo de ejemplo que pueden usarse en las composiciones y los métodos de la invención para detectar enfermedades no hematológicas incluyen, por ejemplo, *BASE*, *BRCA1*, *CCND1*, *CCNE1*, *DCD*, *E2F3*, *n-MYC/MYCN*, *COX-2/PTGS2*, *LRIG1*, *ER a*, *hTERT*, *MLN64/ STARD3*, *PGR*, *SNAI1*, *SRC*, *TOP1*, *TUBB1*, *AIB1*, *DLC-1*, *EDD*, *Pip4k2b/5k*, *Sil*, *TBX2*, *c-Kit*, *VEGF*, *VCAM-1*, *Tie-1*, *Ts/TYMS*, *PSMA*, *PSA*, *PAP*, *P15*, *P16*, *BCL1*, *BCL2*, *MTOR*, *TIMP1*, *ESR1*, *PTEN*, *MDM2/CDK4*, *MET*, *C-MET*, *ERB1*, *FGFR1*, *IGF1R*, *NET*, *FGFR3*, *ABCB1*, *TMPRSS2*, *BRCA2*, *TOP2B*, *ERCC1*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *HRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *HER3*, *HER4*, *ENT1*, *RRM1*, *RRM2*,
10 *RRM2B*, *PIK3CA*, *AURK4*, *AURKB*, *AURKC*, *MAPT/tau*, *TTBK1*, *TUBB*, *VEGFR*, *CCND3*, *CDK6*, *CDK2*, *CDC2*, *HDAC*, *ESR2*, *SCUBE2*, *BIRC5*, *FASN*, *DHFR*, *TP/ECGF1*, *TYMP*, *DPYD*, *TK1*, *HMGIC*, *ABCA2*, *ABCB11*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCG2*, *MVP*, *ATP7A*, *ATP7B*, *SLC29A1*, *SLC28A1*, *SLC19A1*, *TUBB4*, *TUBA*, *MAP4*, *MAP7*, *STMN1*, *KIF5B*, *HSPA5*, *PSMD14*, *FPGS*, *GSTP1*, *GPX*, *GCLC*, *GGT2*, *MT*, *AKR1B1*, *HMGB1*, *HMGB2*, *XPA*, *XPD*, *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *APEX1*, *MGMT*, *GLO1*, *RB1*, *GML*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*,
15 *ERBB2*, *KRAS2*, *ITGB1*, *JUN*, *FOS*, *NFKB1*, *TP53*, *TP73*, *BCL2L1*, *MCL1*, *BAX*, *BIRC4*, *TNFRSF6*, *CASP3*, *CASP8*, *HSPB1*, *MALAT1(alfa) t(11;19)(q11;q13.4)*, *MHLB1 t(11;19)(q11;q13.4)*, *COL1A1 t(17;22)(q22;q13)*, *PDGFB t(17;22)(q22;q13)*, *FKHR t(2;13) & t(1;13)*, *ETV6 t(12;15)(p13;q25)*, *NTRK3 t(12;15)(p13;q25)*, *TLS/FUS t(12;16)(q13;p11)*, *CHOP t(12;16)(q13;p11)*, *EWS t(12;22)(q13;q12)*, *EWS/FLI1 t(11;22)(q24;q12)* y *FLI1 t(11;22)(q24;q12)*.

20 Las dianas para sondas a modo de ejemplo que pueden usarse en las composiciones y los métodos de la invención para detectar enfermedades hematológicas incluyen, por ejemplo, sondas para detectar dianas de enfermedades mieloproliferativas crónicas tales como, por ejemplo, *ABL t(9;22)(q34;q11)*, *PRDM16 del(1p36.32)*, *del(21q22.12)*, *RUNX1/AML1 del(1p36.32)*, *del(21q22.12)*, *CEP8*, *PDGFRB*, *NUP98*, *FGFR1* y *ASS*; sondas para detectar dianas de leucemia mieloide aguda tales como, por ejemplo, *ETO t(8;21)(q22;q22)*, *AML1 t(8;21)(q22;q22)*, *CBFbeta inv(16)(p13q22)* o *t(16;16)(p13;q22)*, *MYH11 inv(16)(p13q22)* o *t(16;16)(p13;q22)*, *AF9 t(9;11)*, *PML t(15;17)(q22;q21)*, *PLZF t(11;17)(q23;q21)*, *NuMA t(11;17)(q13;q21)*, *NPM t(5;17)(q23;q12)*, *RAR alfa t(15;17)(q22;q21) t(11;17)(q23;q21) t(11;17)(q13;q21) t(5;17)(q23;q21)*, *EVI1 t(3;v)(q26;v)*, *GR6 t(3;3)(q21;q26)*, *RPN1 t(3;3)(q21;q26)*, *DEK t(6;9)*, *CAN t(6;9)*, *MLF1 t(3;5)(...;q23)*, *FUS t(16;21)*, *ERG t(16;21)*, *NUP98 t(7;11)*, *HOX9A t(7;11)*, *MOZ/MYST3 t(8;16)(p11;p13)*, *CBP t(8;16)(p11;p13)*, *p300 t(8;22)(p11;q13)*, *TIF2/GRIP-1/NCoA-2 inv(8)(p11q13)* y *MKL1*; sondas para detectar dianas de neoplasias de células T y B precursoras, tales como, por ejemplo, *PBX1 t(1;19)(q23;p13.3) + var.*, *ABL t(9;22)(q34;q11)*, *AF4/AFF1 t(4;11)(q21;q23)*, *AML1/RUNX1 t(12;21)(p13;q22)*, *IL3 t(5;14)(q31;q32)*, *HLF t(17;19)*, *IKZF1 del(7)(p12.2)*, *CDKN2A/CDKN2B del(9)(p21.3)*, aberraciones *TAL1 1p32*, *LMO2 t(11;14)(p13;q11) + var.*, *LMO1 t(11;14)(p15;q11)*, *HOX11 t(10;14)(q24;q11) + var.*, *TAL2 t(7;9)(q34;q32)* y *TAN1 t(7;9)(q34;q34)*; sondas para detectar dianas de neoplasias de células B maduras, tales como, por ejemplo, *CEP12*, *ATM*, *D13S25*, *D13S319*, *TP53*, *P53*, *TNFAIP3 del(6)(q23.3-q24.1)*, *CDK6 BCL1 t(11;14)(q13;q32) + var.*, *IRF4 t(6;14)(p25;q32)*, *C-MAF t(14;16)(q32;q23)*, *FGFR3 t(4;14)(p16;q32)* y *MUM2/3 t(1;14)(q21;q32)*; y sondas para detectar dianas de neoplasias de células NK y células T maduras, tales como, por ejemplo, *NPM t(2;5)(p23;q35)*, *ASS*, *RB1* y *ATM*.

40 Las dianas para sondas a modo de ejemplo que pueden usarse en las composiciones y los métodos de la invención para detectar centrómeros incluyen, por ejemplo, *CEP1*, *CEP2*, *CEP3*, *CEP4*, *CEP5*, *CEP6*, *CEP7*, *CEP8*, *CEP9*, *CEP10*, *CEP11*, *CEP12*, *CEP13*, *CEP14*, *CEP15*, *CEP16*, *CEP17*, *CEP18*, *CEP19*, *CEP20*, *CEP21*, *CEP22*, *CEP23*, *CEP X* y *CEP Y*.

45 Las dianas para sondas a modo de ejemplo que pueden usarse en las composiciones y los métodos de la invención también incluyen, por ejemplo, *CEP 18 (18p11.1-q11.1)*, *CEP X (Xp11.1-q11.1)*, *CEP Y (Yp11.1-q11.1)*, *LSI 13 (13q14)*, *LSI 21 (21q22.13-q22.2)*, *CEP 3 (3p11.1-q11.1)*, *CEP 7 (7p11.1-q11.1)*, *LSI (p16 9p21)*, *CEP 17 (17p11.1-q11.1)*, *CEP 1 (D1Z5) 1p11.1-q11.1*, *CEP 11q12*, *CEP 2 (D2Z1) 2p11.1-q11.1*, *CEP 3 (D3Z1) 3p11.1-q11.1*, *CEP 4 4p11-q11*. *CEP 6 (D6Z1) 6p11.1-q11*. *CEP 6 (D6Z1) 6p11.1-q11.1*, *CEP 7 (D7Z1) 7p11.1-q11.1*, *CEP 8 (D8Z2) 8p11.1-q11.1*, *CEP 9 9p11-q11*, *CEP 10 10p11.1-q11.1*, *CEP 11 (D11Z1) 11p11.11-q11.11*, *CEP 11 (D11Z1) 11p11.11-q11*, *CEP 12 (D12Z3) 12p11.1-q11*, *LSI 13 (13q4)*, *LSI 13 (RB1)*, *CEP 15 (D15Z1) 15p11.2*, *CEP 15 (D15Z4) 15p11.1-q11.1*, *CEP 16 (D16Z3) 16q11.2*, *CEP 17 (D17Z1) 17p11.1-q11.1*, *CEP 18 (D18Z1) 18p11.1-q11.1*, *CEP 20 (D20Z1) 20p11.1-q11.1*, *LSI 21*, *LSI 22 (BCR)*, *CEP X (DXZ1)Xp11.1-q11.1*, *CEP X (DXZ1)Y (DYZ1)* Xp11.1-q11.1 Yq12*, *CEP X (DXZ1)Y (DYZ3) Xp11.1-q11.1 Yp11.1-q11.1*, *CEP Y (DYZ1) Yq12*, *CEP Y (DYZ1)*, *CEP Y (DYZ3) Yp11.1-q11.1*, *LSI 1p36 / LSI 1q25 y LSI 19q13/19p13*, *LSI 4q12*, *LSI 9q34*, *LSI 13 (RB1) 13q14*, *LSI 13 (RB1)*, *LSI (13q34)*, *LSI 13 (13q14)*, *LSI 21*, *LSI 22 (BCR)*, *LSI ALK*, *LSI AML1/ETO*, gen del receptor de andrógenos *LSI (Xq12)*, *LSI API2/MALT1 t(11;18) (q21;q21)*, *LSI ATM (11q22.3)*, *LSI ATM / CEP 11*, *LSI BCL2*, *LSI BCR/ABL + 9q34*, *LSI BCR/ABL*, *LSI CBFb*, *LSI CCND1 (11q13)*, *LSI CHOP (12q13)*, *LSI CSF1R (5q33-q34) / D5S23*, *D5S721*, *LSI C-MYC (8q24.12-q24.13)*, *D1 de ciclina LSI (11q13) / CEP 11*, *LSI D13S25 (13q14.3)*, *LSI D13S319 (13q14.3)*, *LSI D13S319 (13q14.3) / LSI 13q34*, *LSI D20S108 (20q12)*, *LSI D5S23/D5S721*, *CEP9*, *CEP15*, *LSI D7S486 (7q31) / CEP 7*, *LSI D7S522 (7q31) / CEP 7*, *LSI EGFR / CEP 7*, *LSI EGR1 (5q31) / D5S23*, *D5S721*,
55 *LSI ETV6 (TEL) (12p13)*, *LSI EWSR1 (22q12)*, *LSI FKHR (13q14)*, *LSI FUS (16p11)*, *LSI IGH*, *LSI IGH/BCL2*, *LSI IGH/CCND1*, *LSI IGH/FGFR3*, *LSI IGH/MAF*, *LSI IGH/MALT1 t(14;18) (q32;q21)*, *LSI IGH/MYC*, *CEP 8*, *LSI MALT1 (18q21)*, *LSI MLL*, *LSI MYB (6q23)*, *LSI MYC*, *LSI N-MYC (2p24.1)*, *LSI N-MYC(2p24)/CEP 2 S*, *LSI p16 (9p21) / CEP 9*, *LSI p53 (17p13.1)*, *LSI p53 / LSI ATM y LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12*, *LSI PML/RARA*, *LSI PTEN (10q23) /*

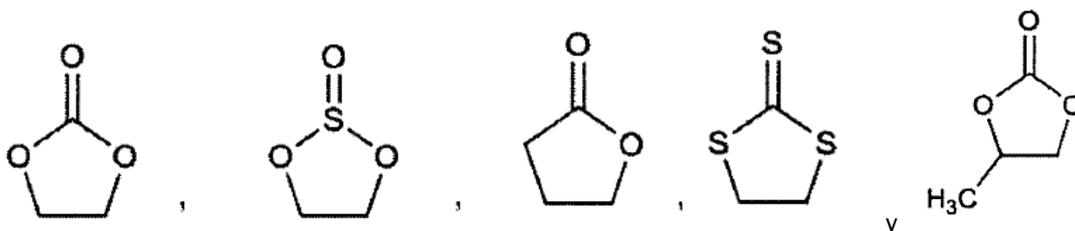
CEP 10, LSI RARA, LSI SYT (18q11.2), LSI TEL/AML1, LSI TCF3/PBX1, LSI TCR alfa/delta, LSI TOP2A, LSI TP53 / CEP 17, LSI ZNF217 (20q13.2), LSI p58 (1p36) LSI 1q25, LSI D5S23, D5S721, LSI EGR1/LSI D5S23, D5S721, LSI N25/ARSA, LSI TUPLE 1/LSI ARSA, LSI TUPLE1 (HIRA)/TelVysion 22q S, LSI KAL/CEP X, LSI LIS1/LSI RARA, LSI D15S10/CEP 15 (D15Z1)/PML, LSI D15S11/CEP 15 (D15Z1), LSI GABRB3/CEP 15 (D15Z1), LSI SNRPN/CEP 15 (D15Z1)/LSI PML, Región LSI SMS/LSI RARA, LSI NSD1 (5q35), LSI SRY/CEP X, LSI SRY, LSI STS/LSI CEP X, LSI ELNe/LSI D7S486, D7S522, LSI WHS/CEP 4, CEB 108/T7 1p, VIJ2yRM2052 (U32389) 2p, 3PTEL25 (D3S4559) 3p, 4p022 (D4S3359, 6244599) 4p, C84c11/T7 5p, 6PTEL48 6p, VIJ2yRM2185 (G31341) 7p, AFM 197XG5 (D8S504, 199153) 8p, 305J7-T7 9p, 10p006 (Z96139) 10p, VIJ2 (D11S2071, U12896) 11p, VIJ3 (sAVH27,U57865) 12p, STSG608831 STSG608938 16p, 282M16/SP6 17p, VIJ2yRM2102 (D18S552) 18p, 129F16/SP6 19p, 20p18 (D20S1157) 20p, DXYS129, DXYS153 Xp/Yp, VIJ2yRM2123 1QTEL10 (D1S3738, 9043912) 1q, VIJ2yRM2112 (D2S447) 2QTEL47 2q, 3QTEL05 (D3S4560) 3q, AFM A224XH1 (D4S2930) 4q, GS35o8/T7 5QTEL702 (D5S2907) 5q, VIJ2yRM2158 6q, VIJ2yRM2185 (STS 2000H, G31341) 7q, VIJ2yRM2053 8q, VIJ2yRM2241 (D9S325) 9q, 10QTEL24 (D10S2490, 6244631) 10q, D11S1037 11q, VIJ2yRM2196 12q, VIJ2yRM2002 (D13S327) 13q, D14S1420 14q, WI-5214 (D15S396) (G04801) 15q, 16q013 (Z96319) 16q, D17S928 Z23646 17q, VIJ2yRM2050 18QTEL11 STSG193 AFM254VD5 CU18-010L/CU18-010R STS-F04195 TIGR-A008P37 STSG52963 18q, D19S238E 19q, 20QTEL14 20q, VIJ2yRM2029 21q, MS607 (X58044) ACR 22q y EST Cdy 16c07 para SYBL1, mapas dentro del cósmido C8.2 (Z43206) Xq/Yq.

Las sondas a modo de ejemplo que pueden usarse en las composiciones y los métodos de la invención también incluyen, por ejemplo, sondas que se unen dentro de la región EN del gen POL de los subtipos de VIH A, B, C, D, AE, F, AG, G y O; sondas que se unen dentro del gen PR y la región RT del gen POL de VIH-1; y sondas para detectar el plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*; sondas para detectar el gen Opa de *Neisseria gonorrhoeae*; sondas que se unen a los subtelómeros p y q de los cromosomas 1-12 y 16-20, subtelómeros q de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22, y subtelómeros de región pseudoautosómica Xp/Yp y Xq/Yq; sondas que se unen en los exones 2 ó 3 de HLA-A; sondas que se unen en los exones 2 ó 3 de HLA-B; sondas que se unen en los exones 2 ó 3 de HLA-C; sondas que se unen en el exón 2 de HLA-DRB1; sondas que se unen en el exón 2 de HLA-DPB1; y sondas que se unen en el exón 2 de HLA-DQB 1.

B. Composiciones acuosas

(1) Selección de disolventes

Pueden seleccionarse disolventes apróticos polares para su uso en la invención basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen y se seleccionan del grupo que consiste en



Se conocen en la técnica métodos para determinar experimentalmente y/o calcular HSP para un disolvente, y se han notificado HSP para más de 1200 productos químicos.

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

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

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

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

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

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

5 Ecuación 3: $\text{RED} = R_a/R_o$

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

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

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

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

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

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

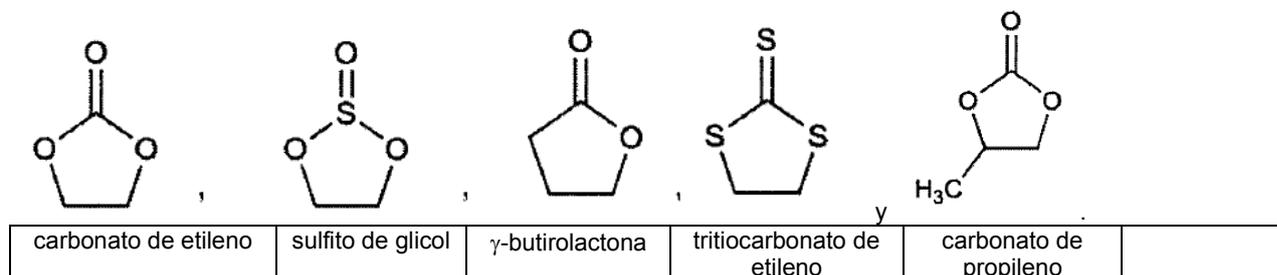


Tabla 1

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

n/a = no disponible.

Además, también pueden utilizarse pirrolidinonas sustituidas y estructuras relacionadas con nitrógeno en un anillo de 5 ó 6 miembros, y estructuras cíclicas con dos grupos nitrilo, o un grupo bromo y uno nitrilo. Otros disolventes apróticos polares adecuados pueden contener un grupo uretano (NHCOO-) de anillo. Sin embargo, no todos de tales compuestos son adecuados, puesto que la 1,3-dimetil-2-imidazolidinona no produce señales cuando se usa en las composiciones de hibridación de la invención. Un experto en la técnica puede examinar compuestos útiles en las composiciones y los métodos de la invención tal como se describe en el presente documento. En las tablas 2 y 3 a continuación se exponen productos químicos a modo de ejemplo que pueden ser adecuados.

Tabla 2

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

1,1,2-Tricloropropeno	17,7	15,7	3,4
1,2,3-Tricloropropeno	17,8	15,7	3,4

5 La tabla 2 expone una lista a modo de ejemplo de posibles productos químicos para su uso en las composiciones y los métodos de la invención basándose en sus parámetros de solubilidad de Hansen. Otros compuestos, naturalmente, también pueden satisfacer estos requisitos. Algunos de estos productos químicos se han usado en disoluciones en hibridación y/o PCR en la técnica anterior (por ejemplo, se ha usado dimetilsulfóxido (DMSO) en disoluciones de hibridación y PCR, y se ha usado sulfolano (SL) en disoluciones de PCR), pero la mayor parte no. Sin embargo, la técnica anterior no reconocía que estos compuestos puedan usarse ventajosamente para disminuir los tiempos y/o las temperaturas de hibridación, tal como se dan a conocer en esta solicitud.

Tabla 3

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

10 No todos los productos químicos enumerados en las tablas 2 y 3 son adecuados para su uso en las composiciones y los métodos de la invención. Por ejemplo, aunque se enumera el DMSO en la tabla 2 debido a que sus parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) se encuentran dentro de los intervalos citados anteriormente, el DMSO no funciona disminuyendo los tiempos y/o las temperaturas de hibridación en las composiciones y los métodos de la invención. Por tanto, en algunas realizaciones, la composición acuosa no contiene DMSO como disolvente aprótico polar. Sin embargo, está muy dentro de los conocimientos del experto habitual examinar compuestos adecuados usando la orientación proporcionada en el presente documento incluyendo someter a prueba un compuesto en uno de los ejemplos proporcionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los disolventes apróticos polares adecuados tendrán HSP dentro de los intervalos citados anteriormente y una estructura mostrada en las fórmulas 1-9 anteriores.

(2) Composiciones, tampones y disoluciones

(a) Disoluciones de hibridación

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

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

25 Los agentes acelerantes pueden incluir polímeros tales como FICOLL, PVP, heparina, sulfato de dextrano, proteínas tales como BSA, glicoles tales como etilenglicol, glicerol, 1,3-propanodiol, glicerol, propilenglicol o dietilenglicol, combinaciones de los mismos tales como disolución de Dernhardt y BLOTTO, y disolventes orgánicos tales como formamida, dimetilformamida, DMSO, etc. El agente acelerante puede estar presente a concentraciones de desde el

1% hasta el 80% o de 0,1x a 10x. Normalmente, está presente formamida a concentraciones de desde el 25% hasta el 75%, mientras que están presentes DMSO, sulfato de dextrano y glicol a concentraciones de desde el 5% hasta el 10%.

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

Las sales pueden incluir cloruro de sodio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, etc. Las sales pueden estar presentes a concentraciones de desde 1 mM hasta 750 mM. Normalmente, las sales están presentes a concentraciones de desde 10 mM hasta 500 mM.

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

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

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

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

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

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

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

50 Las composiciones de la invención pueden comprender agentes que reducen la unión no específica a, por ejemplo, la membrana celular, tales como esperma de salmón o pequeñas cantidades de ADN humano total o, por ejemplo, pueden comprender agentes de bloqueo para bloquear la unión de, por ejemplo, secuencias repetidas con la diana tales como mayores cantidades de ADN humano total o ADN repetido enriquecido o agentes de bloqueo específicos tales como fragmentos y secuencias de PNA o LNA. Estos agentes pueden estar presentes a concentraciones de desde 0,01-100 µg/µl o 0,01-100 µM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, estos agentes serán ADN humano total 0,1 µg/µl, o ADN no humano 0,1 µg/µl, tal como ADN de esperma de arenque, esperma de salmón o timo de ternero, o PNA de bloqueo 5 µM.

55 Un aspecto de la invención es una composición o disolución para su uso en hibridación. Las composiciones dadas a conocer para su uso en la invención incluyen una composición acuosa que comprende una secuencia de ácido

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

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

Cuando están presentes una o más sondas de ácido nucleico en las composiciones de la invención, las sondas pueden marcarse directa o indirectamente con compuestos detectables (tales como, por ejemplo, enzimas, cromóforos, fluorocromos y haptenos), tal como se describió anteriormente. Las sondas de ADN pueden estar presentes a concentraciones de 0,1 a 100 ng/μl. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas pueden estar presentes a concentraciones de 1 a 10 ng/μl. Las sondas de PNA pueden estar presentes a concentraciones de 0,5 a 5000 nM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas pueden estar presentes a concentraciones de 5 a 1000 nM.

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

(b) Disolvente(s) aprótico(s) polar(es)

Diferentes disolventes apróticos polares pueden conferir diferentes propiedades a las composiciones de la invención. Por ejemplo, la elección del disolvente aprótico polar puede contribuir a la estabilidad de la composición, puesto que determinados disolventes apróticos polares pueden degradarse a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el disolvente aprótico polar carbonato de etileno se descompone en etilenglicol, que es una molécula relativamente estable, y dióxido de carbono, que puede interactuar con agua para formar ácido carbónico, alterando la acidez de las composiciones de la invención. Sin limitarse por la teoría, se cree que el cambio en el pH tras la descomposición del carbonato de etileno hace que las composiciones de la invención sean menos eficaces para la hibridación. Sin embargo, puede mejorarse la estabilidad reduciendo el pH de la composición, añadiendo ácido cítrico como tampón a pH 6,2 en lugar del tampón fosfato tradicional, que se usa normalmente a aproximadamente pH 7,4 y/o añadiendo etilenglicol a concentraciones, por ejemplo, de entre el 0,1% y el 10%, o de entre el 0,5% y el 5%, tal como, por ejemplo, el 1%, el 2%, el 3%, etc. Por ejemplo, con tampón citrato 10 mM, las composiciones de la invención son estables a 2-8°C durante aproximadamente 8 meses. También puede mejorarse la estabilidad si las composiciones se almacenan a bajas temperaturas (por ejemplo, -20°C).

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

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

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

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

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

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

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

(c) Optimización para aplicaciones particulares

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

40 Por ejemplo, la concentración de disolvente aprótico polar puede variarse para mejorar la intensidad de señal y la tinción de fondo. Generalmente, a medida que aumenta la concentración de disolvente aprótico polar, disminuye la intensidad de señal y disminuye la tinción de fondo. Por ejemplo, las composiciones que comprenden EC al 15% tienden a mostrar señales más intensas y menos fondo que las composiciones que comprenden EC al 5%. Sin embargo, puede mejorarse la intensidad de señal para composiciones que tienen bajas concentraciones de disolvente aprótico polar (por ejemplo, del 0% al 20%) si se aumentan las concentraciones de sal y/o sulfato de dextrano. Por ejemplo, pueden observarse señales intensas con EC a del 5% al 10% cuando la concentración de sal se eleva aproximadamente de 8 a 16 veces las concentraciones de sal tradicionales (es decir, aproximadamente NaCl 1200 mM, tampón fosfato 20 mM). Asimismo, a medida que se usan menores concentraciones de disolvente aprótico polar, generalmente se requieren mayores concentraciones de sulfato de dextrano para mantener buena intensidad de señal y fondo.

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

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

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

II. Kits

- 15 La presente invención también proporciona kits que comprenden composiciones de la invención. Por tanto, un kit puede comprender una o más sondas moleculares (tal como se desarrolló anteriormente) y una composición acuosa (tal como se desarrolló anteriormente). En una realización, la sonda no se visualiza fácilmente (por ejemplo, porque no está marcada con un fluoróforo o cromóforo), y el kit comprende además un reactivo de visualización, tal como, por ejemplo, un anticuerpo (que puede ser monoclonal, y que puede estar marcado con un marcador detectable), un sustrato enzimático fluorogénico o cromogénico, un conjugado de estreptavidina, o cualquier otro reactivo de visualización adecuado conocido por el experto en la técnica.

- 20 En una realización, el kit comprende además otros reactivos y/o composiciones que pueden usarse para detectar una aberración cromosómica. En una realización, un kit puede comprender además una proteasa, tal como, por ejemplo, pepsina o proteinasa K. En una realización, un kit puede comprender además una o más de una disolución de pretratamiento, proteasa, tampón de lavado de rigurosidad, medio de montaje para fluorescencia, tampón de lavado, disolución de amplificación de señales y sellador de cubreobjetos. Por ejemplo, en una realización, un kit de FISH para citología puede comprender además uno o más de tampón de lavado, tampón de rigurosidad, medio de montaje para fluorescencia y sellador de cubreobjetos. En una realización, un kit de FISH para histología puede comprender además uno o más de disolución de pretratamiento, pepsina, tampón de lavado, tampón de rigurosidad, medio de montaje para fluorescencia y sellador de cubreobjetos. En una realización, un kit de CISH puede comprender además bloqueo de peroxidasa, mezcla de anticuerpos para CISH, un tampón de sustrato rojo, un tampón de sustrato azul, un cromógeno rojo y un cromógeno azul. En otra realización, un kit puede comprender además instrucciones.

III. Aplicaciones, métodos y usos

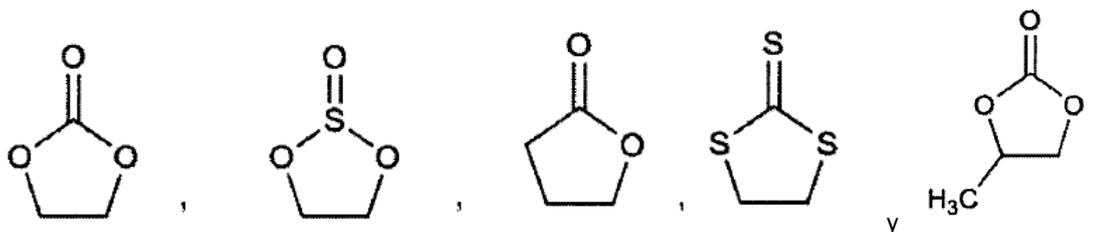
- 35 La invención proporciona además métodos de uso de las composiciones y los kits descritos anteriormente para la detección de aberraciones cromosómicas, el diagnóstico de una enfermedad, la monitorización del progreso del tratamiento terapéutico, la monitorización de un paciente que ha completado el tratamiento para la reaparición de una enfermedad. En general, tales métodos usan una o más de las condiciones de hibridación descritas a continuación.

- 40 Por ejemplo, la invención proporciona un método de detección de una aberración cromosómica usando composiciones de la invención. La detección puede ser relevante para el diagnóstico, la selección de un tratamiento apropiado y/o la monitorización de una paciente para detectar la reaparición de una enfermedad.

Específicamente, la invención proporciona un método de hibridación *in situ* para determinar la presencia de una aberración cromosómica en ADN cromosómico, que comprende:

- proporcionar al menos una sonda molecular que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico asociada con aberraciones cromosómicas,
- 45 - proporcionar ADN cromosómico,
- proporcionar una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación,

donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



donde la disolución de hibridación comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo, y

- 5 con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida,
- combinar la sonda molecular, el ADN cromosómico y la composición de hibridación durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular con la diana, y
 - detectar la al menos una sonda molecular,
 - y determinar la presencia de la aberración cromosómica.
- 10 En una divulgación, la solicitud da a conocer un método de determinación de si está presente una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:
- proporcionar una sonda molecular que detecta la aberración cromosómica,
 - proporcionar la secuencia de ácido nucleico,
 - proporcionar una composición acuosa que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar,
- 15
- combinar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico y la composición acuosa al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y
 - determinar si la sonda molecular se ha hibridado con la secuencia de ácido nucleico,
- determinando de ese modo si está presente la aberración cromosómica en la secuencia de ácido nucleico.
- 20 En otra divulgación, la solicitud da a conocer un método de determinación de si está presente una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:
- proporcionar la secuencia de ácido nucleico,
 - aplicar una composición acuosa que comprende una sonda molecular que detecta la aberración cromosómica y del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar a dicho ácido nucleico al menos durante un periodo
- 25
- de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y
 - determinar si la sonda molecular se ha hibridado con la secuencia de ácido nucleico,
- determinando de ese modo si está presente la aberración cromosómica en la secuencia de ácido nucleico.
- En otra divulgación, la solicitud da a conocer un método de determinación de si está presente una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:
- 30
- proporcionar la secuencia de ácido nucleico,
 - aplicar una composición acuosa de la invención que comprende al menos un disolvente aprótico polar y una sonda molecular que detecta la aberración cromosómica a dicha secuencia de ácido nucleico al menos durante un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y
 - determinar si la sonda molecular se ha hibridado con la secuencia de ácido nucleico,
- 35
- determinando de ese modo si está presente la aberración cromosómica en la secuencia de ácido nucleico.
- La solicitud da a conocer además un método de diagnóstico de un trastorno genético congénito, cáncer o una infección asociados con una aberración cromosómica,
- proporcionar una muestra tisular de un sujeto, donde la muestra tisular comprende una secuencia de ácido

nucleico,

- determinar si está presente una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, según los métodos de la invención, y

5 - diagnosticar el trastorno genético congénito, cáncer o la infección si está presente la aberración cromosómica en la muestra tisular.

En una realización, los métodos de la invención pueden usarse para determinar si un paciente se beneficiaría de un tratamiento particular. Por ejemplo, un paciente con cáncer de mama en el que se amplifica *HER2* puede beneficiarse del tratamiento con Herceptin™ (trastuzumab) y un paciente con cáncer colorrectal en el que se sobreexpresa EGFR puede beneficiarse del tratamiento con Erbitux® (cetuximab) o Vectibix™ (panitumumab).

10 En una realización, los métodos de la invención pueden usarse para monitorizar la progresión o remisión de una enfermedad. En otra realización, los métodos de la invención pueden usarse para evaluar el pronóstico de un paciente. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden usarse, junto con datos clinicopatológicos, para evaluar el pronóstico de un paciente. En una realización, los métodos pueden usarse para determinar la presencia de amplificación génica de *HER2*, y usar esa información para proporcionar un pronóstico para una paciente con cáncer
15 de mama con ganglio positivo, en estadio II. La presencia de deleciones o amplificaciones de *TOP2A* también puede usarse para evaluar el pronóstico de pacientes con cáncer de mama.

A. Muestras analíticas

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

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

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

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

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

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

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

B. Técnicas de hibridación

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

En general, técnicas de hibridación tales como CGH, FISH, CISH y SISH emplean sondas de ácido nucleico grandes, principalmente no especificadas que se hibridan con rigurosidad variable con genes o fragmentos de genes en los cromosomas de las células. Tales sondas pueden derivarse de clones de cósmidos, clones de YAC u otros fragmentos de ADN clonados. El uso de sondas grandes hace que la técnica de hibridación *in situ* sea muy sensible. Sin embargo, el uso satisfactorio de sondas genómicas grandes en ensayos de hibridación tradicionales depende del bloqueo de la tinción de fondo no deseada derivada de, por ejemplo, secuencias repetitivas que están presentes en la totalidad del genoma. Tales etapas de bloqueo requieren mucho tiempo y son caras. Tal como se comenta en el presente documento, los métodos y las composiciones de la invención reducen y/o eliminan ventajosamente la necesidad de tales etapas de bloqueo. Sin embargo, en una realización, pueden suprimirse secuencias repetitivas según los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento PCT/US02/30573.

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

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

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

núcleos en interfase.

Se ha usado FISH satisfactoriamente para mapear secuencias de ADN repetitivas y de una sola copia en cromosomas en metafase, núcleos en interfase, fibras de cromatina y moléculas de ADN desnudo, y para la identificación de cromosomas y el análisis de cariotipo a través de la localización de familias repetidas grandes, normalmente los ADN ribosómicos y familias de alineamientos en tándem principales. Una de las aplicaciones más importantes para FISH ha sido en la detección de secuencias de ADN de una sola copia, en particular genes relacionados con enfermedad en seres humanos y otras especies modelo eucariotas, y la detección de agentes de infección. Puede usarse FISH para detectar, por ejemplo, aneuploidía cromosómica en diagnósticos prenatales, cánceres hematológicos y tumores sólidos; anomalías génicas tales como amplificaciones de oncogenes, deleciones génicas o fusiones génicas; anomalías estructurales cromosómicas tales como translocaciones, duplicaciones, inserciones o inversiones; síndromes de genes contiguos tales como síndrome de microdeleción; los efectos genéticos de diversas terapias; ácidos nucleicos virales en células somáticas y sitios de integración viral en cromosomas; etc.

En FISH multicolor, cada cromosoma se tiñe con un color distinto, permitiendo determinar los cromosomas normales a partir de los que se derivan los cromosomas anómalos. Tales técnicas incluyen FISH múltiplex (m-FISH; Speicher *et al.* Nat. Genet., 12:368-75 (1996)), cariotipado espectral (SKY; Scrock *et al.*, Science, 273:494-97 (1996)), marcaje combinado binario y de razón (COBRA; Tanke *et al.*, Eur. J. Hum. Genet., 7:2-11 (1999)), cariotipado de cambio de color (Henegariu *et al.*, Nat. Genet., 23:263-64 (1999)), bandas de color entre especies (Muller *et al.*, Hum. Genet., 100:271-78 (1997)), bandas multicolor de alta resolución (Chudoba *et al.*, Cytogenet. Cell Genet., 84:156-60 (1999)), FISH múltiplex telomérica (TM-FISH; Henegariu *et al.*, Lab. Invest., 81:483-91 (2001)), FISH de señales separadas (ssFISH) y FISH de señales fusionadas. Pueden usarse CISH y SISH para muchas de las mismas aplicaciones que FISH, y tienen la ventaja adicional de permitir el análisis de la morfología tisular subyacente, por ejemplo en aplicaciones de histopatología.

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

C. Condiciones de hibridación

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

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

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

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando la

- temperatura de desnaturalización es de desde 60 hasta 100°C y la temperatura de hibridación es de desde 20 hasta 60°C. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando la temperatura de desnaturalización es de desde 60 hasta 70°C, de 70 a 80°C, de 80 a 90°C o de 90 a 100°C, y la temperatura de hibridación es de desde 20 hasta 30°C, de 30 a 40°C, de 40 a 50°C o de 50 a 60°C. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando la temperatura de desnaturalización es de 72, 82 ó 92°C, y la temperatura de hibridación es de 40, 45 ó 50°C.
- En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando el tiempo de desnaturalización es de desde 0 hasta 10 minutos y el tiempo de hibridación es de desde 0 minutos hasta 24 horas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando el tiempo de desnaturalización es de desde 0 hasta 5 minutos y el tiempo de hibridación es de desde 0 minutos hasta 8 horas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención producirán señales intensas cuando el tiempo de desnaturalización es de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 minutos, y el tiempo de hibridación es de 0 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 180 minutos o 240 minutos. Los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos, por ejemplo, detección de ARN, no se requiere una etapa de desnaturalización.
- Por consiguiente, las hibridaciones que usan las composiciones de la invención pueden realizarse en menos de 8 horas. En otras realizaciones, la hibridación se realiza en menos de 6 horas. Todavía en otras realizaciones, la hibridación se realiza en el plazo de 4 horas. En otras realizaciones, la hibridación se realiza en el plazo de 3 horas. Aún en otras realizaciones, la hibridación se realiza en el plazo de 2 horas. En otras realizaciones, la hibridación se realiza en el plazo de 1 hora. Todavía en otras realizaciones, la hibridación se realiza en el plazo de 30 minutos. En otras realizaciones, la hibridación puede tener lugar en el plazo de 15 minutos. La hibridación puede tener lugar incluso en el plazo de 10 minutos o en menos de 5 minutos. Las figuras 1 y 2 ilustran un transcurso temporal típico para hibridaciones realizadas con muestras histológicas y citológicas, respectivamente, usando las composiciones de la invención en comparación con hibridaciones usando disoluciones tradicionales.
- A medida que cambia el tiempo de hibridación, la concentración de sonda también puede variarse con el fin de producir señales intensas y/o reducir el fondo. Por ejemplo, a medida que disminuye el tiempo de hibridación, puede aumentarse la cantidad de sonda con el fin de mejorar la intensidad de señal. Por otro lado, a medida que disminuye el tiempo de hibridación, puede disminuirse la cantidad de sonda con el fin de mejorar la tinción de fondo.
- Las composiciones de la invención eliminan sorprendentemente la necesidad de una etapa de bloqueo durante la hibridación mejorando la intensidad de señal y de fondo mediante el bloqueo de la unión de, por ejemplo, secuencias repetitivas con el ADN diana. Por tanto, no hay necesidad de usar ADN humano total, PNA de bloqueo, ADN de COT-1 o ADN de cualquier otra fuente como agente de bloqueo. Sin embargo, los niveles de fondo pueden reducirse adicionalmente añadiendo agentes que reducen la unión no específica, tal como a la membrana celular, tales como pequeñas cantidades de ADN humano total o ADN de origen no humano (por ejemplo, ADN de esperma de salmón) a una reacción de hibridación que usa las composiciones de la invención.
- Las composiciones acuosas de la invención proporcionan además la posibilidad de reducir considerablemente la concentración de secuencias de ácido nucleico incluidas en la composición. Generalmente, la concentración de sondas puede reducirse desde 2 hasta 8 veces en comparación con concentraciones tradicionales. Por ejemplo, si se usan sondas de ADN de HER2 y sondas de PNA de CEN17 en las composiciones de la invención, sus concentraciones pueden reducirse en 1/4 y 1/2, respectivamente, en comparación con sus concentraciones en las disoluciones de hibridación tradicionales. Esta característica, junto con la ausencia de cualquier requisito de ADN de bloqueo, tal como PNA de bloqueo o COT1, permite un aumento del volumen de sonda en sistemas de instrumentos automatizados en comparación con el volumen de 10 µl tradicional usado en sistemas de composiciones tradicionales, lo que reduce la pérdida debida a evaporación, tal como se comenta en más detalle a continuación.
- La reducción de la concentración de sonda también reduce el fondo. Sin embargo, la reducción de la concentración de sonda está inversamente relacionada con el tiempo de hibridación, es decir, cuanto menor es la concentración, mayor tiempo de hibridación se requiere. No obstante, aun cuando se usan concentraciones extremadamente bajas de sonda con las composiciones acuosas de la invención, el tiempo de hibridación es todavía más corto que con disoluciones tradicionales.
- Las composiciones de la invención permiten a menudo mejores relaciones señal-ruido que las disoluciones de hibridación tradicionales. Por ejemplo, con determinadas sondas, una hibridación de una hora con las composiciones de la invención producirá un fondo similar y señales más intensas que una hibridación durante la noche en disoluciones tradicionales. No se observa fondo cuando no se añade sonda.
- Los métodos de ensayo tradicionales también pueden cambiarse y optimizarse cuando se usan las composiciones de la invención dependiendo de si el sistema es manual, semiautomatizado o automatizado. Por ejemplo, un sistema semiautomatizado o automatizado se beneficiará de los tiempos de hibridación cortos obtenidos con las composiciones de la invención. El tiempo de hibridación corto puede reducir las dificultades que se encuentran cuando se usan disoluciones tradicionales en tales sistemas. Por ejemplo, un problema de los sistemas semiautomatizados o automatizados es que puede producirse una evaporación significativa de la muestra durante la hibridación, puesto que tales sistemas requieren volúmenes de muestra pequeños (por ejemplo, 10-150 µl),

temperaturas elevadas y tiempos de hibridación prolongados (por ejemplo, 14 horas). Por tanto, las proporciones de los componentes en las disoluciones de hibridación tradicionales son bastante invariables. Sin embargo, puesto que las composiciones de la invención permiten hibridaciones más rápidas, la evaporación se reduce, permitiendo un aumento de la flexibilidad en las proporciones de los componentes en las composiciones de hibridación usadas en sistemas semiautomatizados y automatizados.

Por ejemplo, se han usado dos instrumentos automatizados para realizar hibridaciones usando las composiciones de la invención. Se han usado composiciones que comprenden carbonato de etileno al 40% en el aparato dado a conocer en la solicitud PCT DK2008/000430, y se han usado composiciones que comprenden carbonato de etileno al 15% en el instrumento HYBRIMASTER HS-300 (Aloka CO. LTD, Japón). Cuando las composiciones de la invención se usan en el instrumento HYBRIMASTER HS-300, el instrumento puede realizar una hibridación FISH rápida con agua en lugar de la mezcla de formamida tóxica tradicional, mejorando por tanto la seguridad y reduciendo la evaporación. Si se unen tiras humedecidas con agua a la tapa de la parte interna de la unidad de reacción del instrumento Aloka (cámara de hibridación) tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0281711, se reduce la evaporación incluso más.

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

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

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

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

Ejemplos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Directrices de puntuación de secciones tisulares

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 1

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

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

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

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 2

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

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

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

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

Resultados:

Tiempo de hibridación	Señal		Tinción de fondo	
	(I) Formamida	(II) EC	Formamida	EC
14 horas	3	3	+0,5	+2
4 horas	1	3	+0,5	+1
2 horas	0,5	3	+0	+1
60 min	0,5	3	+0	+1
30 min	0	2,5	+0	+1
15 min	0	2	+0	+1
0 min	0	1	+0	+0,5

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

Ejemplo 3

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

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

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

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

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

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

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

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 4

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

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

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

Resultados:

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

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

35 Ejemplo 5

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

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

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

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 6

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

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

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 7

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

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

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 8

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

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

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

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

Resultados:

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

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

5 Ejemplo 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resultados:

	Intensidad de la señal	
	Sondas de ADN	Sondas de PNA
Composición Ia	0	0,5
Composición Ib	0	0,5
Composición Ic	0,5	2,5
Composición IIa	0,5	3
Composición IIb	1	2
Composición IIc	0,5	3
Composición IIIa	1	2,5
Composición IIIb	1,5	2,5
Composición IIIc	2	3
Composición IVa	2,5-3	3
Composición IVb	3	3
Composición IVc	3	3
Referencia V	2	2,5

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

Ejemplo 10

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

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

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

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

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

25 Resultados:

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

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

Ejemplo 11

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

Composición de la sonda para FISH: sulfato de dextrano al 10%, NaCl 300 mM, tampón fosfato 5 mM, carbonato de etileno al 40%, sonda de ADN del gen HER2 marcada con Texas Red 8 ng/μl y sonda de PNA de CEN-17 marcada

con FITC 600 nM. Se incubaron las sondas para FISH a 82°C durante 5 min y luego a 45°C durante 60 minutos. Sin bloqueo.

Resultados:

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

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

5 Ejemplo 12

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

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

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

Resultados:

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

Ejemplo 13

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

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

Resultados:

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

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

20

Ejemplo 14

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

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

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

30 Composición de la sonda para FISH III: sonda de ADN de HER2 marcada con Texas Red 2,5 ng/μl (1/4 de la concentración convencional) y 1/2 de la concentración convencional (25 nM) de sondas de PNA de CEN7; EC al 15%;

sulfato de dextrano al 20%; NaCl 600 mM; tampón fosfato 10 mM.

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 15

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

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

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

Resultados:

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

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

20 Ejemplo 16

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

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

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

B) ADN de COT-1 0,1 μg/μl

30 C) ADN humano total (THD) 0,1 μg/μl (THD no marcado sonificado)

D) ADN de esperma de salmón fragmentado 0,1 μg/μl (AM9680, Ambion)

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

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

G) formamida al 0,5%

35 H) formamida al 2%

I) etilenglicol al 1% (1.09621, Merck)

J) glicerol al 1% (1.04095, Merck)

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

L) H₂O al 1% (control)

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

Resultados:

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

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

10 Ejemplo 17

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

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

15

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

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

20 Resultados:

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

Ejemplo 18.

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

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

- 5 sulfolano
- γ -butirolactona
- triticarbonato de etileno
- sulfito de glicol
- carbonato de propileno

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

Ejemplo 19

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

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

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

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

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

Resultados:

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

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

Ejemplo 20

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

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

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

	Intensidad de la señal	

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

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

Ejemplo 21

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

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

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

- 10 Resultados:

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

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

Ejemplo 22

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

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

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

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

Resultados:

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

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

REALIZACIONES Y DIVULGACIONES ADICIONALES SON TAL COMO SIGUE A CONTINUACIÓN (en cada caso designadas simplemente como "realizaciones"):

Realización 1. Una composición de hibridación que comprende:

- 35 (a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica,
- (b) al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra, y
- (c) una disolución de hibridación,

en la que la secuencia de nucleótidos es un marcador para una aberración cromosómica, y en la que el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

5 Realización 2. La composición de hibridación según la realización 1, en la que la aberración cromosómica es aneuploidía, posible punto de rotura, inserción, inversión, delección, duplicación, amplificación génica, redistribución o translocación.

Realización 3. La composición de hibridación según las realizaciones 1-2, en la que la aberración cromosómica está asociada con un trastorno genético congénito, cáncer o infección.

Realización 4. La composición de hibridación según la realización 3, en la que la aberración cromosómica está asociada con cáncer.

10 Realización 5. La composición de hibridación según la realización 4, en la que la primera sonda molecular detecta *ALK*, *BCL2*, *BCL3*, *BCL6*, *BCL10*, *BCL12*, *BCR*, *CCND1*, *E2A*, *EGFR*, *ETV6*, *FIP1L1*, *HER2*, *IGH*, *IGK*, *IGL*, *MALT1*, *MLL* (*ALL-1*, *HTRX1*, *HRX*), *MYC* (*c-Myc*), *PAX5*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *SIL*, *TCF3* (*E2A*, *ITF1*), *TCL1A*, *TCRAD*, *TCRB*, *TCRG*, telómero, *TLX1*, *TLX3* (*HOX11L2*, *RNX*) o *TOP2A*.

15 Realización 6. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que la primera sonda molecular detecta una diana para una enfermedad no hematológica seleccionada del grupo que consiste en: *BASE*, *BRCA1*, *CCND1*, *CCNE1*, *DCD*, *E2F3*, *n-MYC/MYCN*, *COX-2/PTGS2*, *LRIG1*, *ER a*, *hTERT*, *MLN64/STARD3*, *PGR*, *SNAI1*, *SRC*, *TOP1*, *TUBB1*, *AIB1*, *DLC-1*, *EDD*, *Pip4k2b/5k*, *Sil*, *TBX2*, *c-Kit*, *VEGF*, *VCAM-1*, *Tie-1*, *Ts/TYMS*, *PSMA*, *PSA*, *PAP*, *P15*, *P16*, *BCL1*, *BCL2*, *MTOR*, *TIMP1*, *ESR1*, *PTEN*, *MDM2/CDK4*, *MET*, *C-MET*, *ERB1*, *FGFR1*, *IGF1R*, *NET*, *FGFR3*, *ABCB1*, *TMPRSS2*, *BRCA2*, *TOP2B*, *ERCC1*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *HRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *HER3*, *HER4*, *ENT1*, *RRM1*, *RRM2*, *RRM2B*, *PIK3CA*, *AURK4*, *AURKB*, *AURKC*, *MAPT/tau*, *TTBK1*, *TUBB*, *VEGFR*, *CCND3*, *CDK6*, *CDK2*, *CDC2*, *HDAC*, *ESR2*, *SCUBE2*, *BIRC5*, *FASN*, *DHFR*, *TP/ECGF1*, *TYMP*, *DPYD*, *TK1*, *HMGIC*, *ABCA2*, *ABCB11*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCG2*, *MVP*, *ATP7A*, *ATP7B*, *SLC29A1*, *SLC28A1*, *SLC19A1*, *TUBB4*, *TUBA*, *MAP4*, *MAP7*, *STMN1*, *KIF5B*, *HSPA5*, *PSMD14*, *FPGS*, *GSTP1*, *GPX*, *GCLC*, *GGT2*, *MT*, *AKR1B1*, *HMGB1*, *HMGB2*, *XPA*, *XPD*, *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *APEX1*, *MGMT*, *GLO1*, *RB1*, *GML*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*, *ERBB2*, *KRAS2*, *ITGB1*, *JUN*, *FOS*, *NFKB1*, *TP53*, *TP73*, *BCL2L1*, *MCL1*, *BAX*, *BIRC4*, *TNFRSF6*, *CASP3*, *CASP8*, *HSPB1*, *MALAT1*(alfa) t(11;19)(q11;q13.4), *MHLB1* t(11;19)(q11;q13.4), *COL1A1* t(17;22)(q22;q13), *PDGFB* t(17;22)(q22;q13), *FKHR* t(2;13) & t(1;13), *ETV6* t(12;15)(p13;q25), *NTRK3* t(12;15)(p13;q25), *TLS/FUS* t(12;16)(q13;p11), *CHOP* t(12;16)(q13;p11), *EWS* t(12;22)(q13;q12), *EWS/FLI1* t(11;22)(q24;q12) y *FLI1* t(11;22)(q24;q12).

20 Realización 7. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que la primera sonda molecular detecta una diana para una enfermedad hematológica seleccionada del grupo que consiste en: *ABL* t(9;22)(q34;q11), *PRDM16* del(lp36.32), del(21q22.12), *RUNX1/AML1* del(1p36.32), del(21q22.12), *CEP8*, *PDGFRB*, *NUP98*, *FGFR1*, *ASS*, *ETO* t(8;21)(q22;q22), *AML1* t(8;21)(q22;q22), *CBFbeta* inv(16)(p13q22) t(16;16)(p13;q22), *MYH11* inv(16)(p13q22) t(16;16)(p13;q22), *AF9* t(9;11), *PML* t(15;17)(q22;q21), *PLZF* t(11;17)(q23;q21), *NuMA* t(11;17)(q13;q21), *NPM* t(5;17)(q23;q12), *RAR* alfa t(15;17)(q22;q21) t(11;17)(q23;q21) t(11;17)(q13;q21) t(5;17)(q23;q21), *EVI1* t(3;v)(q26;v), *GR6* t(3;3)(q21;q26), *RPN1* t(3;3)(q21;q26), *DEK* t(6;9), *CAN* t(6;9), *MLF1* t(3;5)(...;q23), *FUS* t(16;21), *ERG* t(16;21), *NUP98* t(7;11), *HOX9A* t(7;11), *MOZ/MYST3* t(8;16)(p11;p13), *CBP* t(8;16)(p11;p13), *p300* t(8;22)(p11;q13), *TIF2/GRIP-1/NCoA-2* inv(8)(p11q13), *MKL1*, *PBX1* t(1;19)(q23;p13.3) + var., *ABL* t(9;22)(q34;q11), *AF4/AFF1* t(4;11)(q21;q23), *AML1/RUNX1* t(12;21)(p13;q22), *IL3* t(5;14)(q31;q32), *HLF* t(17;19), *IKZF1* del(7)(p12.2), *CDKN2A/CDKN2B* del(9)(p21.3), aberraciones *TAL1* 1p32, *LMO2* t(11;14)(p13;q11) + var., *LMO1* t(11;14)(p15;q11), *HOX11* t(10;14)(q24;q11) + var., *TAL2* t(7;9)(q34;q32), *TAN1* t(7;9)(q34;q34), *CEP12*, *ATM*, *D13S25*, *D13S319*, *TP53*, *P53*, *TNFAIP3* del(6)(q23.3-q24.1), *CDK6* *BCL1* t(11;14)(q13;q32) + var., *IRF4* t(6;14)(p25;q32), *C-MAF* t(14;16)(q32;q23), *FGFR3* t(4;14)(p16;q32), *MUM2/3* t(1;14)(q21;q32), *NPM* t(2;5)(p23;q35), *ASS*, *RB1* y *ATM*.

35 Realización 8. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que la primera sonda molecular detecta un centrómero seleccionado del grupo que consiste en: *CEP1*, *CEP2*, *CEP3*, *CEP4*, *CEP5*, *CEP6*, *CEP7*, *CEP8*, *CEP9*, *CEP10*, *CEP11*, *CEP12*, *CEP13*, *CEP14*, *CEP15*, *CEP16*, *CEP17*, *CEP18*, *CEP19*, *CEP20*, *CEP21*, *CEP22*, *CEP23*, *CEP X* y *CEP Y*.

40 Realización 9. La composición de hibridación según la realización 4, en la que el cáncer es carcinoma corticosuprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer por quemadura, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de riñón (renal), leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, glioma, cáncer hematológico, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, linfoma, leucemia, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, retinoblastoma, sarcoma, cáncer de piel (distinto de melanoma), cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer uterino.

45 Realización 10. La composición de hibridación según la realización 9, en la que el cáncer es cáncer de mama y la primera sonda molecular detecta *HER2*.

Realización 11. La composición de hibridación según la realización 9, donde el cáncer es cáncer colorrectal y la

primera sonda molecular detecta *EGF2*.

Realización 12. La composición de hibridación según la realización 4, en la que el cáncer es un tumor maligno hematopoyético.

5 Realización 13. La composición de hibridación según la realización 12, en la que la primera sonda molecular detecta una aberración cromosómica elegida de t(1;14) (q34;q11), t(1;19) (q23;p13), t(2;5), t(2;18) (q12;q21), t(2;8), t(4;11), t(4;11) (q21;q23), t(6;11) (q27;q23), t(7;22) (p22;q12), t(8;14), t(8;22), t(9;11) (p22;q23), t(9;22) (q34;q11), t(10;14) (q24;q11), t(11;14), t(11;14) (p13;q11), t(11;19) (q23;p13), t(14;18) (q23;q21), t(14;18), t(18;22) (q21;q11) y t(21;22) (q22;q12).

10 Realización 14. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 13, que comprende además una segunda sonda molecular.

Realización 15. La composición de hibridación según la realización 14, en la que la segunda sonda molecular detecta una secuencia de referencia.

Realización 16. La composición de hibridación según la realización 15, en la que la secuencia de referencia es una secuencia de centrómero.

15 Realización 17. La composición de hibridación según la realización 16, en la que la sonda molecular se define en la realización 8.

Realización 18. La composición de hibridación según la realización 14, en la que la primera sonda molecular y la segunda sonda molecular detectan secuencias flanqueantes o dentro de uno o más posibles puntos de rotura.

20 Realización 19. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 14 a 18, que comprende además una tercera sonda molecular.

Realización 20. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 19, en la que la primera sonda molecular es una sonda de ADN, una sonda de PNA o una sonda de LNA.

Realización 21. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 14 a 20, en la que la segunda sonda molecular es una sonda de ADN, una sonda de PNA o una sonda de LNA.

25 Realización 22. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 19-21, en la que la tercera sonda molecular es una sonda de ADN, una sonda de PNA o una sonda de LNA.

Realización 23. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, en la que la sonda molecular comprende además un marcador.

30 Realización 24. La composición de hibridación según la realización 23, en la que el marcador es un cromóforo, fluoróforo, biotina, DIG, anticuerpo-hapteno, colorante o enzima.

Realización 25. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1 a 24, en la que la concentración de disolvente aprótico polar en la composición de hibridación oscila entre el 1% (v/v) y el 95% (v/v).

Realización 26. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 25, en la que la concentración de disolvente aprótico polar en la composición de hibridación oscila entre el 5% (v/v) y el 10% (v/v).

35 Realización 27. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 25, en la que la concentración de disolvente aprótico polar en la composición de hibridación oscila entre el 10% (v/v) y el 20% (v/v).

Realización 28. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 25, en la que la concentración de disolvente aprótico polar en la composición de hibridación oscila entre el 20% (v/v) y el 30% (v/v).

40 Realización 29. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1 a 28, en la que el disolvente aprótico polar no es tóxico.

Realización 30. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1 a 29, con la condición de que la composición de hibridación no contenga formamida.

Realización 31. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1 a 30, con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

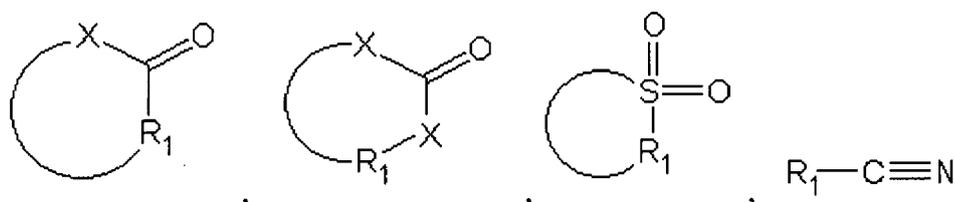
45 Realización 32. La composición de hibridación según cualquiera de las realizaciones 1 a 31, en la que el disolvente aprótico polar tiene funcionalidad lactona, sulfona, sulfito, nitrilo y/o carbonato.

Realización 33. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 32, en la que el disolvente aprótico polar tiene un parámetro de solubilidad en dispersión que oscila entre 17,7 MPa^{1/2} y 22,0 MPa^{1/2},

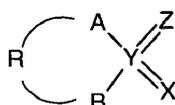
un parámetro de solubilidad en medio polar que oscila entre 13 y 23 MPa^{1/2} y un parámetro de solubilidad por enlaces de hidrógeno que oscila entre 3 y 13 MPa^{1/2}.

Realización 34. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 33, en la que el disolvente aprótico polar tiene una estructura de base cíclica.

- 5 Realización 35. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 34, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



en las que X es O y R1 es alquildiilo, y



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

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

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

en la que R es alquildiilo; y

en la que Y es O o S o C.

- 15 Realización 36. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 35, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en: acetanilida, acetonitrilo, N-acetilpirrolidona, 4-

aminopiridina, benzamida, bencimidazol, 1,2,3-benzotriazol, dióxido de butadieno, carbonato de 2,3-butileno, γ -butirolactona, caprolactona (épsilon), anhídrido cloromaleico, 2-clorociclohexanona, carbonato de cloroetileno, cloronitrometano, anhídrido citracónico, crotonlactona, 5-ciano-2-tiouracilo, ciclopropilnitrilo, sulfato de dimetilo,

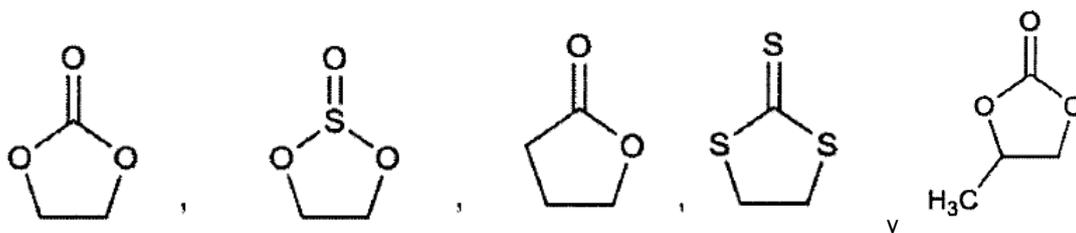
20 dimetilsulfona, 1,3-dimetil-5-tetrazol, 1,5-dimetiltetrazol, 1,2-dinitrobenceno, 2,4-dinitrotolueno, difenilsulfona, 1,2-dinitrobenceno, 2,4-dinitrotolueno, difenilsulfona, épsilon-caprolactama, cloruro de etanosulfonilo, etilfosfinato de etilo, N-etiltetrazol, carbonato de etileno, tritiocarbonato de etileno, sulfato de etilenglicol, sulfito de etilenglicol, furfural, 2-furonitrilo, 2-imidazol, isatina, isoxazol, malononitrilo, 4-metoxibenzonitrilo, 1-metoxi-2-nitrobenceno, alfa-

25 bromotetronato de metilo, 1-metilimidazol, N-metilimidazol, 3-metilisoxazol, N-óxido de N-metilmorfolina, metilfenilsulfona, N-metilpirrolidinona, metilsulfolano, 4-toluenosulfonato de metilo, 3-nitroanilina, nitrobencimidazol, 2-nitrofurano, 1-nitroso-2-pirrolidinona, 2-nitrotiofeno, 2-oxazolidinona, 9,10-fenantrenoquinona, N-fenilsidnona, anhídrido ftálico, picolinonitrilo (2-cianopiridina), 1,3-propanosulfona, β -propiolactona, carbonato de propileno, 4H-

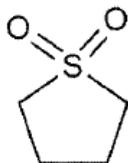
30 piran-4-tiona, 4H-piran-4-ona (γ -pirona), piridazina, 2-pirrolidona, sacarina, succinonitrilo, sulfanilamida, sulfolano, 2,2,6,6-tetraclorociclohexanona, óxido de tetrahidrotiapiirano, tetrametilsulfona (sulfolano), tiazol, 2-tiouracilo,

3,3,3-tricloropropeno, 1,1,2-tricloropropeno, 1,2,3-tricloropropeno, dióxido-sulfuro de trimetileno y sulfito de trimetileno.

Realización 37. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 35, en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



- 35 Realización 38. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 35, en la que el disolvente:



- Realización 39. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 38, que comprende además al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, sales, agentes acelerantes, agentes quelantes, detergentes y agentes de bloqueo.
- 5 Realización 40. La composición de hibridación según la realización 39, en la que el agente acelerante es sulfato de dextrano y las sales son cloruro de sodio y/o fosfato de sodio.
- Realización 41. La composición de hibridación según la realización 40, en la que el sulfato de dextrano está presente a una concentración del 5% al 40%, el cloruro de sodio está presente a una concentración de 0 mM a 1200 mM, y/o el fosfato de sodio está presente a una concentración de 0 mM a 50 mM.
- 10 Realización 42. La composición de hibridación según la realización 41, en la que el sulfato de dextrano está presente a una concentración del 10% al 30%, el cloruro de sodio está presente a una concentración de 300 mM a 1200 mM, y/o el fosfato de sodio está presente a una concentración de 5 mM a 20 mM.
- Realización 43. La composición de hibridación según la realización 39, en la que el agente acelerante se selecciona del grupo que consiste en: formamida, glicerol, propilenglicol, 1,2-propanodiol, dietilenglicol, etilenglicol, glicol y 1,3 propanodiol, y el agente tamponante es tampón de ácido cítrico.
- 15 Realización 44. La composición de hibridación según la realización 43, en la que la formamida está presente a una concentración del 0,1-5%, el glicerol, propilenglicol, 1,2-propanodiol, dietilenglicol, etilenglicol, glicol y 1,3 propanodiol están presentes a una concentración del 0,1% al 10%, y el tampón de ácido cítrico está presente a una concentración de 1 mM a 50 mM.
- 20 Realización 45. La composición de hibridación según la realización 39, en la que el agente de bloqueo se selecciona del grupo que consiste en: ADN humano total, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón y ADN de timo de ternero.
- Realización 46. La composición de hibridación según la realización 45, en la que el ADN humano total, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón y ADN de timo de ternero están presentes a una concentración
- 25 de 0,01 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Realización 47. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, que comprende el 40% de al menos un disolvente aprótico polar, el 10% de sulfato de dextrano, cloruro de sodio 300 mM y fosfato de sodio 5 mM.
- Realización 48. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, que comprende el
- 30 15% de al menos un disolvente aprótico polar, el 20% de sulfato de dextrano, cloruro de sodio 600 mM, fosfato de sodio 10 mM y ADN humano total 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Realización 49. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, que comprende el 15% de al menos un disolvente aprótico polar, el 20% de sulfato de dextrano, cloruro de sodio 600 mM, tampón de ácido cítrico 10 mM pH 6,2 y ADN de esperma de arenque 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, o ADN de esperma de salmón, o ADN de timo
- 35 de ternero, o formamida al 0,5%, o etilenglicol al 1%, o 1,3-propanodiol al 1%, o glicerol al 1%.
- Realización 50. La composición de hibridación según una cualquiera de las realizaciones 1 a 49, en la que la composición acuosa comprende más de una fase a temperatura ambiente.
- Realización 51. Un kit que comprende la composición de una cualquiera de las realizaciones 1 a 41.
- Realización 52. Un kit que comprende:
- 40 (a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica, y
- (b) una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra, donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).
- 45 Realización 53. El kit según cualquiera de las realizaciones 51 y 52, que comprende además un reactivo de visualización.

Realización 54. El kit según cualquiera de las realizaciones 51 y 52, donde el kit está diseñado para su uso en citología.

Realización 55. El kit según cualquiera de las realizaciones 51 y 52, en la que el kit está diseñado para su uso en histología.

- 5 Realización 56. El kit según la realización 52, en la que el disolvente aprótico polar se define según cualquiera de las realizaciones 25-38.

Realización 57. El kit según cualquiera de las realizaciones 51-56, donde el kit está diseñado para su uso en experimentos de FISH o CISH.

Realización 58. Un método de detección de un ADN cromosómico que comprende

- 10 - proporcionar al menos una sonda molecular que se hibrida con la diana en el ADN cromosómico,
- proporcionar ADN cromosómico,
- proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra, donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO),
- 15 - combinar la sonda molecular, el ADN cromosómico y la composición de hibridación durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular con la diana, y
- detectar la diana.

Realización 59. Un método de determinación de la presencia de una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

- 20 - proporcionar al menos una sonda molecular,
- proporcionar la secuencia de ácido nucleico,
- proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra, donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO),
- 25 - combinar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico y la composición de hibridación durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y
- detectar la al menos una sonda molecular,
- y determinar la presencia de la aberración cromosómica.

Realización 60. Un método de determinación de la presencia de una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

- 30 - proporcionar la secuencia de ácido nucleico,
- proporcionar una composición de hibridación que comprende al menos una sonda molecular y al menos un disolvente aprótico polar en una cantidad eficaz para desnaturalizar secuencias de nucleótidos de doble hebra,
- 35 - aplicar la composición de hibridación a dicho ácido nucleico durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y
- detectar la al menos una sonda molecular, y
- determinar la presencia de la aberración cromosómica,
donde el disolvente aprótico polar no es dimetilsulfóxido (DMSO).

Realización 61. El método según cualquiera de las realizaciones 58 a 60, en la que el disolvente aprótico polar se define según una cualquiera de las realizaciones 25-38.

Realización 62. Un método de determinación de la presencia de una aberración cromosómica en una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

- 40 - proporcionar la secuencia de ácido nucleico,
- aplicar una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 50 a dicha secuencia de ácido nucleico

durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico, y

- determinar si la aberración cromosómica está presente en la secuencia de ácido nucleico.

5 Realización 63. El método según cualquiera de las realizaciones 58 a 62, donde se proporciona una cantidad suficiente de energía para hibridar los ácidos nucleicos primero y segundo.

Realización 64. El método según la realización 63, donde la energía se proporciona calentando la composición de hibridación y la secuencia de ácido nucleico.

10 Realización 65. El método según la realización 64, donde la etapa de calentamiento se realiza mediante el uso de microondas, baños calientes, placas calientes, cable de calor, elemento de Peltier, calentamiento por inducción o lámparas de calor.

Realización 66. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 65, donde la secuencia de ácido nucleico es de doble hebra y la sonda molecular es de una sola hebra, la secuencia de ácido nucleico es de doble hebra y la sonda molecular es de doble hebra, la secuencia de ácido nucleico es de una sola hebra y la sonda molecular es de una sola hebra, o la secuencia de ácido nucleico es de una sola hebra y la sonda molecular es de doble hebra.

15 Realización 67. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 66, donde las etapas de desnaturalización e hibridación se producen por separado.

Realización 68. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 67, donde la etapa de hibridación incluye las etapas de calentamiento y enfriamiento de la composición de hibridación, la sonda molecular y la secuencia de ácido nucleico.

20 Realización 69. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 68, donde la etapa de hibridación tarda menos de 8 horas.

Realización 70. El método según la realización 69, donde la etapa de hibridación tarda menos de 1 hora.

Realización 71. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 70, donde la etapa de enfriamiento tarda menos de 1 hora.

25 Realización 72. El método según la realización 71, donde la etapa de enfriamiento tarda menos de 30 minutos.

Realización 73. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 72, donde la secuencia de ácido nucleico está en una muestra biológica.

Realización 74. El método según la realización 73, donde la muestra biológica es una muestra de tejido.

30 Realización 75. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 74, donde la composición acuosa comprende una fase a temperatura ambiente.

Realización 76. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 74, donde la composición acuosa comprende múltiples fases a temperatura ambiente.

Realización 77. El método según la realización 76, donde las capas de la composición acuosa se mezclan.

35 Realización 78. El método según una cualquiera de las realizaciones 58 a 77, que comprende además una etapa de bloqueo.

Realización 79. Un método de diagnóstico de un trastorno genético congénito, cáncer o infección asociado con una aberración cromosómica, comprendiendo el método

- proporcionar una muestra tisular de un sujeto, donde la muestra tisular comprende una secuencia de ácido nucleico,

40 - determinar si está presente una aberración cromosómica en la secuencia de ácido nucleico, según el método de cualquiera de las realizaciones 58 a 78, y

- diagnosticar el trastorno genético congénito, cáncer o infección si la aberración cromosómica está presente en la muestra tisular.

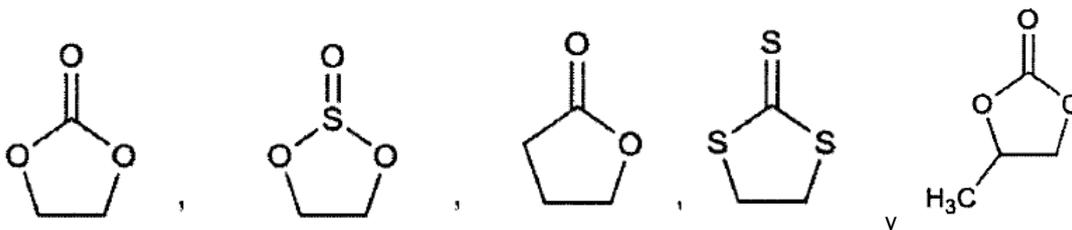
45 Realización 80. Uso de una composición que comprende una sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica y una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar en un ensayo de hibridación para detectar la secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica.

Realización 81. Uso según la realización 80 de una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 50.

REIVINDICACIONES

1. Método de hibridación *in situ* para determinar la presencia de una aberración cromosómica en ADN cromosómico, que comprende:

- 5
- proporcionar al menos una sonda molecular que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico asociada con aberraciones cromosómicas,
 - proporcionar ADN cromosómico,
 - proporcionar una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación,
- en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



donde la disolución de hibridación comprende al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: agentes tamponantes, agentes acelerantes, agentes quelantes, sales, detergentes y agentes de bloqueo, y

con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida,

- 15
- combinar la sonda molecular, el ADN cromosómico y la composición de hibridación durante al menos un periodo de tiempo suficiente para hibridar la sonda molecular con la diana, y
 - detectar la al menos una sonda molecular,
 - y determinar la presencia de la aberración cromosómica.

20 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha composición de hibridación comprende la al menos una sonda molecular.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la etapa de hibridación tarda menos de 8 horas, menos de 1 hora o menos de 30 minutos.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la aberración cromosómica está asociada con el diagnóstico de un trastorno genético congénito, cáncer o infección.

25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ADN cromosómico está en una muestra de tejido.

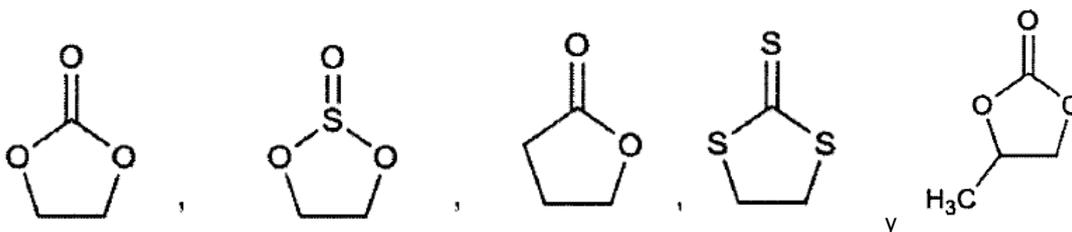
6. Composición de hibridación que comprende:

(a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica,

30 (b) del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y

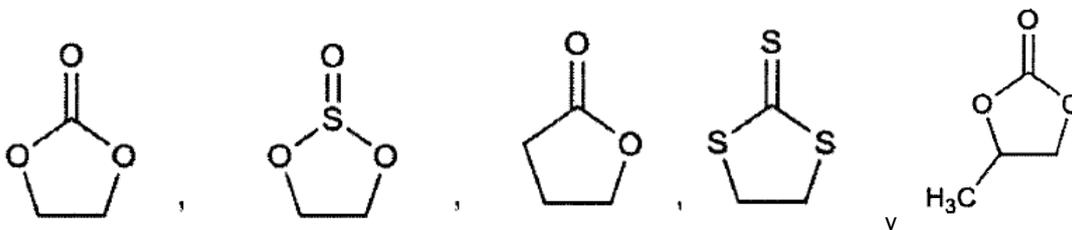
(c) una disolución de hibridación, conteniendo dicha disolución de hibridación un agente acelerante, siendo el agente acelerante sulfato de dextrano,

en la que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



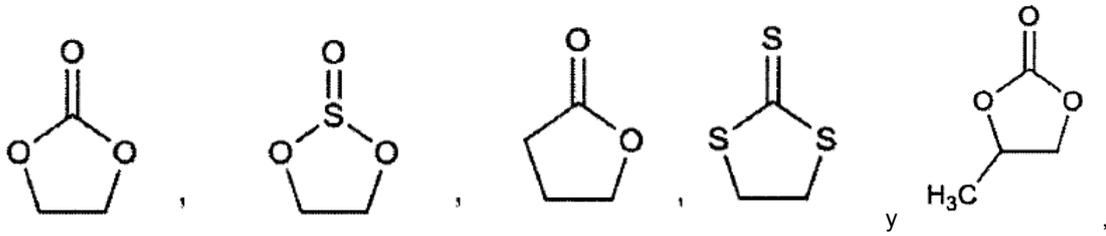
y con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

7. Composición de hibridación según la reivindicación 6, en la que la primera sonda molecular detecta
- 5 *ALK, BCL2, BCL3, BCL6, BCL10, BCL12, BCR, CCND1, E2A, EGFR, ETV6, FIP1L1, HER2, IGH, IGK, IGL, MALT1, MLL (ALL-1, HTRX1, HRX), MYC (c-Myc), PAX5, PDGFRA, PDGFRB, SIL, TCF3 (E2A, ITF1), TCL1A, TCRAD, TCRB, TCRG, telómero, TLX1, TLX3 (HOX11 L2, RNX) o TOP2A.*
8. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que comprende además una segunda sonda molecular, preferiblemente la segunda sonda molecular detecta una secuencia de referencia.
- 10 9. Composición de hibridación según la reivindicación 6-8, en la que la primera sonda molecular y la segunda sonda molecular detectan secuencias flanqueantes o dentro de uno o más posibles puntos de rotura.
10. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que la sonda molecular comprende además un marcador.
- 15 11. Composición de hibridación según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que la concentración de disolvente aprótico polar en la composición de hibridación oscila entre el 1% (v/v) y el 95% (v/v), tal como entre el 20% (v/v) y el 30% (v/v), o entre el 5% (v/v) y el 10% (v/v) o entre el 10% (v/v) y el 20% (v/v).
12. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, que comprende al menos uno de dichos disolventes apróticos polares, sulfato de dextrano y un tampón.
- 20 13. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que la aberración cromosómica es aneuploidía, posible punto de rotura, inserción, inversión, delección, duplicación, amplificación génica, redistribución o translocación.
14. Composición de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 - 13, que comprende el 15% de al menos uno de dichos disolventes apróticos polares, el 20% de sulfato de dextrano, cloruro de sodio 600 mM, fosfato de sodio 10 mM y ADN humano total 0,1 µg/µl.
- 25 15. Uso de una composición que comprende una sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica y una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación, en un ensayo de hibridación para detectar la secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica,
- 30 en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



16. Kit que comprende:
- (a) una primera sonda molecular que detecta una secuencia de nucleótidos asociada con una aberración cromosómica, y
- 35 (b) una composición de hibridación que comprende del 1% (v/v) al 95% (v/v) de al menos un disolvente aprótico polar que tiene una estructura de base cíclica, y una disolución de hibridación, conteniendo dicha

disolución de hibridación un agente acelerante, siendo el agente acelerante sulfato de dextrano, donde el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en:



y con la condición de que la composición de hibridación contenga menos del 10% de formamida.

5

Figura 1

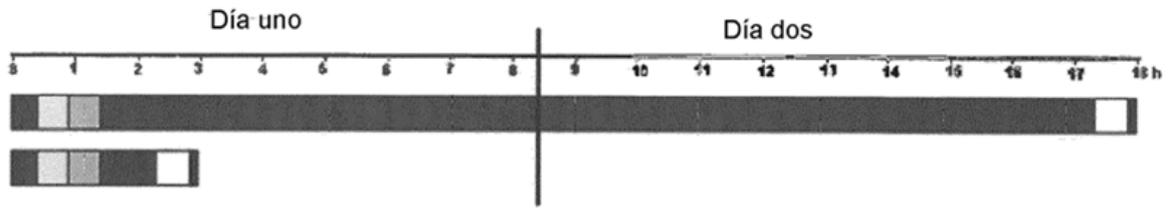


Figura 2

