

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 568**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/053555**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15705997 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3108006**

54 Título: **Sondas de oligonucleótidos monocatenarias para la enumeración de copias de cromosomas o genes**

30 Prioridad:

21.02.2014 US 201461943196 P
19.12.2014 US 201462094543 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FARRELL, MICHAEL;
HUBBARD, ANTONY;
JOHNSON, DONALD;
KELLY, BRIAN D.;
SHINGLER, TAYLOR;
TANG, LEI y
ZHANG, WENJUN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 689 568 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

Sondas de oligonucleótidos monocatenarias para la enumeración de copias de cromosomas o genes

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere a sistemas, kits y procedimientos que usan sondas de oligonucleótidos para la detección de secuencias diana de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN genómico), para la enumeración del número de copias génicas y/o para el diagnóstico de tejidos.

10

Antecedentes

Las sondas se han desarrollado para una variedad de propósitos de diagnóstico e investigación. La hibridación de sondas específicas para cromosomas o genes ha hecho posible la detección de anomalías cromosómicas asociadas con numerosas enfermedades y síndromes, incluyendo anomalías genéticas constitutivas (tal como síndromes por microdelección, translocaciones cromosómicas, amplificación de genes y síndromes de aneuploidia), enfermedades neoplásicas, así como infecciones por patógenos. La detección de cambios genéticos en estas regiones puede proporcionar información diagnóstica y pronóstica para los pacientes y, en algunos casos, fundamentar las decisiones de tratamiento.

15

20

La detección y enumeración dual del cromosoma humano 17 (CHR17) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) es importante para la selección de pacientes apropiados para el tratamiento dirigido contra HER2 en el cáncer de mama (Wolff AC, *et al.*, *J Clin Oncol* 2007, 25:118-145; Gruver AM, *et al.*, *J Clin Pathol* 2010 Mar; 63(3):210-9), pero las sondas existentes que se pueden usar para dicha detección y enumeración dual son conocidas por requerir largos tiempos de ensayo para obtener una detección específica y sensible.

25

Las sondas del centrómero del CHR17 bicatenarias se generan típicamente a partir de la secuencia del plásmido p17H8, que se dirige al satélite alfa de CHR17 humano. El satélite alfa del CHR17 humano contiene una unidad de repetición de orden superior de ~2700 pares de bases que consta de 16 monómeros y está presente en 500 a 1000 copias por CHR17 (Waye JS, *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, Sept. 1986, p. 3156-3165). Las sondas de HER2 bicatenarias se generan típicamente a partir de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y abarcan el gen HER2 (Dal Lago L, *et al.*, *Mol Cancer Ther* 2006, 5:2572-2579; Gruver AM, *et al.*, *J Clin Pathol* 2010 Mar; 63(3):210-9). Estas sondas bicatenarias tienen secuencias repetitivas que son comunes a regiones centroméricas de otros cromosomas humanos. En consecuencia, un inconveniente significativo de estas sondas son los elementos repetitivos generadores de ruido. Es decir, las sondas para las regiones centroméricas tienen típicamente una reactividad cruzada significativa con otros centrómeros cromosómicos. Como tal, se ha requerido que se use ADN bloqueante junto con estas sondas para reducir una unión inespecífica (véase Pinkel y Gray, patente de EE. UU. n.º 5.447.841). Los ensayos que emplean estas sondas requieren un tiempo de hibridación amplio para lograr suficiente hibridación debido a su naturaleza bicatenaria y la competencia requerida con el ADN bloqueante, por ejemplo, aproximadamente 6 a 18 horas. Esta etapa que consume mucho tiempo refleja una baja eficiencia de hibridación, en parte debido a la autohibridación de la sonda bicatenaria y en parte debido a la competencia con el ADN bloqueante. Las colecciones de sondas de BAG también son complicadas de generar y mantener, laboriosas de purificar y propensas a la contaminación. El ensayo de referencia y revolucionario que utiliza esta tecnología fue divulgado por Nitta *et al.* en 2008 y está disponible comercialmente como el cóctel de sondas ADN INFORM HER2 Dual ISH, Ventana Medical Systems, número de catálogo: 780-4422 (Nitta *et al.* *Diagnostic Pathology*, 3:41, 2008).

30

35

40

45

Recientemente, Matthiesen y Hansen (Matthiesen SH, *et al.*, *PLoS One*, 2012; 7(7), 2012) reivindicaron que, sin cambios en la configuración de la sonda de HER2 y CHR17, la sustitución de carbonato de etileno (EC) por formamida en el tampón de hibridación reduce el tiempo de hibridación FISH y no requiere ADN bloqueante. El ensayo HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako) se introdujo en el mercado basándose en esta tecnología. Si bien es una técnica útil, la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) tiene sus inconvenientes. La implementación de FISH convencional requiere un sistema específico de generación de imágenes de fluorescencia y personal bien capacitado con experiencia específica, por lo que este sistema es incompatible con algunos flujos de trabajo clínicos. Además, cuando se compara con las estrategias de hibridación *in situ* (ISH) de campo claro, los estudios de FISH proporcionan una evaluación morfológica relativamente limitada de la histología general, carecen de estabilidad en las señales de detección fluorescente a lo largo del tiempo y tienen un coste general más elevado de análisis.

50

55

En un intento de aliviar los inconvenientes asociados con las sondas basadas en clones, los investigadores han propuesto el uso de "cebadores específicos" para generar sondas a partir de ADN genómico (Navin *et al.*, *Bioinformatics* 22:2437-2438 (2006)). Sin embargo, este proceso es complicado y consume mucho tiempo, ya que requiere múltiples reacciones de amplificación específicas y procesamiento posterior con tiempo de preparación inicial (véase también Yamada *et al.*, *Cytogenet Genome Res.* 1-7 (2010)).

60

65

Para algunas aplicaciones, el uso de sondas monocatenarias tiene una clara ventaja frente al uso de sondas bicatenarias. Por ejemplo, las sondas monocatenarias generalmente tienen mayor sensibilidad que las sondas bicatenarias porque una proporción de la sonda bicatenaria desnaturalizada se renaturaliza para formar homodúplex

de sondas, evitando de este modo su captura de dianas genómicas en las muestras problema (Taneja K *et al.*, *Anal Biochem*, 166, 389-398 (1987), Lewis ME, *et al.*, *Peptides*, 6 Suppl 2:75-87 (1985); Strachan T, Read AP, *Human Molecular Genetics*. 2.^a edición. Nueva York: Wiley-Liss (1999); Kourilsky P, *et al.*, *Biochimie*, 56(9):1215-21 (1974)). Varios laboratorios han informado de que las sondas monocatenarias proporcionan una mayor sensibilidad de hibridación que las sondas bicatenarias (An SF, *et al.*, *Mol Cell Probes*, 6(3):193-200 (1992); Hannon K, *et al.*, *Anal Biochem*, 212(2):421-7 (1993); Cox KH, *et al.*, *Dev Biol.*, 101(2):485-502 (1984)).

Las sondas de oligonucleótidos monocatenarias sintéticas se han usado para detectar dianas genómicas, principalmente para FISH. Por ejemplo, Bergstrom *et al.*, *Designing Custom Oligo FISH Probes for the Detection of Chromosomal Rearrangements in FFPE Tissues*, *American Society of Human Genetics 2013 Meeting (2013)* informaron de sondas SureFISH que comprenden miles de largos oligonucleótidos monocatenarios únicos con marcadores de fluorescencia. Las secuencias de oligonucleótidos se aglutinan a través de la región cromosómica diana de puntos de corte de translocación para la detección de reordenamientos cromosómicos. Aunque Bergstrom divulga sondas monocatenarias, las sondas no se dirigían contra el CHR17 y la referencia de Bergstrom no parece proporcionar ninguna solución a las dificultades asociadas con las sondas del CHR17, tales como especificidad y robustez para detectar polimorfismos del CHR17 en una población humana. Además, la referencia de Bergstrom no divulga ensayos (ni sondas) para la enumeración del número de copias génicas en los que se usen una sonda diana y una sonda de referencia en combinación para calcular una proporción de un gen diana con respecto a un cromosoma de referencia.

El uso de sondas de oligonucleótidos monocatenarias para dianas genómicas ha sido extremadamente limitado. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.445.206 (Bergmann *et al.*, 2012) describe un conjunto de al menos 100 sondas de oligonucleótidos monocatenarias dirigidas contra (o complementarias de) porciones del gen HER2. La divulgación parece estar limitada a la detección de la diana génica HER2 sin una sonda de referencia (por ejemplo, CHR17), que es útil para la evaluación del número de copias génicas, ya que la proporción HER2/CHR17 es importante desde el punto de vista diagnóstico como lo demuestran las enseñanzas de Wolff AC, *et al.*, *J Clin Oncol* 2007, 25:118-145.

Los ensayos de hibridación genómica comparativa (CGH) se pueden usar para proporcionar información sobre el número de copias relativo de una muestra (tal como una muestra tumoral) en comparación con otra muestra (tal como una muestra de referencia, por ejemplo, una muestra de tejido o célula no tumoral). Por lo tanto, la CGH puede usarse para determinar si el número de copias de ADN genómico de un ácido nucleico diana está aumentado o disminuido en comparación con la muestra de referencia. Sin embargo, la CGH no proporciona información sobre el número exacto de copias de un ADN genómico o región cromosómica particular.

Para el marcado genómico del CHR17, se demostró que un oligonucleótido de 42-meros anterior derivado de p17H8 era específico para el CHR17. Sin embargo, debido a diferencias significativas en los tamaños de la sonda del CHR17 de 42-meros y las sondas de HER2 oligoméricas preferentes (que varían de aproximadamente 100 pb a aproximadamente 400 pb) divulgadas en el presente documento, el ensayo dual de HER2-CHR17 por ISH requirió un procedimiento prolongado para detectar secuencialmente señales de HER2 y CHR17 con diferentes temperaturas de lavado rigurosas (72 °C para HER2 y 59 °C para CHR17). Es importante destacar que los experimentos duales por ISH utilizando la sonda del CHR17 de 42-meros y sondas de HER2 monocatenarias de un tamaño similar no resolvieron la incompatibilidad de los conjuntos de sondas (véase la FIG. 14A-D y el ejemplo 2). Además, aun cuando se resolviera la incompatibilidad entre la sonda del CHR17 de 42-meros y las sondas de HER2 monocatenarias, una sonda de un único oligonucleótido (por ejemplo, la sonda del CHR17 de 42-meros) específica para un solo monómero de los 16 monómeros del satélite alfa, según lo enseñado por Nitta, no sería suficiente para detectar el CHR17 en toda la población humana, dado que cada ser humano individual puede portar diferentes combinaciones de los monómeros y sus variantes relacionadas (Waye JS y Willard HF, *NAC* 1986; 14(17); Willard, H.F. *et al.*, 1987, *Genomics*, 1; Warburton, P.E. y Willard, H.F., 1995, *J. Mol. Evol.*, 41). Por lo tanto, la sonda del CHR17 de 42-meros según lo enseñado por Nitta no sería lo suficientemente robusta en toda la población.

A pesar del atractivo del uso de una sonda del CHR17 monocatenaria, los trabajadores en este campo pensaron que no es posible elaborar sondas del CHR17 cortas y monocatenarias que sean lo suficientemente específicas para el CHR17 (por ejemplo, lo suficientemente específicas como para eliminar la necesidad de ADN bloqueante), y lo suficientemente robustas como para detectar suficientemente el CHR17 en toda la población humana. Una de las razones de esta creencia es que se creía que la naturaleza repetitiva fundamental del ADN del satélite alfa hace que la probabilidad de encontrar oligonucleótidos cortos suficientemente específicos para el CHR17 sea increíblemente baja. Por ejemplo, Willard (Willard, H.F., 1985, *Am J Hum Genet*, 37; Willard, H.F., 1991, *Curr Opin Genet Dev*. 1) encontraron secuencias del mismo monómero en diferentes unidades de repetición de orden superior que mostraban un nivel de similitud próximo al 99 %. Además, parece haber un número significativo de resultados fuera de la diana para otros cromosomas. Por ejemplo, la investigación bioinformática reveló que 14 secuencias de oligonucleótidos derivadas del plásmido p17H8 (que comprende las unidades de repetición de orden superior en la región centromérica del CHR17) tenían una alta homología con otros varios cromosomas (por ejemplo, cromosoma 1, X, 11, 9, 20, 22, etc.). Aunque varias secuencias de cada oligonucleótido tenían una alta homología (85-100 %) con el CHR17, también hubo muchos resultados fuera de esta diana. Por ejemplo, un oligonucleótido representativo (M2.1) tenía 21 resultados dentro de la diana, pero también tenía 33 resultados en el cromosoma 1; otro oligonucleótido (M2.2) tenía 18 resultados dentro de la diana pero también tenía 14 resultados en el cromosoma X (véase la FIG. 15). Estos resultados sugieren

que la región centromérica del CHR17 puede no contener secuencias suficientemente específicas para la identificación. De hecho, el examen de la región centromérica desde una perspectiva bioinformática indica que diseñar sondas excepcionalmente específicas para el centrómero, que serían capaces de proporcionar una señal selectiva sin el uso de ADN bloqueante, no es razonable ni se espera que sea posible.

Otra razón por la que los trabajadores en el campo esperaban que no fuera posible elaborar sondas del CHR17 monocatenarias cortas lo suficientemente específicas para el CHR17 (por ejemplo, lo suficientemente específicas como para eliminar la necesidad de ADN bloqueante) es la falta de robustez de una única (o un número reducido de) sonda(s) de oligonucleótidos monocatenaria(s). Como se analizó anteriormente, el satélite alfa específico del CHR17 humano contiene una unidad de repetición de orden superior que consta de 16 monómeros, y cada ser humano individual puede portar diferentes combinaciones de estos monómeros y sus variantes relacionadas (Waye JS y Willard HF, *Molecular and Cellular Biology*, Sept. 1986, p. 3156-3165). Una sonda de un único oligonucleótido, por ejemplo, la 42-mera descrita anteriormente, o incluso un número reducido de oligonucleótidos que cubren un pequeño número de monómeros, puede no ser lo suficientemente robusta para detectar un polimorfismo del CHR17 en una población humana (Waye JS, Willard HF., *NAC* 1986; 14(17); Willard, H.F. *et al.*, 1987, *Genomics*, 1; Warburton, P.E. y Willard, H.F., 1995, *J. Mol. Evol.*, 41). De hecho, una sonda de un único oligonucleótido específica para el CHR17 (79-mera) no mostró una sensibilidad equivalente (o mejor) a la sonda derivada del plásmido p17H8. En particular, cuando el oligonucleótido único 79-mero del CHR17 se comparó con la sonda comercial (sonda p17H8), se encontró que pasaba (intensidad de señal ≥ 2 , cobertura $\geq 50\%$ y fondo < 2) solo un 41,5% (113/272) a 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 h comparado con un 61,1% (148/242) a 0,75 $\mu\text{g/ml}$, 6 h. En consecuencia, el oligonucleótido del Chr17 (un único 79-mero) no pudo mostrar una sensibilidad equivalente al diseño de la sonda comercial.

Otra razón por la que los trabajadores en el campo esperaban que no fuera posible elaborar sondas del CHR17 monocatenarias cortas suficientemente específicas para el CHR17 era que la elaboración de dichas sondas de oligonucleótidos es muy complicada y la capacidad de elaboración de dicho producto hasta ahora no se conoce realmente. En particular, para abarcar una región genómica de 1 millón de pb con sondas que hibriden con al menos 60 kb de la diana, pueden ser necesarias hasta 1200 sondas de oligonucleótidos de 50-meros exclusivas. Elaborar 1200 sondas exclusivas y combinarlas en un único reactivo es difícil, costoso y abre nuevos caminos desde una perspectiva reguladora.

Sumario

Se crearon y sintetizaron un conjunto de 14 sondas monocatenarias exclusivas que son altamente específicas para el CHR17 y que son lo suficientemente robustas como para dar cuenta de los polimorfismos en una población humana. Estas sondas monocatenarias son totalmente compatibles para su uso en la detección de HER2. De hecho, estas sondas de oligonucleótidos recién descubiertas son tan altamente específicas que los inventores fueron capaces de eliminar el uso de ADN bloqueante en los ensayos divulgados en el presente documento. Además, se descubrió sorprendentemente que estas sondas de oligonucleótidos tienen una eficacia de hibridación mejorada, que requiere un tiempo de hibridación significativamente reducido. Estas sondas de oligonucleótidos monocatenarias para el CHR17 también permitieron señales redondeadas enumerables diferenciadas que son superiores a las previamente disponibles. En particular, las señales detectables contrastan con las sondas bicatenarias marcadas por desplazamiento de mella, que tienden a generar señales con una amplia variedad de tamaños y formas.

Las sondas de oligonucleótidos monocatenarias para el CHR17 de la presente invención se pueden usar en combinación con una o más sondas diana dirigidas a un gen diana de interés. Esto permite la enumeración de copias génicas (por ejemplo, determinación de la proporción de un gen diana con respecto a su cromosoma correspondiente), que puede ser importante para el diagnóstico de tejidos. Las alteraciones en el número de copias de ADN son el sello distintivo de muchos tipos de trastornos proliferativos celulares, tal como cáncer. De hecho, algunos investigadores han planteado la hipótesis de que se cree que estas son las que impulsan algunos procesos de patogenicidad del cáncer. Las alteraciones representativas incluyen grandes ganancias y pérdidas cromosómicas, además de amplificaciones y deleciones a menor escala. Teniendo en cuenta que la inestabilidad genómica puede desencadenar la activación de oncogenes y/o el silenciamiento de supresores tumorales, la cartografía de regiones de anomalías genómicas es una herramienta útil para identificar genes relacionados con el cáncer. Dicha información sobre anomalías genómicas puede proporcionar información útil en relación con el diagnóstico del cáncer o como ayuda pronóstica. Como se mencionó anteriormente, HER2 es un gen encontrado en el CHR17; la presente invención también presenta el uso de sondas de oligonucleótidos monocatenarias para detectar (y enumerar el número de copias génicas) el gen HER2 en el CHR17 en combinación con la detección y enumeración del CHR17 usando las sondas de oligonucleótidos monocatenarias mencionadas anteriormente.

En consecuencia, en un modo de realización se proporciona un sistema para la detección *in situ* de una región de control del cromosoma humano 17, comprendiendo dicho sistema un conjunto de dos o más sondas de control monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control del satélite alfa del cromosoma humano 17, en el que $X = 2-14$, las sondas de control están marcadas cada una con al menos un primer marcador, en el que cada sonda de control comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3-16, o una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de SEQ ID NO: 3-16, siendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 3-16; o una secuencia seleccionada del grupo que consiste

en una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 3-16, o los complementos de las mismas.

5 En otro modo de realización se proporciona un kit que comprende un recipiente que contiene el sistema mencionado anteriormente.

En otro modo de realización se proporciona un portaobjetos, comprendiendo el portaobjetos una pluralidad de núcleos teñidos cromogénicamente para el cromosoma 17, en el que el portaobjetos se elabora usando el sistema mencionado anteriormente.

10 En otro modo de realización se proporciona un procedimiento para la hibridación *in situ* de una muestra de tejido, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra de tejido con el sistema mencionado anteriormente.

15 En otro modo de realización se proporciona un procedimiento para la hibridación *in situ* dual de campo claro, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una muestra de tejido con un conjunto de dos o más sondas de control monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control del satélite alfa del cromosoma humano 17, en el que $X = 2-14$, en el que cada sonda de control está marcada con al menos un primer marcador y comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3-16; o una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de SEQ ID NO: 3-16, siendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 3-16; o una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 3-16, o complementos de las mismas; poner en contacto la muestra de tejido con una sonda diana monocatenaria específica para una región diana cerca o alrededor del locus del gen HER2 del cromosoma humano 17, marcándose la sonda diana con al menos un segundo marcador; hibridar las sondas en condiciones durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 20 25 3 horas; enjuagar la muestra para eliminar la sonda no unida; y teñir la muestra para detectar sondas hibridadas.

30 En otro modo de realización se proporciona un procedimiento de puntuación de un cromosoma para el número de copias del gen HER2, comprendiendo dicho procedimiento obtener una muestra de tejido que se ha sometido a hibridación *in situ* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que se usan una sonda de control específica para el cromosoma humano 17 y una sonda diana específica para HER2; identificar un área de núcleos neoplásicos con la mayoría de los números de copias; y contar señales enumerables para la señal de HER2 en al menos 20 núcleos; y calcular la proporción de la señal de HER2 con respecto a la señal del cromosoma 17 (proporción HER2/CHR17).

35 Las características adicionales de la presente divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica tras la consideración de la siguiente descripción detallada de los modos de realización ilustrativos que ejemplifican el mejor modo de llevar a cabo la divulgación tal como se percibe actualmente.

40 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1(A-B) es una secuencia (SEQ ID. NO: 1) que muestra las ubicaciones de los marcadores y la perspectiva estructural de una sonda divulgada que muestra una estrategia de marcado ilustrativo.

45 La FIG. 2(A-C) es una secuencia (SEQ ID. NO: 2) y perspectivas estructurales de una sonda divulgada.

La FIG. 3(A-D) son gráficos (A) y (B) y microfotografías (C) y (D) que muestran la intensidad de la señal de HER2 y la cobertura para las sondas como se divulga en el presente documento en comparación con una sonda comercialmente disponible (HER2PMA marcada).

50 La FIG. 4 (A-B) son microfotografías de tejido de mama teñido.

La FIG. 5 (A-B) son gráficos que muestran la tinción de HER2 para diferentes condiciones de hibridación.

55 La FIG. 6 (A-D) son gráficos y microfotografías que muestran la intensidad de señal del Chr17 y el fondo para oligonucleótidos particularmente sometidos a prueba.

La FIG. 7 (A-D) son gráficos que muestran la intensidad de la señal del Chr17, la cobertura de tinción, el fondo y el pasa/no pasa de una sonda monocatenaria frente a un producto de sonda comercial bicatenaria.

60 La FIG. 8 es una microfotografía de tinción de una placa metafásica cromosómica que muestra especificidad.

La FIG. 9 es una serie de gráficos que muestran el efecto de usar un 48 %, 72 % y 100 % de las 1196 sondas de oligonucleótidos de HER2 sobre la intensidad, la cobertura y el fondo.

65 La FIG. 10 es una serie de gráficos que no muestran una vinculación uniforme entre tiempos de hibridación más largos (por ejemplo, 2 y 6 h) e intensidad de tinción mejorada.

La FIG. 11 (A-B) son microfotografías de un tejido de mama teñido con un ensayo mediante DISH.

La FIG. 12 (A-B) son microfotografías de un tejido pulmonar teñido con un ensayo mediante DISH.

La FIG. 13 (A-B) son microfotografías de un tejido gástrico teñido con un ensayo mediante DISH.

La FIG. 14 (A-D) son gráficos que muestran (A) una señal débil para CHR17 usando la sonda del oligonucleótido de CHR17 de 42-meros, (B) que una sonda de un oligonucleótido de Chr17 de 42-meros tiene una tinción más débil que la sonda de p17H8 en formamida al 33,2 % y que aumentar la concentración y el tiempo de hibridación no aumentó la señal con formamida al 33,2 % (no se realizó un punto temporal de hibridación a las 6 horas, ya que los datos previos no sugirieron diferencia entre 1 y 6 horas de hibridación), (C) que la formamida al 22,8 % dio una mejor señal para el 42-mero, pero aún era más débil que la de PMA, y (D) que la temperatura de lavado rigurosa para el oligonucleótido de CHR17 (42-meros) no es compatible con las sondas de oligonucleótidos de HER2 (68 °C-72 °C).

La FIG. 15 muestra que 14 secuencias de oligonucleótidos que comprenden las unidades de repetición de orden superior en la región centromérica del CHR17 tenían una alta homología con varios otros cromosomas (por ejemplo, el cromosoma 1, X, 11, 9, 20, 22, etc.). Por ejemplo, el oligonucleótido M2.1 tuvo 21 resultados dentro de la diana, pero también tuvo 33 resultados en el cromosoma 1; el oligonucleótido M2.2 tuvo 18 resultados dentro de la diana, pero también tuvo 14 resultados en el cromosoma X.

La FIG. 16 (A-D) muestra ejemplos de círculos concéntricos y curvas cerradas simples utilizadas para evaluar señales enumerables. El esquema ayuda a describir una forma generalmente redonda como se describe en el presente documento.

Secuencias

Las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento se muestran usando abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos. Solamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena presentada. En las secuencias proporcionadas:

las SEQ ID NO: 1-16 son ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos de sondas, por ejemplo, sondas con marcadores, para el cromosoma humano 17.

Descripción detallada

I. Definiciones

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece una invención divulgada. Las formas del singular "un", "uno" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" tiene por objeto incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Que comprende" significa "que incluye". Por lo tanto, "que comprende A o B" significa "que incluye A" o "que incluye B" o "que incluye A y B".

Los procedimientos y materiales adecuados para la práctica y/o análisis de modos de realización de la divulgación se describen a continuación. Dichos materiales y procedimientos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. Se pueden usar otros procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Por ejemplo, los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica a los que se refiere la divulgación se describen en diversas referencias generales y más específicas, que incluyen, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos hasta 2000); Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4.^a ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para la práctica o ensayo de la tecnología divulgada, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Con el fin de facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la divulgación se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Conjugar, unir, enlazar o conectar: conectar covalentemente una molécula con otra molécula para formar una molécula mayor. Por ejemplo, convertir dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua, o unir covalentemente un marcador de masa, hapteno, ácido nucleico u otra molécula a un polipéptido, tal como un anticuerpo scFv.

5 **Poner en contacto** se refiere a la colocación que permite la asociación entre dos o más restos, particularmente la asociación física directa, por ejemplo, tanto en forma sólida como en forma líquida (por ejemplo, la colocación de una muestra biológica, tal como una muestra biológica fijada a un portaobjetos, en contacto con una composición, tal como una solución que contiene las sondas divulgadas en el presente documento).

10 **Detectar:** determinar si un agente (tal como una señal o un antígeno particular) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir adicionalmente la cuantificación y/o localización, por ejemplo, localización dentro de una célula o compartimento celular particular. "Detección" se refiere a cualquier procedimiento para determinar si algo existe o no existe, tal como determinar si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, la "detección" puede incluir el uso de un dispositivo mecánico o visual para determinar si una muestra exhibe una característica específica. En ciertos ejemplos, se usan microscopía de luz y otros medios microscópicos para detectar un marcador detectable unido o proximal a una diana.

Marcador detectable: una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visualmente, electrónicamente o de otro modo) que indica la presencia y/o concentración de una diana, tal como una molécula diana, en una muestra, tal como una muestra de tejido. Cuando se conjuga con una molécula capaz de unirse directamente o proximalmente a una diana, el marcador detectable puede usarse para localizar y/o cuantificar la diana. De ese modo, la presencia y/o concentración de la diana en una muestra puede detectarse detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente, y varios marcadores detectables diferentes conjugados con diferentes moléculas se pueden usar en combinación para detectar una o más dianas. Múltiples marcadores detectables que pueden detectarse por separado se pueden conjugar con diferentes moléculas que se unen directamente o proximalmente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo multiplexado que puede proporcionar la detección de las múltiples dianas en una muestra. Los ejemplos específicos y no limitantes de marcadores incluyen restos fluorescentes y fluorogénicos, restos cromogénicos, haptenos, marcadores de afinidad e isótopos radiactivos. El marcador puede ser directamente detectable (por ejemplo, detectable ópticamente) o indirectamente detectable (por ejemplo, a través de la interacción con una o más moléculas adicionales que a su vez son detectables). Los marcadores ejemplares en el contexto de las sondas divulgadas en el presente documento se describen a continuación. Los procedimientos para el marcado de ácidos nucleicos y las indicaciones para la elección de marcadores útiles para diversos fines se analizan, por ejemplo, en Sambrook y Russell, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) y Ausubel *et al.*, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987, e incluyen actualizaciones).

Hapteno: una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero, típicamente, es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica, excepto en combinación con una molécula transportadora.

HER2: también conocido como homólogo 2 del oncogén vírico de la leucemia eritroblástica aviar v-erb-b2 (ErbB2), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, Her2/neu, c-erb B2/neu y homólogo del oncogén derivado del neuroblastoma/glioblastoma; GenBank, ID del gen, n.º de acceso 2064. Un miembro de la familia de receptores tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico. Her2 se heterodimeriza con otros miembros de la familia de receptores del EGF unidos a ligando, aunque carece de un dominio de unión a ligando y no puede unirse a ligandos. La amplificación y/o sobreexpresión de Her2 ocurren en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y ovario.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de Her2 son de dominio público. Por ejemplo, el gen Her2 está ubicado en el cromosoma 17q12 y su secuencia se divulga como el n.º de acceso de GenBank NC_000017.10 (37844167-37884915). Los n.º de acceso de GenBank NM_001005862, NM_004448, XM_005257139 y XM_005257140 divulgan secuencias de ácidos nucleicos de Her2, y los n.º de acceso de GenBank NP_001005862, NP_004439, XP_005257196 y XP_005257197 divulgan secuencias de proteínas de Her2, según lo dispuesto por GenBank el 4 de octubre de 2013.

Hibridación: formar pares de bases entre regiones complementarias de dos cadenas de ADN, ARN, o entre el ADN y el ARN, formando de este modo una molécula dúplex. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados concretos de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del procedimiento de hibridación y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico que hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (tal como la concentración de Na⁺) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. La presencia de un producto químico que disminuye la hibridación (tal como formamida) en el tampón de hibridación también determinará la rigurosidad (Sadhu *et al.*, *J. Biosci.*, 6:817-821,1984). Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación para la consecución de grados particulares de rigurosidad se analizan en Sam brook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11). Las condiciones de hibridación para ISH también se analizan en Landegent *et al.*, *Hum. Genet.*, 77:366-370, 1987; Lichter *et al.*, *Hum. Genet.*, 80:224-234,1988; y Pinkel *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 85:9138-9142, 1988.

Aislado: un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en una preparación, una célula de un organismo o el propio organismo en el que se produce el componente, tal como otros ARN y ADN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y células. Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que han sido "aisladas" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por procedimientos de purificación estándar. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedadora, así como moléculas de ácido nucleico y proteínas químicamente sintetizadas. En algunos ejemplos, las sondas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento son sondas de ácido nucleico aisladas.

Conector: como se usa en el presente documento, un conector es una molécula o grupo de átomos colocados entre dos restos. Por ejemplo, un conjugado de marcador de masa puede incluir un conector entre el marcador de masa y el resto de unión específica. Típicamente, los conectores son bifuncionales, es decir, el conector incluye un grupo funcional en cada extremo, en el que los grupos funcionales se usan para acoplar el conector a los dos restos. Los dos grupos funcionales pueden ser iguales, es decir, un conector homobifuncional, o diferentes, es decir, un conector heterobifuncional.

Múltiplex, multiplexado, multiplexación: los modos de realización de la presente invención permiten detectar múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea, o secuencial, según se desee, usando múltiples conjugados diferentes. La multiplexación puede incluir la identificación y/o cuantificación de ácidos nucleicos, en general, ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto individualmente como en cualquiera o todas las combinaciones. La multiplexación también puede incluir la detección de dos o más de un gen, un mensajero y una proteína en una célula en su contexto anatómico.

Sonda: una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, molécula de ácido nucleico diana genómica) y, cuando hibrida con la diana, puede detectarse directa o indirectamente. Por lo tanto, las sondas permiten la detección, y en algunos ejemplos la cuantificación, de una molécula de ácido nucleico diana. En ejemplos particulares, una sonda incluye al menos dos segmentos complementarios a secuencias de ácido nucleico excepcionalmente específicas de una molécula de ácido nucleico diana y, por lo tanto, son capaces de hibridar específicamente con al menos una parte de la molécula de ácido nucleico diana. Generalmente, una vez que al menos un segmento o parte de un segmento ha (y permanece) hibridado con la molécula de ácido nucleico diana, otras partes de la sonda pueden (pero no necesitan) estar físicamente limitadas para hibridarse a sitios de unión análogos de esas otras partes en la diana (por ejemplo, dichas otras partes están demasiado lejos de sus sitios de unión análogos); sin embargo, otras moléculas de ácido nucleico presentes en la sonda se pueden unir entre sí, amplificando de este modo la señal de la sonda. Se puede hacer referencia a una sonda como una "sonda de ácido nucleico marcada", que indica que la sonda está acoplada directa o indirectamente a un resto o "marcador" detectable, que hace que la sonda sea detectable.

Muestra: una muestra que contiene ADN (por ejemplo, ADN genómico), ARN (incluido ARNm), proteína o combinaciones de los mismos, obtenida de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, preparaciones cromosómicas, sangre periférica, orina, saliva, biopsia de tejido, aspirado con aguja fina, pieza quirúrgica, médula ósea, muestras de amniocentesis y material de necropsia. En un ejemplo, una muestra incluye ADN genómico. En algunos ejemplos, la muestra es una preparación citogenética, por ejemplo, que se puede colocar en portaobjetos de microscopio. En ejemplos particulares, las muestras se usan directamente, o se pueden manipular antes del uso, por ejemplo, mediante fijación (por ejemplo, usando formol).

Identidad de secuencia: la identidad (o similitud) entre dos o más secuencias de ácido nucleico se expresa en términos de la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia se puede medir en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencia se puede medir en términos de similitud porcentual (que tiene en cuenta las sustituciones conservadoras de aminoácidos); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las secuencias.

Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 16:10881-90, 1988; Huang *et al. Computer Appls. in the Biosciences*, 8:155-65, 1992; y Pearson *et al.*, *Meth. Mol. Bio.*, 24:307-31, 1994. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-10, 1990, presenta una consideración detallada de procedimientos de alineación de secuencias y cálculos de la homología.

La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, incluido el Centro Nacional de Biotecnología y en Internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Se puede encontrar información adicional en el sitio web del NCBI.

BLASTN se puede usar para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se puede usar para comparar secuencias de aminoácidos. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas.

5 La herramienta de alineación similar a BLAST (BLAT) también puede usarse para comparar secuencias de ácidos nucleicos (Kent, Genome Res. 12:656-664, 2002). BLAT está disponible en varias fuentes, incluyendo Kent Informatics (Santa Cruz, CA) y en Internet (genome.ucsc.edu).

10 Una vez alineadas, el número de coincidencias se determina contando el número de posiciones en las que se presenta un residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias. El porcentaje de identidad de secuencia se determina dividiendo el número de coincidencias bien entre la longitud de la secuencia establecida en la secuencia identificada, bien entre una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia establecida en una secuencia identificada), seguido de multiplicar el valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que tiene 1166 coincidencias cuando se alinea con una secuencia problema que tiene 1554 nucleótidos es un 75,0 por ciento idéntica a la secuencia problema ($1166 \div 1554 * 100 = 75,0$). El valor del porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la décima más cercana. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13 y 75,14 se redondean a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18 y 75,19 se redondean a 75,2. El valor de la longitud siempre será un número entero. En otro ejemplo, una secuencia diana que contiene una región de 20 nucleótidos que se alinea con 15 nucleótidos consecutivos de una secuencia identificada de la siguiente manera contiene una región que comparte una identidad de secuencia del 75 por ciento con esa secuencia identificada (es decir, $15 \div 20 * 100 = 75$).

25 **Sujeto:** cualquier organismo vertebrado pluricelular, tal como mamíferos humanos o no humanos (por ejemplo, sujetos veterinarios).

30 **Secuencia o molécula de ácido nucleico diana:** una región definida o una parte particular de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una parte de un genoma (tal como un gen o una región de ADN genómico de mamífero que contiene un gen de interés). En un ejemplo en el que la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica diana, dicha diana puede definirse por su posición en un cromosoma (por ejemplo, en una célula normal), por ejemplo, de acuerdo con la nomenclatura citogenética por referencia a una ubicación particular en un cromosoma; por referencia a su ubicación en un mapa genético; por referencia a un cóntigo hipotético o ensamblado; por su secuencia o función específica; por su nombre de gen o proteína; o por cualquier otro medio que lo identifique de forma exclusiva entre otras secuencias genéticas de un genoma. En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica de mamífero (por ejemplo, secuencia genómica humana).

40 En algunos ejemplos, las alteraciones de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómico) están "asociadas con" una enfermedad o afección. En algunos ejemplos, la detección de la secuencia de ácido nucleico diana se puede usar para inferir el estado de una muestra con respecto a la enfermedad o afección. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana puede existir en dos (o más) formas distinguibles, de modo que una primera forma se correlaciona con la ausencia de una enfermedad o afección y una segunda (o diferente) forma se correlaciona con la presencia de la enfermedad o afección. Las dos formas diferentes pueden ser distinguibles cualitativamente, tal como mediante polimorfismos de polinucleótidos, y/o las dos formas diferentes pueden distinguirse cuantitativamente, tal como mediante el número de copias de la secuencia de ácido nucleico diana que están presentes en una célula.

50 **Secuencia excepcionalmente específica:** una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de al menos 20 pb (tal como al menos 20 pb, 30 pb, 40 pb, 50 pb, 60 pb, 70 pb, 80 pb, 90 pb, 100 pb o más) que está presente solo una vez en un genoma haploide de un organismo. En un ejemplo particular, una secuencia de ácido nucleico excepcionalmente específica es una secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico diana que tiene un 100 % de identidad de secuencia con el ácido nucleico diana y no tiene identidad significativa con ninguna otra secuencia de ácido nucleico presente en el genoma haploide específico que incluye el ácido nucleico diana.

55 **Vector:** cualquier ácido nucleico que actúa como transportador de otras secuencias de ácido nucleico ("ajenas") que no son nativas del vector. Cuando se introduce en una célula huésped apropiada, un vector puede replicarse a sí mismo (y, de este modo, a la secuencia de ácido nucleico ajena) o expresar al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico ajena. En un contexto, un vector es un ácido nucleico lineal o circular en el que se introduce una secuencia de ácido nucleico de interés (por ejemplo, clonada) con fines de replicación (por ejemplo, producción) y/o manipulación usando técnicas de ácido nucleico recombinante estándar (por ejemplo, digestión por restricción). Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores comunes incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales (por ejemplo, BAC, PAC, HAC, YAC) e híbridos que incorporan características de más de uno de estos tipos de vectores. Típicamente, un vector incluye uno o más sitios de restricción únicos (y, en algunos casos, un sitio de clonación múltiple) para facilitar la inserción de una secuencia de ácido nucleico diana.

II Sistemas para hibridación in situ para la enumeración de cromosomas

La presente divulgación describe un ensayo de ISH dual de campo claro automatizado para la detección simultánea de una diana génica (por ejemplo, HER2) y una diana centromérica (por ejemplo, CHR17) usando sondas de oligonucleótidos monocatenarias. Un aspecto de este ensayo es el descubrimiento de sondas particulares que permiten la compatibilidad entre la sonda del centrómero y la sonda del gen. En particular, se descubrió un conjunto de sondas de oligonucleótidos monocatenarias para las dianas centroméricas que son altamente compatibles con un conjunto de sondas de oligonucleótidos monocatenarias para la diana génica. Las secuencias de oligonucleótidos del centrómero se seleccionan para evitar la necesidad de usar ADN bloqueante humano. Las sondas, como se usan en un ensayo de hibridación *in situ* dual (DISH), lograron un rendimiento de tinción similar a los productos comerciales de sondas bicatenarias; sin embargo, las sondas monocatenarias hibridan en 1 hora mientras que las sondas bicatenarias requieren más tiempo (por ejemplo, 6 horas). Los dos tipos de sonda fueron altamente concordantes en el diagnóstico del estado del gen, pero la sonda monocatenaria logró una menor tasa de fallos del ensayo. Cuando se sometió a prueba en muestras con condiciones preanalíticas y calidad del tejido desconocidas, la sonda monocatenaria demostró ser más robusta que los productos de sondas bicatenarias incluso utilizando tiempos de hibridación muy dispares (por ejemplo, 1 hora frente a 6 horas).

La evaluación del número de copias génicas es una aplicación importante de la ISH tanto en citogenética como en laboratorios de anatomía patológica. Por ejemplo, la determinación del estado del gen HER2 requiere el uso de la enumeración del centrómero del cromosoma 17 (CEN 17) para que se pueda calcular la proporción HER2/CEN 17. Sin embargo, para aprovechar las ventajas de la estrategia de las sondas de oligonucleótidos monocatenarias para esta aplicación, hubo que superar varios obstáculos técnicos. En primer lugar, la sonda de oligonucleótidos del CHR17 necesita acomodarse a las condiciones de ensayo para la sonda de oligonucleótidos de HER2; en segundo lugar, la sonda de oligonucleótidos del CHR17 necesita ser lo suficientemente robusta para una sensibilidad adecuada; en tercer lugar, la sonda de oligonucleótidos del CHR17 necesita ser lo suficientemente específica para el centrómero del CHR17 y, por lo tanto, no hay necesidad de los reactivos de hibridación supresores tales como ADN de placenta humano o ADN Cot-1.

Actualmente, todos los ensayos de HER2 por ISH disponibles en el mercado utilizan segmentos marcados de ADN bicatenario obtenidos del cromosoma artificial bacteriano (BAC) como fuente original (véase la Guía de interpretación del kit HER2 FISH PHARMDX para cáncer de mama, kit de sondas PATHVYSION HER2 DNA y Guía de interpretación del ensayo de cóctel de sondas INFORM HER2 Dual ISH DNA de Ventana), los BAC se marcan directamente con moléculas de fluoróforo como sondas (Kit HER2 FISH PHARMDX, Dako y kit de sondas PATHVYSION HER2 DNA, Abbott Molecular, Inc.) o como plantilla para generar secuencias más específicas mediante sustracción física o evitación de secuencias repetitivas (kit SPOT-LIGHT HER2 CISH, Life Technologies, Inc. y ensayo INFORM HER2 Dual ISH, Ventana Medical Systems, Inc.). Es bien sabido que estas sondas bicatenarias requieren un tiempo de hibridación prolongado (es decir, de 6 h a 18 h) para garantizar una hibridación suficiente con las dianas. El tiempo prolongado refleja una baja eficiencia de hibridación. Es importante destacar que tiene un impacto negativo en los pacientes que deben esperar su diagnóstico debido a los tiempos de obtención prolongados asociados con los ensayos por ISH basados en tejidos. Los criterios en la TABLA 1 se usan típicamente para evaluar si un ensayo por DISH particular es aceptable o no aceptable.

TABLA 1. Criterios analíticos de puntuación de portaobjetos.

	Aceptable (A)	No aceptable (N)
Intensidad de señal	<p>3, las señales son claras y se identifican fácilmente en > 80 % de las células dentro de la región diana.</p> <p>2, las señales específicas son suficientemente intensas para identificarse de forma fiable en > 50 % de las células dentro de la región diana.</p>	<p>1, las señales específicas son visibles pero demasiado débiles para identificarse de manera fiable en > 50 % de la región diana.</p> <p>0,5, las señales son visibles pero ausentes o demasiado débiles para identificarse de manera fiable en el 80 % de las células.</p> <p>0, las señales no son visibles.</p>
Fondo	<p>1, las señales de fondo (señales punteadas o tinción borrosa difusa) están presentes pero son suficientemente débiles en intensidad dentro de los núcleos para permitir la identificación fiable de señales específicas en > 50 % de las células dentro de la región diana.</p> <p>0, no se observa tinción de fondo en > 80 % de las células dentro de la región diana.</p>	<p>3, las señales de fondo (señales punteadas, tinción borrosa difusa) cubren el 75-100 % de las células dentro de la región diana y son suficientemente intensas para oscurecer las señales específicas.</p> <p>2, las señales de fondo (señales punteadas, tinción borrosa difusa) cubren el 50-75 % de las células dentro de la región diana y son suficientemente intensas para oscurecer las señales específicas.</p>

45

Ha habido varias estrategias para mejorar la eficiencia de la hibridación, a fin de disminuir los tiempos totales necesarios para estos ensayos. Una estrategia para acelerar las tasas de la reacción de hibridación fue cambiar la composición del tampón de hibridación. Actualmente, la formamida se usa de forma habitual para reducir el punto de fusión y la temperatura de reasociación de las cadenas de ácido nucleico. El beneficio de reducir la temperatura es preservar mejor la morfología del tejido (véase McConaughy BL, *et al.*, *Biochemistry* 8: 3289-3295 (1969) y Blake RD, Delcourt SG, *Nucleic Acids Res* 24: 2095-2103 (1996)). Sin embargo, se requiere una hibridación prolongada para obtener una intensidad de señal suficiente, ya que la formamida reduce la tasa de hibridación. Recientemente, Matthiesen SH *et al.*, *PLoS One*, 2012; 7(7) informaron del carbonato de etileno (EC) como el sustituto de la formamida en tampones de hibridación con el efecto de reducir el tiempo de hibridación FISH a una hora. Se entiende que esta tecnología es la base del nuevo producto comercial HER2 IQFISH PHARMDX (Dako).

Otra estrategia ha sido cambiar las sondas bicatenarias por monocatenarias. Se entiende que las sondas monocatenarias tienen mayor sensibilidad que las sondas bicatenarias, presumiblemente porque una proporción de la sonda bicatenaria desnaturalizada se renaturaliza para formar homodúplex sonda, impidiendo de este modo su hibridación con dianas genómicas en las muestras problema (véase Taneja K y Singer RH, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 166:389-398 (1987), Lewis ME, *et al.*, *Peptides*, 6 Suppl 2:75-87 (1985) y Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 2.^a edición. Nueva York: Wiley-Liss (1999)).

En Kourilsky P, *et al.*, *Biochimie*, 56 (9): 1215-21 (1974), se descubrió que el porcentaje de nucleótidos monocatenarios (disponibles como sonda) es inversamente proporcional a la cantidad de nucleótido de cadena competitiva en la solución en la etapa de prehibridación. Un modelo matemático desarrollado en este estudio reveló que la competencia homóloga es un poderoso competidor de la hibridación de ADN con la diana. Varios laboratorios han informado de que las sondas monocatenarias proporcionan una mayor sensibilidad en la hibridación que las sondas bicatenarias (véase An SF, *et al.*, *Mol Cell Probes*, Jun;6(3):193-200 (1992), Hannon K, *et al.*, *Anal Biochem.*, Aug 1;212(2):421-7 (1993) y Cox KH, *et al.*, *Dev Biol.* Feb;101 (2):485-502 (1984)). En particular, el trabajo de An *et al.* demostró que las sondas monocatenarias marcadas con digoxigenina (DIG) eran al menos dos veces más sensibles que las sondas bicatenarias marcadas por PCR con DIG del mismo tamaño y 10 veces más sensibles que las sondas bicatenarias marcadas por desplazamiento de mella del mismo tamaño en la hibridación por transferencia puntiforme (*dot-blot*). En la aplicación de la ISH, las sondas monocatenarias eran más sensibles, es decir, detectaban aproximadamente de dos a cuatro veces el número de células infectadas que las sondas bicatenarias del mismo tamaño. Además, daban mucha menos tinción de fondo que la sonda bicatenaria del mismo tamaño en la ISH. Las sondas monocatenarias no necesitaban purificación antes de su uso en la ISH; en cambio, las sondas bicatenarias marcadas por PCR necesitaban purificación; de lo contrario, había una gran cantidad de tinción de fondo inespecífica. Además, Hannon *et al.* demostraron que la sonda de ADN monocatenaria marcada con DIG era aproximadamente un 27 % más intensa (mediante un programa de análisis de imágenes) que la obtenida usando la sonda bicatenaria con DIG. Cox KH *et al.*, *Dev Biol.* Feb; 101 (2): 485-502 (1984) encontraron ocho veces más cantidad de la sonda monocatenaria hibridada con la secuencia diana a saturación aparente, mientras que la reacción de hibridación observada con sondas bicatenarias terminaba a un nivel muy por debajo de la saturación de los sitios diana disponibles. Esto implicaba que la mayor parte de la sonda bicatenaria se eliminaba de la reacción de ISH relativamente temprano. En consonancia con los resultados anteriores, descubrimos que las sondas monocatenarias de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora lograban un rendimiento de tinción comparable al de la sonda bicatenaria con hibridación durante 6 horas. Sorprendentemente, la sonda monocatenaria con hibridación durante 1 hora también demostró una robustez superior en una cohorte de tejidos difíciles (TMA). Nuestros datos están en consonancia con observaciones previas según las cuales las sondas monocatenarias tienden a tener una mayor eficacia de hibridación que las sondas bicatenarias.

Si bien no estamos limitados a una teoría particular, percibimos otra ventaja de las sondas monocatenarias y es que son las que penetran más fácilmente en el tejido. Las sondas bicatenarias generalmente se marcan incorporando dNTP marcados en una reacción enzimática de síntesis de ADN. Las sondas marcadas se dimensionan en fragmentos más pequeños mediante tratamiento con ADNasa o sonicación mecánica. La longitud óptima de las sondas de ISH marcadas se entiende típicamente que está entre 100 y 400 nucleótidos de acuerdo con Cox, *et al.*, *Dev Biol.* Feb;101(2):485-502 (1984) y Haase *et al.* (véase Haase, A. *et al.*, en *Methods in Virology* (Maramorosch, K., y Koprowski, Eds.), Vol. 7, pp. 189-226, Academic Press, San Diego, CA (1984)). Sin embargo, se entiende que la naturaleza "aleatoria" del proceso de reducción de tamaño para las sondas marcadas da como resultado que la mayoría de las sondas estén dentro del tamaño correcto, pero produce una amplia población de tamaños. Las sondas monocatenarias generadas por síntesis de oligonucleótidos tienen longitudes cortas bien definidas que facilitan la capacidad de la sonda para penetrar en el tejido mejor que las sondas bicatenarias más largas, especialmente en muestras de tejidos difíciles (por ejemplo, sobrefijadas). Se descubrió que las sondas monocatenarias descritas en el presente documento exhiben una tinción superior en una cohorte de tejidos difíciles (TMA), lo que se puede explicar parcialmente por una mejor penetración en el tejido de las sondas cortas y uniformes.

Además, desde la perspectiva de la fabricación y el control de calidad, una sonda monocatenaria que tiene una estructura exacta se fabrica de forma más reproducible utilizando la síntesis de oligonucleótidos en comparación con las estrategias basadas en PCR, desplazamiento de mella u otras estrategias sintéticas aleatorias.

Las sondas de oligonucleótidos hibridan idealmente al máximo con la diana y mínimamente con no dianas (véase Li X, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, Oct 24; 33(9): 6114-23 (2005)). Si bien puede ser pertinente considerar estas referencias

aplicables a la hibridación basada en soluciones o matrices, la cinética de hibridación para dianas genómicas en tejidos incluidos en parafina fijados en formol (FFPE) es altamente imprevisible en comparación. Se entiende que esta imprevisibilidad es impartida por la naturaleza altamente compleja y variable de los tejidos humanos, especialmente en comparación con una solución o una matriz. En la aplicación de micromatrices, una sonda de 50-meros que mostraba un 75 % de identidad con no dianas o con tramos de 15, 20 o 35 bases mostró reactividad cruzada en Kane MD, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* Nov 15;28(22):4552-7 (2000). Una sonda de 60-meros con una identidad del 80 % con no dianas mostró reactividad cruzada con una no diana en Hughes TR, *et al.*, *Nat Biotechnol.* Abr;19(4):342-7 (2001). Se mostraron resultados similares con una de 70-meros en Wang X, Seed B., *Bioinformatics*, May 1;19(7):796-802 (2003).

Li X, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, Oct 24; 33(19): 6114-23 (2005) parecen haber propuesto una opción óptima para diseñar oligonucleótidos de 50-meros: identidad de <87 %, tramo continuo de < 17 bases y energía libre de > 29 kcal/mol. Se observó que las sondas de 50-meros y 70-meros tenían una hibridación cruzada mínima con secuencias que tenían menos de un 85 % de identidad con las dianas respectivas, mientras que la intensidad de señal aumentaba sustancialmente para las sondas que tenían más de un 90 % de identidad con las dianas respectivas (véase He Z, *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* Jul;71(7):3753-60 (2005)). He Z, *et al.* sugirieron que una sonda específica de un gen debería tener una identidad de < 85 % con las no dianas en las condiciones examinadas.

Si bien las sondas de oligonucleótidos sintéticas se han utilizado ampliamente para la ISH de ARN mensajero, no se han usado en dianas genómicas hasta hace poco (véase Bergstrom Lucas A, Ruvolo M, Kulkarni V, Chen S, Mullinax B, Venneri J, Barboza J, Happe S, Fulmer-Smentek S, Srinivasan M. Designing Custom Oligonucleotide FISH Probes for the Detection of Chromosomal Rearrangements in FFPE Tissues. *American Society of Human Genetics 2013 Meeting*). Bergstrom *et al.* informaron de sondas SUREFISH con marcadores de fluorescencia que se entiende que incluyen miles de oligonucleótidos exclusivos. Las secuencias de oligonucleótidos se aglutinaron a través de la región cromosómica diana de puntos de corte de translocación para la detección de reordenamientos cromosómicos. Se informó de un corto tiempo de hibridación (75 min) para estas sondas.

La diana más común de la ISH del cromosoma 17 son las regiones centroméricas. Las regiones centroméricas de todos los cromosomas humanos se caracterizan por subconjuntos diferenciados de una familia diversa de ADN repetido en tándem, el satélite alfa. La unidad fundamental del satélite alfa es el monómero divergente de 171 pb, mediante el cual se organizan unidades de repetición específicas de cromosomas de orden superior. El satélite alfa específico del cromosoma humano 17 contiene aproximadamente 1000 unidades de repetición de orden superior polimórficas que varían de 11 a 16 monómeros. La forma predominante de los satélites alfa del cromosoma 17 es una unidad de repetición de ~2700 pares de bases que consta de 16 monómeros, que está presente en 500 a 1000 copias por cromosoma 17. Dado que los grupos de ADN satélite alfa con mayor frecuencia contienen variantes monoméricas que difieren de la secuencia consenso hasta en un 40 % (Rosandić M, Paar V, Glunčić M, Basar I, Pavin N, Croat Med J. 2003 Ago; 44(4):386-406), se incluye habitualmente ADN bloqueante con las sondas para reducir las secuencias contenidas dentro de los loci diana que son comunes a otros cromosomas. Un aspecto de la presente divulgación es el descubrimiento de oligonucleótidos monocatenarios de la unidad de repetición de 2700 pares de bases con un intervalo de temperatura de fusión (Tm) comparable al de una sonda génica monocatenaria de 80-meros. En particular, se descubrió que 14 oligonucleótidos monocatenarios particulares específicos para el centrómero del cromosoma 17 podían permitir de forma robusta un ensayo por DISH de gen/centrómero con las sondas génicas de 80-meros. Las secuencias de los 14 oligonucleótidos son de 10 de los 16 monómeros; por lo tanto, aumentan la probabilidad de reconocer la variación en la secuencia específica de haplotipos en la población.

Si bien los ejemplos en el presente documento describen particularmente un ensayo de ISH basado en oligonucleótidos monocatenarios de CHR17 (o dual de HER2/CHR17), se entiende que los expertos en la técnica podrían aplicar los descubrimientos divulgados en el presente documento a cualquier combinación gen/centrómero de interés.

Las dificultades encontradas con frecuencia en los análisis por IHC e ISH son el resultado de la manera en que los tejidos se conservan típicamente. El pilar del laboratorio de anatomía patología diagnóstica ha sido durante muchas décadas el bloque de tejido incluido en parafina y fijado en formol, seccionado y montado sobre portaobjetos de vidrio. La fijación en dicho conservante provoca la reticulación de macromoléculas, tanto aminoácidos como ácidos nucleicos. Estos componentes reticulados se deben eliminar para permitir el acceso de la sonda al ácido nucleico diana y para permitir que el anticuerpo reconozca el antígeno correspondiente. "Desenmascarar" el antígeno y/o el ácido nucleico se logra típicamente de forma manual con múltiples etapas de pretratamiento, digestión proteolítica y lavado. Antes de la tinción, también se requiere la eliminación completa de la parafina para que no interfiera en la unión del anticuerpo o la sonda. La desparafinación se puede lograr mediante el uso de múltiples (por ejemplo, dos o tres) reactivos de clarificación sucesivos que son disolventes de parafina (por ejemplo, xileno, sustitutos de xileno o tolueno).

En un ejemplo, la preparación incluye la etapa de acondicionamiento celular. El acondicionamiento celular se analiza con mayor detalle en la patente de EE. UU. 6.855.552, Towne, *et al.* "Automated immunohistochemical and *in situ* hybridization assay formulations". En las etapas de acondicionamiento celular ilustrativas se aplica un reactivo acondicionador de células y la muestra se pone en contacto a la temperatura apropiada durante un período de tiempo apropiado para que los antígenos y/o las dianas de ácido nucleico se expresen suficientemente para su detección. Un

aspecto de la presente divulgación es que el instrumento automatizado puede ajustar automáticamente la duración y/o la temperatura del acondicionamiento celular en respuesta a los datos introducidos por el usuario. El acondicionamiento celular puede incluir además la aplicación de un reactivo de proteasa. De forma ilustrativa, un tratamiento con proteasa puede implicar la etapa de poner en contacto una solución de proteasa con una muestra biológica. El tratamiento con proteasa, al igual que el acondicionamiento celular, está destinado a aumentar la expresión de antígenos diana y/o ácidos nucleicos diana.

Los reactivos de acondicionamiento celular ejemplares incluyen, para dianas de ácido nucleico (ISH), una solución que incluye ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El contacto puede hacerse a una temperatura de aproximadamente 95 °C durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 90 minutos. Para dianas de proteína (IHC), una solución de acondicionamiento celular puede ser un tampón de ácido bórico. El contacto puede hacerse a una temperatura de aproximadamente 100 °C durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 90 minutos. Una lista parcial de posibles reactivos aparece en Analytical Morphology, Gu, ed., Eaton Publishing Co. (1997) en las páginas 1-40. Se puede incluir dodecilsulfato de sodio (SDS) y/o etilenglicol en la solución de acondicionamiento. Además, pueden añadirse iones metálicos u otros materiales a estos reactivos para aumentar la efectividad del acondicionamiento celular. Soluciones de acondicionamiento celular ejemplares están disponibles en Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ (Acondicionador celular 1 (CC1) n.º de catálogo: 950-124; Acondicionador celular 2 (CC2) n.º de catálogo: 950-123; SSC (10X) n.º de catálogo: 950-110; Acondicionador celular ULTRA (ULTRA CC1) n.º de catálogo: 950-224; Acondicionador celular ULTRA (ULTRA CC2) n.º de catálogo: 950-223, Proteasa 1 n.º de catálogo: 760-2018; Proteasa 2 n.º de catálogo: 760-2019; Proteasa 3 n.º de catálogo: 760-2020). La aplicación del reactivo de unión inmunohistoquímica o el reactivo de unión de hibridación *in situ* puede ocurrir después de aplicar el reactivo de acondicionamiento celular y antes de aplicar el reactivo cromogénico.

El procedimiento puede incluir aplicar un reactivo de enjuague. Entre las diversas etapas descritas en el presente documento y como parte del sistema descrito en el presente documento, pueden añadirse etapas de enjuague para eliminar los reactivos residuales que no han reaccionado de la etapa anterior. Las etapas de enjuague pueden incluir además incubaciones, que incluyen mantener un reactivo de enjuague en la muestra durante un tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada con o sin mezcla. Las condiciones apropiadas para las etapas de enjuague pueden ser distintas entre las diversas etapas. Reactivos de enjuague ejemplares están disponibles en Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ (Tampón de reacción (10x) n.º de catálogo: 950-300; Special Stains Wash (10x) n.º de catálogo: 860-015).

Los sistemas automatizados ejemplares disponibles a través de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ incluyen el sistema de tinción SYMPHONY®, n.º de catálogo: 900-SYM3, sistemas de preparación automatizada de portaobjetos VENTANA® BenchMark, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS, N750-BMKU-FS, VENTANA, y el teñidor de portaobjetos automatizado VENTANA® BenchMark Special Stains. Estos sistemas emplean un sistema controlado por microprocesador que incluye un carrusel giratorio que soporta portaobjetos colocados radialmente. Un motor de velocidad gradual hace girar el carrusel colocando cada portaobjetos debajo de una de una serie de dispensadores de reactivos colocados encima de los portaobjetos. Los códigos de barras en los portaobjetos y los dispensadores de reactivos permiten el posicionamiento controlado por ordenador de los dispensadores y portaobjetos para que se puedan realizar diferentes tratamientos con reactivos para cada una de las diversas muestras de tejido mediante la programación apropiada del ordenador.

A. Cromosoma 17

Como se analizó previamente, la diana más frecuente para una región de control del cromosoma 17 (CHR17) en la ISH es la región centromérica. Las regiones centroméricas de todos los cromosomas humanos se caracterizan por subconjuntos diferenciados de una familia diversa de ADN repetido en tándem, el satélite alfa. Dado que los grupos de ADN satélite alfa con mayor frecuencia contienen variantes monoméricas que difieren de la secuencia consenso hasta en un 40 %, se incluye habitualmente ADN bloqueante con las sondas para reducir las secuencias contenidas dentro de los loci diana que son comunes a otros cromosomas.

Diseñamos sondas monocatenarias dirigidas a la región de control (región centromérica) del cromosoma 17 que alcanzaron niveles de intensidad de señal y niveles de fondo aceptables en un plazo de 1 hora de hibridación y sin el uso de ADN bloqueante (véase la TABLA 3 del ejemplo 1). Por ejemplo, las sondas se configuran para alcanzar una intensidad de tinción mayor o igual a 2 y una cobertura de tinción mayor o igual a un 50 % de los núcleos. También diseñamos sondas monocatenarias dirigidas a una región diana cerca y dentro del locus del gen HER2 que también alcanzó niveles de intensidad de señal y niveles de fondo aceptables en el plazo de 1 hora de hibridación y sin el uso de ADN bloqueante.

Desde la perspectiva de la fabricación y el control de calidad, una sonda monocatenaria que tiene una estructura exacta se fabrica de forma más reproducible utilizando la síntesis de oligonucleótidos en comparación con las estrategias basadas en PCR, desplazamiento de mella u otras estrategias sintéticas aleatorias. Desde la perspectiva del análisis de costes, las sondas que no requieren ADN bloqueante proporcionan un ensayo menos costoso.

La presente divulgación describe sistemas para ISH que presentan una sonda de control específica para una región de control de un cromosoma, por ejemplo, una diana centromérica de un cromosoma. El cromosoma detectado puede ser el cromosoma 17 o cualquier otro cromosoma apropiado. La sonda de control se configura para lograr una intensidad de tinción mayor o igual a 2 y una cobertura de tinción mayor o igual a un 50 % del número de núcleos en un plazo de 3 horas cuando se aplica a una muestra de control (por ejemplo, como se describió anteriormente, TABLA 1). En algunos ejemplos se logra una cobertura de tinción de ≥ 55 % del número de núcleos en un plazo de 3 horas, por ejemplo, ≥ 60 % del número de núcleos, ≥ 65 % del número de núcleos, ≥ 70 % del número de núcleos, ≥ 75 % del número de núcleos, ≥ 80 % del número de núcleos, ≥ 85 % del número de núcleos, ≥ 90 % del número de núcleos.

En algunos modos de realización, los sistemas para ISH también presentan una sonda diana específica para una región diana (por ejemplo, para detectar un gen diana) en el cromosoma correspondiente.

La sonda de control puede comprender una primera pluralidad (por ejemplo, una pluralidad de una única sonda, una pluralidad de sondas diferentes, tales como un conjunto o grupo de sondas) de sondas de oligonucleótidos monocatenarias. Una o más de la pluralidad de sondas puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3-16 (véase la TABLA 3 a continuación). En algunos ejemplos, una o más de la primera pluralidad de sondas comprende una versión truncada (por ejemplo, al menos 30 pb contiguos, al menos 35 pb contiguos, al menos 40 pb contiguos, al menos 45 pb contiguos, al menos 50 pb contiguos, al menos 55 pb contiguos, al menos 60 pb contiguos, al menos 65 pb contiguos, al menos 70 pb contiguos, al menos 75 pb contiguos, etc.) de una de las secuencias de la TABLA 3 (SEQ ID NO: 3-16). En algunos ejemplos, una o más de la primera pluralidad de sondas comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, al menos un 75 % de identidad de secuencia, al menos un 80 % de identidad de secuencia, al menos un 85 % de identidad de secuencia, al menos un 90 % de identidad de secuencia o al menos un 95 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de la TABLA 3 (SEQ ID NO: 3-16). La primera pluralidad de sondas de oligonucleótidos monocatenarias está configurada para hibridar de manera exclusiva y específica con una parte de la región de control del cromosoma humano 17, para que otros cromosomas o partes de los mismos no se marquen de forma evidente.

Como se usa en el presente documento, la referencia al uso de las SEQ ID NO: 3-16 también puede incluir el uso de secuencias complementarias de las SEQ ID NO: 3-16.

En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 2 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 4 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 6 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 8 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 10 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 12 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 14 y 16 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 2 y 12 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 4 y 12 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 6 y 12 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 8 y 12 partes distintas dentro de la región de control. En algunos ejemplos, las sondas se dirigen contra entre 10 y 12 partes distintas dentro de la región de control.

Sin querer limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que las sondas pueden ser capaces de identificar al menos un 60 % de los polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 70 % de los polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 80 % de los polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 90 % de los polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 95 % de los polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 99 % de los polimorfismos del cromosoma 17, etc. No está claro cuántos monómeros necesitarían sondarse para identificar al menos un 60 % de polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 70 % de polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 80 % de polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 90 % de polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 95 % de polimorfismos del cromosoma 17, al menos un 99 % de polimorfismos del cromosoma 17, etc.

La primera pluralidad de sondas de oligonucleótidos monocatenarias se puede construir en una variedad de longitudes. Por ejemplo, las sondas pueden comprender cada una entre 40 y 100 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una entre 60 y 110 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una entre 40 y 120 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una al menos 40 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una al menos 50 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una al menos 60 nucleótidos. En algunos ejemplos, las sondas comprenden cada una al menos 70 nucleótidos.

La presente invención también presenta portaobjetos con una pluralidad de núcleos teñidos cromogénicamente para el cromosoma 17. El portaobjetos se puede poner en contacto con uno o más de los sistemas anteriores (por ejemplo, sondas). El portaobjetos puede presentar señales enumerables indicativas del número de regiones centroméricas del cromosoma 17 presentes en una célula, por ejemplo, las células deberían exhibir dos copias del centrómero del CHR17 normalmente.

En algunos ejemplos, más de un 50 % de los núcleos tienen señales enumerables para el cromosoma. Una señal enumerable puede ser una forma generalmente redonda. La forma redonda se puede definir como se muestra en la FIG. 16, en la que una forma redonda es una curva cerrada simple que se ajusta dentro de una primera región, la primera región se encuentra sobre y fuera de un círculo interior y sobre y dentro de un círculo exterior concéntrico, el círculo interior tiene un radio interior (R_{in}) y el círculo exterior tiene un radio exterior (R_{out}), en el que la curva de cierre simple tiene un radio R_{simple} , en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{out}$, y en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{out} . Una curva cerrada simple es una curva que no se cruza a sí misma y termina en el mismo punto donde comienza.

En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 40 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 50 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 55 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 60 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 65 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 70 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 75 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 80 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 85 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 90 % del radio exterior.

En algunos ejemplos, más de un 60 % de los núcleos tienen señales enumerables para el cromosoma. En algunos ejemplos, más de un 70 % de los núcleos tienen señales enumerables para el cromosoma. En algunos ejemplos, más de un 80 % de los núcleos tienen señales enumerables para el cromosoma. En algunos ejemplos, más de un 90 % de los núcleos tienen señales enumerables para el cromosoma. Los núcleos pueden no ser enumerables si el proceso de seccionamiento de tejido ha destruido esa parte de la célula, si esa parte de la célula se divide entre dos portaobjetos, o si esa parte de la célula está completamente dentro de un portaobjetos separado. Los núcleos también pueden ser enumerables si la condición del tejido impide la penetración de la sonda al sitio de unión específico (es decir, la célula no es suficientemente accesible para la sonda) o si la región diana del ADN está sustancialmente degradada.

En algunos ejemplos, la suma del área de la superficie cubierta por la señal de tinción se calcula y se le asigna un valor de un 100 %, y al menos un 50 % de la suma del área de la superficie se deriva de señales redondas distintas (o formas redondas).

Una forma redonda se puede definir como se muestra en la FIG. 16, en la que una forma redonda es una curva cerrada simple que se ajusta dentro de una primera región, la primera región se encuentra sobre y fuera de un círculo interior y sobre y dentro de un círculo exterior concéntrico, el círculo interior tiene un radio interior (R_{in}) y el círculo exterior tiene un radio exterior (R_{out}), en el que la curva de cierre simple tiene un radio R_{simple} , en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{out}$, y en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{out} .

En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 50 % del radio exterior. En algunos ejemplos, más de un 60 % de dicha suma del área de la superficie se deriva de señales redondas distintas. En algunos ejemplos, más de un 70 % de dicha suma del área de la superficie se deriva de señales redondas distintas. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 60 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 75 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 90 % del radio exterior.

En algunos ejemplos, el radio exterior está entre aproximadamente 0,25 a 0,675 μm . En algunos ejemplos, el radio exterior está entre aproximadamente 0,2 a 0,75 μm . En algunos ejemplos, el radio exterior está entre aproximadamente 0,15 y 1 μm . En algunos ejemplos, el radio exterior promedio de las señales enumerables está entre aproximadamente 0,2 a 0,75 μm . En algunos ejemplos, el radio exterior promedio de las señales enumerables tiene una desviación estándar de menos de 0,5 μm . En algunos ejemplos, el radio exterior promedio de las señales enumerables tiene una desviación estándar de menos de 0,25 μm .

En algunos ejemplos, las señales redondas enumerables están monodimensionadas. Como se usa en el presente documento, una población de señales redondas "monodimensionadas" tiene los R_{simple} dentro de un 15 % más o menos el uno del otro. En algunos ejemplos, la población de señales redondas "monodimensionadas" tiene los R_{simple} dentro de un 10 % más o menos el uno del otro. En algunos ejemplos, la población de señales redondas "monodimensionadas" tiene los R_{simple} dentro de un 5 % más o menos el uno del otro.

B. Gen diana (HER2)

En algunos modos de realización, los sistemas para ISH también presentan una sonda diana específica para una región diana (por ejemplo, para detectar un gen diana, para la enumeración de copias génicas) en el cromosoma correspondiente.

La región diana puede comprender el locus del gen HER2 (o nucleótidos cercanos). En el presente documento se divulgan sondas dirigidas al gen HER2 humano (véanse los términos para los números de acceso de GenBank). Como se describe a continuación en detalle en el EJEMPLO 1, la sonda diana de HER2 es específica de una región entre los nucleótidos 35 027 979 y 35 355 516 del cromosoma humano 17.

En algunos ejemplos, la sonda diana comprende una segunda pluralidad (por ejemplo, una pluralidad de una única sonda, una pluralidad de sondas diferentes, tales como un conjunto o grupo de sondas) de sondas de oligonucleótidos monocatenarias. La segunda pluralidad de sondas de oligonucleótidos monocatenarias se configura para hibridar de manera exclusiva y específica con una parte de la región diana del cromosoma correspondiente, para que otros genes o cromosomas o partes de los mismos no se marquen de forma evidente.

La presente divulgación también presenta medios para hacer que la región de control del cromosoma 17 sea visible. En algunos ejemplos, los medios para hacer visible la región de control del cromosoma 17 comprenden la etapa de poner en contacto las sondas con un reactivo de detección específico para las sondas. Los reactivos de detección son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el reactivo de detección puede comprender un anticuerpo u otra sonda, que se une a la sonda de control. El reactivo de detección puede comprender una molécula (por ejemplo, enzima, sustrato, marcador) que hace visible el primer marcador de la sonda. El reactivo de detección puede comprender una pluralidad de reactivos efectivos para hacer que la sonda sea visible (por ejemplo, más de un anticuerpo, enzima, sustrato, cromógeno, etc.). En algunos modos de realización, el reactivo de detección emite un color. Reactivos de detección adicionales (marcadores, etiquetas, enzimas, sustratos, cromógenos, anticuerpos, etc.) se divulgan además en el presente documento. La presente divulgación también presenta medios para visualizar la región de control del cromosoma 17, en los que la sonda (por ejemplo, primer marcador) se hace visible mediante un reactivo de detección y la visibilidad del primer marcador es indicativa de la región de control del cromosoma 17. Los medios para visualizar sondas marcadas son bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden un microscopio (por ejemplo, un microscopio de campo claro, un microscopio de fluorescencia, un microscopio invertido). En algunos ejemplos, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden un luminómetro. En algunos ejemplos, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden una máquina de detección radiométrica (por ejemplo, contador gamma, etc.). En algunos ejemplos, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden un espectrómetro. En algunos ejemplos, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden una máquina de PCR en tiempo real. En algunos ejemplos, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden un contador de centelleo y/o luminiscencia. En algunos ejemplos, los medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 comprenden un colorímetro. Otros medios para visualizar la región de control del cromosoma 17 son conocidos en la técnica.

C. Kits

También se describen kits que incluyen una o más de las sondas de oligonucleótidos (por ejemplo, una o más de las SEQ ID NO: 3-16). Por ejemplo, los kits pueden incluir al menos una sonda (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sondas) o al menos un conjunto de sondas (tal como al menos 1, 2, 3, 4 o 5 conjuntos de sondas) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el kit comprende sondas tales como al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o todas las de SEQ ID NO: 3-16 (o secuencias al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 % o al menos un 90 % idénticas a las SEQ ID NO: 3-16, o versiones truncadas de las SEQ ID NO: 3-16). En otros ejemplos, las sondas (o el conjunto de sondas) están en un único recipiente.

Los kits también pueden comprender uno o más reactivos para detectar la sonda (por ejemplo, mediante hibridación *in situ*) o para producir una sonda marcada de forma detectable. Por ejemplo, un kit puede incluir al menos una de las sondas de ácido nucleico o conjuntos de sondas divulgados, junto con uno o más tampones, dNTP marcados, una enzima marcadora (tal como una polimerasa), cebadores, agua libre de nucleasas e instrucciones para producir una sonda marcada. En otro ejemplo, el kit incluye una o más de las sondas de ácido nucleico divulgadas (no marcadas o marcadas) junto con tampones y otros reactivos para realizar la hibridación *in situ*. Por ejemplo, si se incluyen una o más sondas no marcadas en el kit, también se pueden incluir reactivos de marcado, junto con agentes de detección específicos (por ejemplo, fluorescente, cromogénico, luminiscente y/o radiométrico) y otros reactivos para realizar un ensayo de hibridación *in situ*, tal como tampón de pretratamiento con parafina, proteasa(s) y tampón de proteasa, tampón de prehibridación, tampón de hibridación, tampón de lavado, contratinción(ones), medio de montaje o combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, dichos componentes del kit están presentes en recipientes separados. El kit puede incluir además opcionalmente portaobjetos de control (tales como controles positivos o negativos) para evaluar la hibridación y la señal de la(s) sonda(s).

En ciertos ejemplos, los kits incluyen avidina, anticuerpos y/o receptores (u otros antiligandos). Opcionalmente, uno o más de los agentes de detección (que incluyen un agente de detección primario y, opcionalmente, reactivos de detección secundarios, terciarios o adicionales) se marcan, por ejemplo, con un hapteno o fluoróforo (tal como un colorante fluorescente o punto cuántico). En algunos casos, los reactivos de detección se marcan con diferentes restos detectables (por ejemplo, diferentes colorantes fluorescentes, puntos cuánticos distinguibles espectralmente, haptenos diferentes, etc.). Por ejemplo, un kit puede incluir dos o más sondas de ácido nucleico o conjuntos de sondas que se corresponden y son capaces de hibridar con diferentes ácidos nucleicos diana (por ejemplo, cualquiera de los ácidos nucleicos diana divulgados en el presente documento). La primera sonda o conjunto de sondas se puede marcar con un primer marcador detectable (por ejemplo, hapteno, fluoróforo, etc.), la segunda sonda o conjunto de sondas se puede marcar con un segundo marcador detectable y cualquier sonda o conjunto de sondas adicional (por ejemplo, tercera, cuarta, quinta, etc.) se puede marcar con marcadores detectables adicionales. La primera, segunda y cualquier sonda o conjuntos de sondas posteriores se pueden marcar con marcadores detectables diferentes, aunque son

posibles otros esquemas de detección. Si la(s) sonda(s) está(n) marcada(s) con marcadores detectables indirectamente, tales como haptenos, los kits pueden incluir agentes de detección (tales como avidina marcada, anticuerpos u otros agentes de unión específica) para algunas o todas las sondas. En un ejemplo, el kit incluye sondas y reactivos de detección adecuados para ISH múltiple.

En un ejemplo, el kit también incluye un conjugado de anticuerpo, tal como un anticuerpo conjugado con un marcador (por ejemplo, una enzima, fluoróforo o nanopartícula fluorescente). En algunos ejemplos, el anticuerpo se conjuga con el marcador a través de un conector, tal como PEG, 6X-His, estreptavidina o GST.

D. Marcadores detectables y procedimientos de marcado

Las sondas divulgadas en el presente documento pueden comprender uno o más marcadores (por ejemplo, al menos 1 al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, etc.), por ejemplo para permitir la detección de la sonda/secuencia de ácido nucleico (o región) de interés. En diversas aplicaciones, tales como procedimientos de hibridación *in situ*, una sonda de ácido nucleico incluye un marcador (por ejemplo, un marcador detectable). Un "marcador detectable" es una molécula o material que se puede usar para producir una señal detectable que indica la presencia o concentración de la sonda (particularmente la sonda unida o hibridada) en una muestra. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico marcada proporciona un indicador de la presencia o cantidad (por ejemplo, número de copias génicas) de un ácido nucleico diana (al que la molécula de ácido nucleico excepcionalmente específica marcada está unida o hibridada) en una muestra. La divulgación no se limita al uso de marcadores particulares, aunque se proporcionan ejemplos.

Un marcador asociado con una o más moléculas de ácido nucleico (tales como las sondas divulgadas) puede detectarse directa o indirectamente. Un marcador puede detectarse mediante cualquier mecanismo conocido o aún por descubrir, incluida la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y fotones de frecuencia ultravioleta). Los marcadores detectables incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra), haptenos que pueden detectarse mediante interacciones de unión a anticuerpos, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos.

Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Numerosos fluorocromos son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden seleccionarse, por ejemplo, de Life Technologies. Se proporcionan ejemplos de fluoróforos particulares que se pueden unir (por ejemplo, conjugar químicamente) a una molécula de ácido nucleico (tal como una región de unión excepcionalmente específica) en la patente de EE. UU. n.º 5.866.366 de Nazarenko *et al.*, tal como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-(3-vinilsulfonyl)fenilnaftalimida-3,5-disulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Brilliant Yellow, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcouluarina (cumarina 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5'-dibromopirgalol-sulfoneftaleína (rojo de bromopirgalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietiltriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonylo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y QFITC (XRITC); 2',7'-difluorofluoresceína (OREGON GREEN®); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de verde malaquita; 4-metilumbeliferona; *orto*-cresolfaleína; nitrotirosina; pararosanilina; rojo de fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil-1-pireno; Reactive Red 4 (Cibacron Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de sulfonylo de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, verde de rodamina, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonylo de sulforrodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametilrodamina; isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC); riboflavina; derivados del ácido rosólico y del quelato de terbio.

Otros fluoróforos adecuados incluyen quelatos de europio reactivos con tiol, que emiten a aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Analyt. Biochem.*, 248:216-27, 1997; *J Biol. Chem.*, 274:3315-22, 1999), así como GFP, Lissamine™, dietilaminocumarina, clorotriazinilo de fluoresceína, naftofluoresceína, 4,7-diclororrodamina y xanteno (como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.800.996 de Lee *et al.*) y derivados de los mismos. También se pueden usar otros fluoróforos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo los disponibles en Life Technologies (Carlsbad, CA) y que incluyen la serie de colorantes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 5.696.157, 6.130.101 y 6.716.979), la serie de colorantes BODIPY (colorantes de difluoruro de boro dipirrometeno, por ejemplo como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 4.774.339, 5.187.288, 5.248.782, 5.274.113, 5.338.854, 5.451.663 y 5.433.896), Cascade Blue (un derivado reactivo de aminas del pireno

sulfonado descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.132.432) y Marina Blue (patente de EE. UU. n.º 5.830.912). Además de los fluorocromos descritos anteriormente, un marcador fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocrystal semiconductor, por ejemplo, un punto cuántico. Marcadores adicionales incluyen, por ejemplo, radioisótopos (tales como ³H), quelatos metálicos tales como quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos como Gd³⁺, y liposomas.

Marcadores detectables que pueden usarse con moléculas de ácido nucleico (tales como las sondas divulgadas) también incluyen enzimas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β-galactosidasa, β-glucuronidasa o β-lactamasa. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se puede usar un cromógeno, compuesto fluorogénico o compuesto luminogénico en combinación con la enzima para generar una señal detectable (numerosos de dichos compuestos están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Life Technologies). Ejemplos particulares de compuestos cromogénicos incluyen diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Fast Red, Fast Blue, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitro azul tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, naranja de AP, azul de AP, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-Gluc), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

De forma alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfica. Por ejemplo, los procedimientos de hibridación *in situ* con plata (SISH) implican esquemas de detección metalográficos para la identificación y localización de una secuencia de ácido nucleico diana genómica hibridada. Los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo para oxidorreducción de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo para oxidorreducción por la enzima, y el agente activo para oxidorreducción reduce el ion metálico, haciendo que forme un precipitado detectable (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.632.652). Los procedimientos de detección metalográfica también incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, de nuevo para formar un precipitado detectable (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.670.113)

En ejemplos no limitantes, las sondas de ácido nucleico divulgadas se marcan con dNTP unidos covalentemente a moléculas de hapteno (tales como un compuesto nitroaromático (por ejemplo, 2,4-dinitrofenilo (DNP), biotina, fluoresceína, digoxigenina (DIG), etc.). Haptenos adicionales adecuados para marcar las sondas divulgadas incluyen haptenos de nitropirazol, 3-hidroxiquinolina, tiazolsulfonamida, ácido nitrocinámico, rotenona, ácido 7-(dietilamino)cumarin-3-carboxílico, benzodiazepina o benzofurano (véase, por ejemplo, la publ. de pat. internacional n.º WO 2012/003476). Los procedimientos para conjugar haptenos y otros marcadores con dNTP (por ejemplo, para facilitar la incorporación en las sondas marcadas) son bien conocidos en la técnica. Para ejemplos de procedimientos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.258.507, 4.772.691, 5.328.824 y 4.711.955. De hecho, numerosos dNTP marcados están disponibles comercialmente, por ejemplo de Life Technologies (Carlsbad, CA). Un marcador se puede unir directa o indirectamente a un dNTP en cualquier ubicación en el dNTP, tal como un fosfato (por ejemplo, fosfato α, β o γ) o un azúcar.

La detección de moléculas de ácido nucleico marcadas se puede llevar a cabo poniendo en contacto las moléculas de ácido nucleico marcadas con hapteno unidas al ácido nucleico diana genómico con un anticuerpo antihapteno primario. En un ejemplo, el anticuerpo antihapteno primario (tal como un anticuerpo murino antihapteno) se marca directamente con una enzima. En otro ejemplo, un anticuerpo secundario contra una especie (como un anticuerpo caprino contra las inmunoglobulinas de ratón) conjugado con una enzima se usa para amplificación de la señal. En la hibridación *in situ* cromogénica CISH, se añade un sustrato cromogénico; para la SISH, se añaden iones de plata y otros reactivos como se describe en las patentes/solicitudes a las que se hace referencia.

En algunos ejemplos, una sonda se marca incorporando uno o más dNTP marcados usando una reacción enzimática (polimerización). Por ejemplo, las sondas de ácido nucleico divulgadas (por ejemplo, incorporadas en un vector plasmídico) pueden marcarse mediante desplazamiento de mella (usando, por ejemplo, biotina, DNP, digoxigenina, etc.) o mediante extensión aleatoria del cebador con transferasa terminal (por ejemplo, elongación del extremo 3'). En algunos ejemplos, la sonda nucleica se marca mediante una reacción de desplazamiento de mella modificada en la que la proporción de ADN polimerasa I con respecto a desoxirribonucleasa I (ADNasa I) se modifica para producir más de un 100 % del material de partida. En ejemplos particulares, la reacción de desplazamiento de mella incluye ADN polimerasa I con ADNasa I en una proporción de al menos aproximadamente 800:1, tal como al menos 2000:1, al menos 4000:1, al menos 8000:1, al menos 10 000:1, al menos 12 000:1, al menos 16 000:1, tal como aproximadamente de 800:1 a 24 000:1, y la reacción se lleva a cabo durante la noche (por ejemplo, durante aproximadamente 16-22 horas) a una temperatura sustancialmente isotérmica, por ejemplo, a aproximadamente de 16 °C a 25 °C (tal como temperatura ambiente). Si la sonda se incluye en un conjunto de sondas (por ejemplo, múltiples plásmidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más plásmidos), los plásmidos se pueden mezclar en una proporción molar igual antes de realizar la reacción de marcado (tal como desplazamiento de mella o desplazamiento de mella modificado).

En otros ejemplos, también se pueden emplear procedimientos de marcado químico. Numerosos reactivos (incluyendo hapteno, fluoróforo y otros nucleótidos marcados) y otros kits están disponibles comercialmente para el marcado enzimático de ácidos nucleicos, incluyendo las sondas de ácido nucleico divulgadas. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, cualquiera de los marcadores y procedimientos de detección divulgados anteriormente son aplicables en el contexto del marcado de una sonda, por ejemplo, para uso en reacciones de hibridación *in situ*. Por ejemplo, el sistema de marcado de ADN MULTIPRIME® de Amersham, diversos reactivos y kits específicos disponibles en Molecular Probes/Life Technologies, o cualquier otro reactivo o kit similar se pueden usar para marcar los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento. En ejemplos particulares, las sondas divulgadas se pueden marcar directa o indirectamente con un hapteno, un ligando, un resto fluorescente (por ejemplo, un fluoróforo o un nanocristal semiconductor), un resto cromogénico o un radioisótopo. Por ejemplo, para el marcado indirecto, el marcador puede unirse a moléculas de ácido nucleico a través de un conector (por ejemplo, PEG o biotina). En la patente de EE. UU. n.º 7.541.455 se proporcionan procedimientos adicionales que se pueden usar para marcar moléculas de ácido nucleico de sonda.

15 **E. Procedimientos para la hibridación *in situ* para la enumeración de cromosomas**

La presente invención también presenta ensayos de hibridación *in situ* (ISH), por ejemplo, ensayos de ISH de campo claro, para la detección de una diana génica y un cromosoma (por ejemplo, una diana centromérica de un cromosoma) usando sondas de oligonucleótidos monocatenarias. Por ejemplo, un procedimiento comprende poner en contacto una muestra de tejido con una sonda de control específica para una región de control de un cromosoma (por ejemplo, el cromosoma 17), en el que la sonda de control es una sonda de oligonucleótidos monocatenaria marcada con al menos un primer marcador. La sonda de control puede configurarse para lograr una intensidad de tinción de ≥ 2 y una cobertura de tinción de ≥ 50 % de los núcleos en un plazo de 3 horas cuando se aplica a una muestra de control. El procedimiento comprende además hibridar la sonda de control con la región de control en condiciones durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 3 horas (por ejemplo, \leq aproximadamente 2,5 horas, \leq aproximadamente 2 horas, \leq aproximadamente 1,5 horas o \leq aproximadamente 1 hora), lavar la muestra para eliminar la sonda no unida y detectar la presencia de la sonda hibridada.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra de tejido con una sonda diana específica para una región diana (por ejemplo, HER2) del cromosoma, en el que la sonda diana es una sonda de oligonucleótidos monocatenaria marcada con al menos un segundo marcador.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además la aplicación de reactivos de detección cromogénicos que reconocen el primer marcador y amplifican la señal asociada con dicho primer marcador. El procedimiento puede presentar el uso de una o más sondas (por ejemplo, SEQ ID NO: 3-16) o sistemas como se describe en el presente documento.

El ADN bloqueante específico del genoma (tal como ADN humano, por ejemplo, ADN placentario humano total o ADN Cot-1™) se incluye habitualmente en una solución de hibridación (tal como para hibridación *in situ*) para suprimir la hibridación de la sonda con secuencias de ADN repetitivas o para contrarrestar la hibridación de la sonda con secuencias fuera de la diana altamente homólogas (con frecuencia idénticas) cuando se utiliza una sonda complementaria a un ácido nucleico diana genómico humano. En la hibridación con sondas estándar, en ausencia de ADN bloqueante específico del genoma, habitualmente está presente un nivel inaceptablemente elevado de tinción de fondo (por ejemplo, unión inespecífica, tal como hibridación con una secuencia de ácido nucleico no diana), incluso cuando se usa una sonda "libre de repeticiones". Las sondas de ácido nucleico divulgadas muestran una tinción de fondo reducida, incluso en ausencia de ADN bloqueante. En ejemplos particulares, la solución de hibridación que incluye las sondas divulgadas no incluye ADN bloqueante específico del genoma (por ejemplo, ADN placentario humano total o ADN Cot-1™, si la sonda es complementaria a un ácido nucleico diana genómico humano). Esta ventaja se deriva de la naturaleza excepcionalmente específica de las secuencias diana incluidas en la sonda de ácido nucleico; cada secuencia de la sonda marcada se une solo a la secuencia genómica excepcionalmente específica análoga. Esto da como resultado incrementos espectaculares en las relaciones señal-ruido de las técnicas de ISH.

Como tal, algunos procedimientos en el presente documento pueden estar libres del uso de ADN bloqueante. Sin embargo, en algunos ejemplos, se puede usar ADN bloqueante. En algunos ejemplos se usa una cantidad de ADN bloqueante, pero la cantidad de ADN bloqueante es suficiente para bloquear no más de un porcentaje especificado de unión inespecífica, por ejemplo, no más de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 %.

Para determinar una cantidad de ADN bloqueante que sea suficiente para bloquear no más de un porcentaje especificado (por ejemplo, un 50 %) de la unión inespecífica, se pueden realizar las siguientes pruebas. Configurar un ensayo de hibridación *in situ*, poner en contacto una muestra de tejido con una sonda de control bicatenaria específica para una región de control de un cromosoma (en combinación con de cero a una cantidad que aumenta en serie gradualmente de ADN bloqueante); hibridar la sonda de control bicatenaria con la región de control; lavar la muestra para eliminar la sonda bicatenaria no unida; y detectar la presencia de la sonda hibridada. A continuación, observar la cantidad de fondo que está bloqueada por el ADN bloqueante cuya cantidad se incrementa en serie en cada ensayo. La cantidad de ADN bloqueante que logra un porcentaje específico del bloqueo del fondo corresponde a la cantidad de ADN bloqueante que es suficiente para bloquear no más de un porcentaje especificado (por ejemplo, un 50 %) de

la unión inespecífica. Por ejemplo, la cantidad de ADN bloqueante que logra bloquear un 50 % del porcentaje del fondo corresponde a la cantidad de ADN bloqueante que es suficiente para bloquear no más de un 50 % de la unión inespecífica.

5 En algunos ejemplos, dicha cantidad de ADN bloqueante está entre aproximadamente 1 pg/ml y 1 mg/ml. En algunos ejemplos, dicha cantidad de ADN bloqueante está entre aproximadamente 1 pg/ml y 0,5 mg/ml. En algunos ejemplos, dicha cantidad de ADN bloqueante está entre aproximadamente 1 pg/ml y 0,25 mg/ml. En algunos ejemplos, dicha cantidad de ADN bloqueante está entre aproximadamente 1 pg/ml y 1 µg/ml.

10 Los procedimientos para obtener dos señales de hibridación *in situ* cromogénica de campo claro por célula pueden comprender poner en contacto una muestra de tejido que contiene una pluralidad de células con una sonda de control específica de una región de control de un único cromosoma, seleccionándose la sonda para que no se una evidentemente de forma inespecífica en ausencia de ADN bloqueante; hibridar la sonda de control con la región de control de dicho cromosoma; lavar la muestra para eliminar la sonda no unida; y detectar la presencia de la sonda
15 hibridada a través de un reactivo cromogénico para generar dos señales de hibridación *in situ* cromogénica de campo claro por célula. Para determinar que la sonda seleccionada no se une evidentemente de forma inespecífica en ausencia de ADN bloqueante se puede realizar un ensayo comparativo (ensayo 2), junto con el ensayo mencionado anteriormente (ensayo 1), en el que se emplea la misma sonda seleccionada tanto en el ensayo 1 como en el ensayo 2. El ensayo 1 está libre del ADN bloqueante y el ensayo 2 emplea un ADN bloqueante. Luego se comparan los datos
20 respectivos de los dos ensayos. La sonda seleccionada no se une evidentemente de forma inespecífica en ausencia de ADN bloqueante cuando los datos de los dos ensayos respectivos son iguales o sustancialmente iguales.

En algunos ejemplos, la solución de hibridación puede contener ADN transportador de un organismo diferente (por ejemplo, ADN de esperma de salmón o ADN de esperma de arenque, si el ácido nucleico diana genómico es un ácido nucleico diana genómico humano) para reducir la unión inespecífica de la sonda a materiales que no son ADN (por ejemplo, recipientes de reacción o portaobjetos) con alta carga positiva neta que pueden unirse de forma inespecífica al ADN de la sonda cargada negativamente.

Los procedimientos de la presente divulgación pueden comprender detectar señales en las que más de un 50 % de los núcleos de la muestra de tejido tienen señales enumerables para dicho cromosoma, en el que una señal enumerable es una forma generalmente redonda (por ejemplo, como se describió anteriormente). En algunos ejemplos, las señales de fondo no se observan en > 70 % de las células de la muestra de tejido. En algunos ejemplos, las señales de fondo no se observan en > 80 % de las células de la muestra de tejido. En algunos ejemplos, las señales de fondo no se observan en > 90 % de las células de la muestra de tejido. En algunos ejemplos, las señales de fondo están presentes pero son suficientemente débiles en intensidad para permitir la identificación de señales enumerables en > 50 % de los núcleos.

En algunos ejemplos, más de un 60 % de los núcleos tienen señales de cromosomas enumerables. En algunos ejemplos, más de un 70 % de los núcleos tienen señales de cromosomas enumerables. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 60 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 75 % del radio exterior. En algunos ejemplos, el radio interior no es inferior a un 90 % del radio exterior.

La hibridación *in situ* (ISH) implica poner en contacto una muestra que contiene un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ácido nucleico diana genómico) en el contexto de una preparación de cromosomas metafásicos o interfásicos (tal como una muestra de células o de tejido montada en un portaobjetos) con una sonda marcada específicamente hibridable o específica para el ácido nucleico diana (por ejemplo, una o más de las sondas divulgadas en el presente documento). Los portaobjetos se pretratan opcionalmente, por ejemplo, para eliminar parafina u otros materiales que puedan interferir en una hibridación uniforme. La muestra cromosómica y la sonda se tratan ambas, por ejemplo mediante calentamiento para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. La sonda (formulada en un tampón de hibridación adecuado) y la muestra se combinan, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que se produzca la hibridación (típicamente para alcanzar el equilibrio). La preparación cromosómica se lava para eliminar el exceso de sonda, y la detección del marcado específico de la diana se realiza usando técnicas estándar.

Por ejemplo, una sonda biotinilada puede detectarse usando avidina marcada con fluoresceína o fosfatasa alcalina con avidina. Para la detección de fluorocromo, el fluorocromo se puede detectar directamente, o las muestras se pueden incubar, por ejemplo, con avidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La amplificación de la señal de FITC se puede efectuar, si es necesario, mediante incubación con anticuerpos caprinos antiavidina conjugados con biotina, lavado y una segunda incubación con avidina conjugada con FITC. Para la detección por actividad enzimática, las muestras se pueden incubar, por ejemplo, con estreptavidina, lavar, incubar con fosfatasa alcalina conjugada con biotina, lavar de nuevo y preequilibrar (por ejemplo, en tampón de fosfatasa alcalina (AP)). La reacción enzimática se puede realizar, por ejemplo, en tampón de AP que contiene NBT/BCIP y detener mediante incubación en 2 x SSC. Para una descripción general de los procedimientos de hibridación *in situ*, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.888.278.

65 Numerosos procedimientos para FISH, CISH y SISH son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos para realizar FISH se describen en las patentes de EE. UU. n.º 5.447.841; 5.472.842; y 5.427.932; la CISH se describe

en la patente de EE. UU. n.º 6.942.970, y se proporcionan procedimientos de detección adicionales en la patente de EE. UU. n.º 6.280.929.

Se pueden emplear numerosos reactivos y esquemas de detección junto con los procedimientos de FISH, CISH y SISH para mejorar la sensibilidad, la resolución u otras propiedades deseables. Como se analizó anteriormente, las sondas marcadas con fluoróforos (incluyendo colorantes fluorescentes y puntos cuánticos) se pueden detectar ópticamente directamente al realizar la FISH. De forma alternativa, la sonda se puede marcar con una molécula no fluorescente, tal como un hapteno (tal como los siguientes ejemplos no limitantes: biotina, digoxigenina, DNP y diversos oxazoles, pirrazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenonas, cumarina, compuestos basados en cumarina, podofilotoxina, compuestos basados en podofilotoxina y combinaciones de los mismos), ligando u otro resto detectable indirectamente. Las sondas marcadas con dichas moléculas no fluorescentes (y las secuencias de ácido nucleico diana a las que se unen) se pueden detectar luego al poner en contacto la muestra (por ejemplo, la muestra de células o de tejido a la que está unida la sonda) con un reactivo de detección marcado, tal como un anticuerpo (o receptor u otra molécula de unión específica) específico para el hapteno o ligando elegido. El reactivo de detección se puede marcar con un fluoróforo (por ejemplo, punto cuántico) o con otro resto detectable indirectamente, o se puede poner en contacto con uno o más agentes de unión específica adicionales (por ejemplo, anticuerpos secundarios o específicos), que a su vez se pueden marcar con un fluoróforo. Opcionalmente, el marcador detectable se une directamente al anticuerpo, receptor (u otro agente de unión específica).

De forma alternativa, el marcador detectable se une al agente de unión a través de un conector, tal como un conector de tiol de hidrazida, un conector de polietilenglicol o cualquier otro resto de unión flexible con reactividades comparables. Por ejemplo, un agente de unión específica, tal como un anticuerpo, un receptor (u otro antiligando), avidina o similares, se puede modificar covalentemente con un fluoróforo (u otro marcador) a través de un conector de polialquilenglicol heterobifuncional tal como un conector de polietilenglicol (PEG) heterobifuncional. Un conector heterobifuncional combina dos grupos reactivos diferentes seleccionados, por ejemplo, de un grupo que reacciona con carbonilo, un grupo que reacciona con amina, un grupo que reacciona con tiol y un grupo fotorreactivo, el primero de los cuales se une al marcador y el segundo de los cuales se une al agente de unión específica.

En otros ejemplos, la sonda, o agente de unión específica (tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo primario, receptor u otro agente de unión) se marca con una enzima que es capaz de convertir una composición fluorogénica o cromogénica en una señal detectable fluorescente, coloreada o detectable de otro modo (por ejemplo, como en el depósito de partículas metálicas detectables en SISH). Como se indicó anteriormente, la enzima se puede unir directa o indirectamente a través de un conector a la sonda o reactivo de detección pertinente. Ejemplos de reactivos (por ejemplo, reactivos de unión) y químicos adecuados (por ejemplo, químicos de unión y de conector) se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2006/0246524; 2006/0246523 y 2007/0117153.

En ejemplos adicionales se utiliza un procedimiento de amplificación de señal, por ejemplo, para aumentar la sensibilidad de la sonda. Por ejemplo, se puede utilizar la amplificación de la señal de tiramida (véase la patente de EE. UU. n.º 5.196.306). En una variación de este procedimiento, una sonda de ácido nucleico biotinilada detecta la presencia de una diana uniéndose a la misma. A continuación, se añade un conjugado estreptavidina-peroxidasa. La estreptavidina se une a la biotina. Se usa un sustrato de tiramida biotinilada (tiramina es 4-(2-aminoetil)fenol), que presumiblemente se convierte en un radical libre cuando interactúa con la enzima peroxidasa. El radical fenólico reacciona entonces rápidamente con el material circundante, depositando o fijando la biotina en las proximidades. Este procedimiento se repite proporcionando más sustrato (tiramida biotinilada) y formando biotina más localizada. Finalmente, se detecta el depósito de biotina "amplificado" con estreptavidina unida a una molécula fluorescente. De forma alternativa, el depósito de biotina amplificado se puede detectar con complejo avidina-peroxidasa, que entonces se alimenta con 3,3'-diaminobenzidina para producir un color marrón. Se ha encontrado que la tiramida unida a moléculas fluorescentes también sirve como sustrato para la enzima, simplificando de este modo el procedimiento al eliminar etapas. Otra estrategia de amplificación más se describe en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2013/0260379.

En otros ejemplos, el procedimiento de amplificación de la señal utiliza una amplificación de la señal de ADN ramificado (ADNr). En algunos ejemplos, los oligonucleótidos específicos de la diana (extensores de marcador y extensores de captura) hibridan con alta rigurosidad con el ácido nucleico diana. Los extensores de captura están diseñados para hibridar con la diana y capturar sondas, que están unidas a una placa de micropocillos. Los extensores de marcador están diseñados para hibridar con regiones contiguas en la diana y proporcionar secuencias para la hibridación de un oligonucleótido preamplificador. La amplificación de la señal comienza entonces con sondas de preamplificador que hibridan con extensores de marcador. El preamplificador forma un híbrido estable solo si hibrida con dos extensores de marcador adyacentes. Otras regiones del preamplificador están diseñadas para hibridar con múltiples moléculas amplificadoras de ADNr que crean una estructura ramificada. Finalmente, los oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina (AP), que son complementarios de las secuencias amplificadoras de ADNr, se unen a la molécula de ADNr por hibridación. La señal del ADNr es el producto quimioluminiscente de la reacción con AP (véase, por ejemplo, Tsongalis, *Microbiol, Inf. Dis.*, 126:448-453, 2006; patente de EE. UU. n.º 7.033.758).

En ejemplos adicionales, el procedimiento de amplificación de la señal utiliza anticuerpos polimerizados. En algunos ejemplos, la sonda marcada se detecta usando un anticuerpo primario contra el marcador (tal como un anticuerpo

anti-DIG o anti-DNP). El anticuerpo primario se detecta mediante un anticuerpo secundario polimerizado (tal como un anticuerpo secundario polimerizado conjugado con HRP o un anticuerpo secundario conjugado con AP). La reacción enzimática de AP o HRP da lugar a la formación de señales potentes que se pueden visualizar.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que seleccionando apropiadamente pares de agentes de unión específica para sondas marcadas se pueden producir esquemas de detección múltiplex para facilitar la detección de múltiples ácidos nucleicos diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana genómicos) en un único ensayo (por ejemplo, en una única muestra de células o tejido o en más de una muestra de células o tejido). Por ejemplo, una primera sonda que corresponde a un primer ácido nucleico diana se puede marcar con un primer hapteno, tal como biotina, mientras que
 10 una segunda sonda que corresponde a un segundo ácido nucleico diana se puede marcar con un segundo hapteno, tal como DNP. Después de la exposición de la muestra a las sondas, las sondas unidas se pueden detectar poniendo en contacto la muestra con un primer agente de unión específica (en este caso, avidina marcada con un primer fluoróforo, por ejemplo, un primer punto cuántico espectralmente diferenciado, por ejemplo, que emite a 585 nm) y un segundo agente de unión específica (en este caso, un anticuerpo anti-DNP, o fragmento de anticuerpo, marcado con un segundo fluoróforo (por ejemplo, un segundo punto cuántico espectralmente diferenciado, por ejemplo, que emite a 705 nm)). Se pueden añadir pares adicionales de sondas y agentes de unión al esquema de detección múltiplex usando otros fluoróforos espectralmente diferenciados. Se pueden prever numerosas variaciones de directo e indirecto (una etapa, dos etapas o más), todas las cuales son adecuadas en el contexto de las sondas y ensayos divulgados.

20 Se pueden encontrar detalles adicionales sobre ciertos procedimientos de detección, por ejemplo, tal como se utilizan en procedimientos de CISH y SISH, en Bourne, *The Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods*, publicado por Dako Corporation, Santa Barbara, CA.

25 Las dificultades encontradas con frecuencia en los análisis por ISH pueden ser el resultado de la manera en que los tejidos se conservan típicamente. El pilar del laboratorio de anatomía patología diagnóstica ha sido durante muchas décadas el bloque de tejido incluido en parafina y fijado en formol, seccionado y montado sobre portaobjetos de vidrio. La fijación en dicho conservante provoca la reticulación de macromoléculas, tanto aminoácidos como ácidos nucleicos. Estos componentes reticulados se deben eliminar para permitir el acceso de la sonda al ácido nucleico diana y para permitir que el anticuerpo reconozca el antígeno correspondiente. “Desenmascarar” el antígeno y/o el ácido nucleico se logra típicamente de forma manual con múltiples etapas de pretratamiento, digestión proteolítica y lavado. Antes de la tinción, también se requiere la eliminación completa de la parafina para que no interfiera en la unión del anticuerpo o la sonda. La desparafinación se puede lograr mediante el uso de múltiples (por ejemplo, dos o tres) reactivos de clarificación sucesivos que son disolventes de parafina (por ejemplo, xileno, sustitutos de xileno o tolueno).

35 La preparación de la muestra puede incluir la etapa de acondicionamiento celular. El acondicionamiento celular se analiza con mayor detalle en la patente de EE. UU. 6.855.552, Towne, *et al.* “Automated immunohistochemical and *in situ* hybridization assay formulations”. En las etapas de acondicionamiento celular ilustrativas se aplica un reactivo acondicionador de células y la muestra se pone en contacto a la temperatura apropiada durante un período de tiempo apropiado para que los antígenos y/o las dianas de ácido nucleico se expresen suficientemente para su detección. Un aspecto de la presente divulgación es que el instrumento automatizado puede ajustar automáticamente la duración y/o la temperatura del acondicionamiento celular en respuesta a los datos introducidos por el usuario. El acondicionamiento celular puede incluir además la aplicación de un reactivo de proteasa. De forma ilustrativa, un tratamiento con proteasa puede implicar la etapa de poner en contacto una solución de proteasa con una muestra biológica. El tratamiento con proteasa, al igual que el acondicionamiento celular, está destinado a aumentar la expresión de antígenos diana y/o ácidos nucleicos diana.
 45

Se pueden usar reactivos de acondicionamiento celular tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para dianas de ácido nucleico (ISH). El contacto puede hacerse a una temperatura de aproximadamente 95 °C durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 90 minutos. Una lista parcial de posibles reactivos aparece en *Analytical Morphology*, Gu, ed., Eaton Publishing Co. (1997) en las páginas 1-40. Se puede incluir dodecilsulfato de sodio (SDS) y/o etilenglicol en la solución de acondicionamiento. Además, pueden añadirse iones metálicos u otros materiales a estos reactivos para aumentar la efectividad del acondicionamiento celular. Soluciones de acondicionamiento celular ejemplares están disponibles en Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ (Acondicionador celular 1 (CC1) n.º de catálogo: 950-124; Acondicionador celular 2 (CC2) n.º de catálogo: 950-123; SSC (10X) n.º de catálogo: 950-110; Acondicionador celular ULTRA (ULTRA CC1) n.º de catálogo: 950-224; Acondicionador celular ULTRA (ULTRA CC2) n.º de catálogo: 950-223, Proteasa 1 n.º de catálogo: 760-2018; Proteasa 2 n.º de catálogo: 760-2019; Proteasa 3 n.º de catálogo: 760-2020). En algunos ejemplos, la aplicación del reactivo de unión de hibridación *in situ* se produce después de aplicar el reactivo de acondicionamiento celular y antes de aplicar el reactivo cromogénico.
 50
 55

60 En ejemplos ilustrativos, el procedimiento incluye aplicar un reactivo de enjuague. Entre las diversas etapas descritas en el presente documento y como parte del sistema descrito en el presente documento, pueden añadirse etapas de enjuague para eliminar los reactivos residuales que no han reaccionado de la etapa anterior. Las etapas de enjuague pueden incluir además incubaciones, que incluyen mantener un reactivo de enjuague en la muestra durante un tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada con o sin mezcla. Las condiciones apropiadas para las etapas de enjuague pueden ser distintas entre las diversas etapas. Reactivos de enjuague ejemplares están disponibles en
 65

Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ (Tampón de reacción (10x) n.º de catálogo: 950-300; Special Stains Wash (10x) n.º de catálogo: 860-015).

5 Los sistemas automatizados ejemplares disponibles a través de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ incluyen el sistema de tinción SYMPHONY®, n.º de catálogo: 900-SYM3, sistemas de preparación automatizada de portaobjetos VENTANA® BenchMark, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS, N750-BMKU-FS, VENTANA, y el teñidor de portaobjetos automatizado VENTANA® BenchMark Special Stains. Estos sistemas emplean un sistema controlado por microprocesador que incluye un carrusel giratorio que soporta portaobjetos colocados radialmente. Un motor de velocidad gradual hace girar el carrusel colocando cada portaobjetos debajo de una de una serie de dispensadores de reactivos colocados encima de los portaobjetos. Los códigos de barras en los portaobjetos y los dispensadores de reactivos permiten el posicionamiento controlado por ordenador de los dispensadores y portaobjetos para que se puedan realizar diferentes tratamientos con reactivos para cada una de las diversas muestras de tejido mediante la programación apropiada del ordenador.

15 Si bien la presente invención describe un ensayo de ISH dual de HER2/CHR17 basado en oligonucleótidos monocatenarios, se entiende que los expertos en la técnica podrían aplicar los descubrimientos divulgados en el presente documento a otra combinación gen/centrómero de interés.

20 En algunos modos de realización, los sistemas divulgados (por ejemplo, sondas) se pueden usar en procedimientos para determinar el número de copias de un ácido nucleico diana (tal como HER2) en una muestra biológica (tal como una muestra de tejido). Los procedimientos para determinar el número de copias de un gen o región cromosómica son bien conocidos por los expertos en la técnica. En algunos ejemplos, los procedimientos incluyen la hibridación *in situ* (tal como la hibridación *in situ* fluorescente, cromogénica o con plata), la hibridación genómica comparativa o la reacción en cadena de la polimerasa (tal como la PCR cuantitativa en tiempo real). En algunos ejemplos, los procedimientos para determinar el número de copias génicas incluyen contar el número de señales de ISH (tales como manchas fluorescentes, coloreadas o plateadas) para el ácido nucleico diana en una o más células individuales. Los procedimientos también pueden incluir contar el número de señales de ISH (tales como manchas fluorescentes, coloreadas o plateadas) para una referencia (tal como una sonda específica de un cromosoma) en las células. En ejemplos particulares, el número de copias del gen (o cromosoma) lo puede estimar la persona (u ordenador, en el caso de un procedimiento automatizado) que puntúa el portaobjetos. En algunos ejemplos, un número de copias aumentado con respecto a un control (tal como un aumento de aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o más con respecto a una muestra de control o valor de referencia) indica un aumento en el número de copias de ácido nucleico diana.

35 En algunos ejemplos, el procedimiento incluye contar el número de copias por célula o núcleo de una referencia, tal como un locus cromosómico que se sabe que no es anómalo, por ejemplo un centrómero. En algunos ejemplos, la referencia está en el mismo cromosoma que el gen de interés. Los cromosomas de referencia ejemplares que se pueden usar para genes humanos particulares de interés se proporcionan en la TABLA 2. En ejemplos particulares, el locus de referencia se detecta usando una sonda específica de centrómero. Dichas sondas son conocidas en la técnica y están disponibles comercialmente, por ejemplo, sondas Vysis CEP (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) y sondas centroméricas SPOTLIGHT (Invitrogen, Carlsbad, CA). En algunos ejemplos, una proporción del número de copias del ácido nucleico diana con respecto al número de copias de la referencia mayor que aproximadamente dos (tal como mayor que aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20 o más) indica un aumento en el número de copias del ácido nucleico diana.

45

TABLA 2. Cromosomas de referencia ejemplares para ácidos nucleicos diana particulares

Ácido nucleico diana	Cromosoma de referencia
PTEN	10
HER2	17
PIK3CA	3
TOP2A	17
MET	7
MDM2	12

50 **F. Procedimientos de puntuación**

La presente invención también presenta procedimientos para puntuar el número de copias génicas de una región diana y opcionalmente compararlo con el número de copias de una región de control. Para los procedimientos adicionales de puntuación, que se pueden usar con los procedimientos descritos en el presente documento, se hace

referencia a la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 2012/0141472 para la divulgación relacionada con la puntuación de la ISH.

5 En algunos ejemplos, un número de copias génicas aumentado incluye el número de copias génicas por núcleo (tal como el número de copias génicas promedio por núcleo) en la muestra de más de aproximadamente dos copias del gen por núcleo (tal como mayor de 2, 3, 4, 5, 10 o 20 copias). En otros ejemplos, un número de copias génicas aumentado incluye una proporción del número de copias génicas con respecto al número de copias de su cromosoma correspondiente (tal como una proporción gen:cromosoma promedio) en la muestra de más de aproximadamente 2 (tal como una proporción de más de 2, 3, 4, 5, 10 o 20). En ejemplos adicionales, un número de copias génicas
10 aumentado incluye un aumento en el número de copias génicas con respecto a un control (tal como un aumento de aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces o más). Por lo tanto, en algunos ejemplos, el procedimiento incluye comparar el número de copias génicas en la muestra del sujeto con el número de copias génicas en un control o un valor de referencia o intervalo de valores esperado para el número de copias génicas en un tejido normal
15 apropiado.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de puntuación (por ejemplo, enumeración) del número de copias de un gen en una muestra de un sujeto, en el que la muestra se tiñe mediante ISH (tal como FISH, SISH, CISH o una combinación de dos o más de los mismos) para el gen de interés y en el que las copias individuales del gen se pueden distinguir en las células de la muestra. En ejemplos particulares, la muestra es una muestra biológica de un sujeto, tal como una muestra tumoral (por ejemplo, una biopsia de tumor). Los procedimientos para determinar el número de copias génicas mediante ISH son bien conocidos en la técnica.

25 En algunos ejemplos, el procedimiento incluye identificar células individuales en una muestra con el mayor número de señales por núcleo para el gen (tal como la señal más potente en la muestra), contar el número de señales para el gen en las células identificadas y determinar un número promedio de señales por célula, obteniéndose de este modo el número de copias génicas en la muestra. En ejemplos adicionales, el procedimiento incluye además contar el número de señales para una referencia (tal como un locus cromosómico que se sabe que no es anómalo, por ejemplo, ADN centromérico) y determinar una proporción promedio del número de señales para el gen con respecto al número de señales para la referencia por célula.

El procedimiento de puntuación puede incluir identificar células individuales en la muestra (tal como una sección de tejido o núcleo tumoral) que tienen el mayor número de señales (tal como el mayor número de manchas por célula o la intensidad de tinción más brillante) para el gen de interés en las células de la muestra. Por lo tanto, el procedimiento
35 divulgado puede no determinar el número de copias génicas en un muestreo aleatorio de células en la muestra. Por el contrario, el procedimiento puede incluir el recuento específico del número de copias génicas en aquellas células que tienen el mayor número de copias génicas en la muestra. En algunos ejemplos, la identificación de las células individuales que tienen el mayor número de señales para el gen incluye examinar una muestra teñida por ISH para el gen bajo microscopía de baja potencia (tal como aproximadamente 20 > < aumentos). Las células con la señal más potente (por ejemplo, la mayor señal de amplificación a mayor potencia) se identifican para recuento a simple vista o mediante un sistema de obtención de imágenes automatizado. En algunos ejemplos, como cuando la muestra es una sección de tejido, la muestra se examina (por ejemplo, se escanea visualmente) para identificar una región que tiene una concentración de células tumorales que tiene amplificación del gen. A continuación, se cuenta el número de copias génicas en las células con la máxima amplificación en la región seleccionada. En otros ejemplos, como cuando la muestra es un núcleo tumoral (como una micromatriz tumoral), la mayoría de la muestra es visible en el campo de visión con aumento de baja potencia y las células individuales (tal como células tumorales) con la señal más potente (por ejemplo, la máxima señal de amplificación a alta potencia) se identifican por separado para su recuento. En ejemplos particulares, las células elegidas para el recuento del número de copias génicas pueden ser células no consecutivas, tales como células que no están adyacentes o en contacto entre sí. En otros ejemplos, al menos algunas de las células elegidas para el recuento del número de copias génicas pueden ser células consecutivas, tales como células que están adyacentes o en contacto entre sí.

Los procedimientos divulgados pueden incluir contar el número de señales de ISH (tales como manchas fluorescentes, coloreadas o plateadas) para el gen en las células identificadas. Los procedimientos también pueden incluir contar el número de señales de ISH (tales como manchas fluorescentes, coloreadas o plateadas) para una referencia (tal como una sonda específica de un cromosoma) en las células identificadas. En algunos ejemplos, el número de manchas por células se puede distinguir en las células identificadas y el número de manchas se cuenta (o se enumera) y se registra. En otros ejemplos, una o más de las células identificadas pueden incluir un grupo, que es la presencia de múltiples señales superpuestas en un núcleo que no se pueden contar (o enumerar). En ejemplos particulares, el número de copias del gen (o cromosoma) lo puede estimar la persona (u ordenador, en el caso de un procedimiento automatizado) que puntúa el portaobjetos. Por ejemplo, un experto en la técnica de la anatomía patológica puede estimar que un grupo contiene un número particular de copias de un gen (tal como 10, 20 o más copias) basándose en la experiencia en la enumeración del número de copias génicas en una muestra. En otros ejemplos, la presencia de un grupo se puede observar como un grupo, sin estimar el número de copias presentes en el grupo.

65

El número de células identificadas para el recuento es un número suficiente de células que proporciona la detección de un cambio (tal como un aumento o disminución) en el número de copias génicas. En algunos ejemplos, el número de células identificadas para el recuento es al menos aproximadamente 20, por ejemplo, al menos 25, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 500, 1000 células o más. En un ejemplo particular, se cuentan aproximadamente 50 células. En otros ejemplos, se cuenta cada célula de la muestra o cada célula en un campo de visión del microscopio, o en varios campos del microscopio (tal como al menos 2 campos del microscopio, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 campos del microscopio, y similares) que contienen 3 o más copias del gen de interés (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más).

Los procedimientos pueden presentar la obtención de una muestra que ha sido sometida a ISH de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento. Se identifica un área de núcleos neoplásicos con el mayor número de copias y las señales enumerables para el cromosoma/diana se cuentan en 50-100 núcleos neoplásicos y bien en 50 núcleos mesenquimatosos adyacentes o en 50 núcleos epiteliales normales adyacentes.

Los criterios de puntuación pueden ser los siguientes: sin tinción de < 1 punto/10 células se puntúa como 0; 1-3 puntos/célula se puntúa como 1; 4-9 puntos/célula, ninguno o muy pocos grupos de puntos se puntúan como 2; 10-15 puntos/célula y < 10 % de puntos en grupos se puntúan como 3; y > 15 puntos/célula y > 10 % de puntos en grupos se puntúan como 4.

En algunos ejemplos se calcula el número promedio de señales de la diana (por ejemplo, HER2) por núcleo. En algunos ejemplos se calcula el número promedio de copias de cromosoma (por ejemplo, CHR17) por núcleo. En algunos ejemplos se calcula la proporción de la señal de la diana con respecto a la señal del cromosoma.

La divulgación se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

A. Muestras

Se utilizaron muestras de tejido de mama para desarrollar y optimizar los ensayos de ISH simples y duales de HER2 y/o CHR17 basados en oligonucleótidos monocatenarios. Las muestras se obtuvieron de un archivo de muestras de tejido mantenido en Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ). Estas muestras eran muestras clínicas sobrantes que se habían desidentificado y desvinculado de la información del paciente y, por lo tanto, no se requería el consentimiento informado del paciente (6). Se colocaron secciones de parafina (4 µm) que contenían núcleos tisulares de tejido de mama incluido en parafina y fijado con formol en portaobjetos de vidrio SUPERFROST Plus.

B. Sondas

El reactivo para las sondas INFORM HER2 DUAL ISH DNA incluye un dispensador de sondas que contiene 12 µg/ml de sonda de HER2 marcada con dinitrofenilo (DNP) en un cóctel con una sonda del Chr17 marcada con digoxigenina (DIG) con 4 mg/ml de ADN bloqueante humano en un tampón basado en formamida.

La sonda de oligonucleótidos monocatenaria de HER2 (sonda de oligonucleótidos de HER2) es una sonda genómica libre de repeticiones marcada con dinitrofenilo (DNP) dirigida específicamente a la región del gen HER2. Similar a la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA, la sonda de oligonucleótidos de HER2 abarca > 327 000 nucleótidos (nt) (35 027 979-35 355 516) de ADN genómico del cromosoma humano 17, que abarca la región diana de HER2 (UCSC Genome Browser on Human May 2004 (NCBI35/hg17) Assembly). Las secuencias de oligonucleótidos de HER2 se diseñaron a partir de las secuencias en la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA. Cada uno de los oligonucleótidos de HER2 se diseñó con una longitud de 80-meros; por lo tanto, el nivel de rigurosidad para la unión a no dianas se elevó más de acuerdo con los criterios de diseño de la sonda de oligonucleótidos mencionados anteriormente. La especificidad de la sonda de oligonucleótidos de HER2 se validó experimentalmente en placas metafásicas en las condiciones del ensayo de ISH examinadas.

Se usaron búsquedas bioinformáticas para identificar secuencias de ácido nucleico específicas de HER2 alrededor de la región diana de HER2. La secuencia de ácido nucleico diana genómica seleccionada se separa en segmentos consecutivos de 80 nt no superpuestos. Se sintetizaron mil ciento noventa y seis (1196) oligonucleótidos ~80-meros que portaban cada uno 5 haptenos de DNP en una fosforamida abásica con una distancia de 20 nt entre ellos. Una estructura representativa de estos oligonucleótidos se muestra en la FIG. 1(A) - (B). La parte en negrita de la FIG. 1(A), también SEQ ID NO: 1, se muestra con más detalle en la FIG. (B). Los oligonucleótidos se purificaron por afinidad y se analizaron mediante espectrometría de masas y electroforesis en gel. La sonda de oligonucleótidos de HER2 se formuló en un tampón basado en formamida sin ADN bloqueante humano. En el proceso de cribado inicial, el número de oligonucleótidos, el número y espaciado de los haptenos de DNP se sometieron a prueba funcionalmente en el tampón basado en formamida sin ADN bloqueante humano para determinar la sensibilidad y especificidad para el gen HER2.

La sonda bicatenaria de HER2 (sonda bc de HER2) se marcó con DNP con la misma plantilla de ADN de HER2 en la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA. La sonda bc de HER2 se formuló con 4 mg/ml de ADN bloqueante humano en el tampón basado en formamida. La sonda bc de HER2 solo se usó en el ensayo de ISH simple.

5 El producto comercial INFORM HER2 DUAL ISH DNA mencionado anteriormente contiene un dispensador que contiene 0,75 µg/ml de una sonda del Chr17 marcada con DIG en un cóctel con el HER2 marcado con DNP.

10 Se preparó una sonda de oligonucleótidos monocatenaria del Chr17 (sonda de oligonucleótidos del Chr17) con un conjunto de 14 oligonucleótidos con longitudes de 58 pb a 87 pb. Cada oligonucleótido se marcó con dos moléculas del hapteno DIG en una cola que no se une que tiene la secuencia TATTTTTATTTT en su extremo 5' (véase la FIG. 2(A) - (C), en la que la FIG. 2(A) muestra una secuencia de sonda del Chr17 ejemplar (SEQ ID. NO: 2) que incluye la cola en el extremo 5' y la FIG. 2(B) muestra una estructura más detallada de la región en negrita de aminoC6+Dig de la FIG. 2(A) y la FIG. 2(B) muestra una estructura más detallada de la región en negrita Am~Uni+Dig. Estos oligonucleótidos se purificaron mediante PAGE y se analizaron con espectrometría de masas. La sonda de oligonucleótidos del Chr17 se formuló en un tampón basado en formamida sin ADN bloqueante humano. En el proceso de cribado inicial, se sometieron a prueba un total de 28 oligonucleótidos para determinar la especificidad por el centrómero del cromosoma 17. Se formularon individualmente en el tampón basado en formamida sin ADN bloqueante humano para este cribado inicial como un conjunto para análisis como un ensayo de DISH. La sonda de oligonucleótidos de HER2 (15 µg/ml) y la sonda de oligonucleótidos del CHR17 (0,5 µg/ml) se formularon en el tampón basado en formamida sin ADN bloqueante humano. En modos de realización ilustrativos, la sonda del Chr17 comprende una o más de las secuencias enumeradas en la TABLA 3.

TABLA 3. Secuencias de la sonda del cromosoma 17

Nombre de oligo	Secuencias	Longitud
CHR17_M1.1 SEQ ID. NO: 3	AATTCGTTGGAAACGGGATAATTCAGCTGACTAAACAGAAGCA GTCTCAGAATCTTCTTTGTGATGTTTGCATTCAA	79
CHR17M2.1 SEQ ID. NO: 4	CTTCGTTTCGAAACGGGTATATCTTCACATGCCATCTAGACAGAA GCATCCTCAGAAGCTTCTCTGTGATGACTGCATTC	79
CHR17_M2.2 SEQ ID. NO: 5	TGAActCTCCTTTTGAGAGCGCAGTTTTGAACTCTCTTTCTGTGG CATCTGCAAGGGGACATGTAGACCTCTTTGAAG	79
CHR17_M3.1 SEQ ID. NO: 6	TTTCGTTGGAAACGGAATCATCTTCACATAAAAACTACACAGAT GCATTCTCAGGAACTTTTGGTGATGTTTGTATTC	79
CHR17_M5.1 SEQ ID. NO: 7	CCTATGGTAGTAAAGGGAATAGCTTCATAGAAAACTAGACAGA AGCATTCTCAGAAAATACTTTGTGATGATTGAGTTAAC	83
CHR17_M5.2 SEQ ID. NO: 8	CACAGAGCTGAACATTCCTTTGGATGGAGCAGGTTTGAGACACT CTTTTTGTACAATCTACAAGTGGATATTTGGACCTCTCTGAGG	87
CHR17_M8.2 SEQ ID. NO: 9	GTTTCACATTGCTTTTCATAGAGTAGTTCTGAAACATGCTTTTCGT AGTGTCTACAAGTGGACATTTGGAG	71
CHR17_M9.1 SEQ ID. NO: 10	CCTGTGGTGGAAAACGAATTATCGTCACGTAAAACTAGAGAGA AGCATTGTCAGAAA	58
CHR17_M9.2 SEQ ID. NO: 11	TGCATTCAACTCACAGAGTTGAAGGTTCCCTTTCAAAGAGCAGTT TCCAATCACTCTTTGTGTGG	65
CHR17_M11.2 SEQ ID. NO: 12	CATTCCCTTTGACAGAGCAGTTTGGAACTCTCTTTGTGTAGAAT CTGCAAGTGGAGATATGGACCGCTTT	71
CHR17_M12.1 SEQ ID. NO: 13	CCTATGGTAGTAAAGGAAATAGCTTCATATAAAAGCTAGACAGT AGCATTACAGAAAACCTTTGGTGACGACTGAGTTT	80
CHR17_M13.1 SEQ ID. NO: 14	ATTCGTTGGAAACGGGATAAACCGCACAGAACTAAACAGAAG CATTCTCAGAACCTTCTTCGTGATGTTTGCATTCAAC	80
CHR17_M16.1 SEQ ID. NO: 15	CGTAGTAAAGGAAATAACTTCCTATAAAAAGAAGACAGAAGCTT TCTCAGAAAATTCTTTGGGATGATTGAGTTGAACTC	80
CHR17_M16.2 SEQ ID. NO: 16	ACAGAGCTGAGCATTCTTGCATGTAGCAGTTTAGAAACACAC TTTCTGCAGAATCTGCAATTGCATATTTGGACCTT	80

C. Hibridación in situ de campo claro automatizada para portaobjetos de interfase

El sistema automatizado de procesamiento de portaobjetos BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona) se usó para el descubrimiento y la evaluación del rendimiento de los ensayos de ISH simples y duales de HER2 y/o CHR17 basados en oligonucleótidos monocatenarios para dianas de ADN de HER2 y CHR17. El protocolo de ensayo con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA aprobado por la FDA se usó para la tinción de tejidos. Se introdujo una modificación para tiempos de hibridación más cortos (es decir, 16 minutos, 32 minutos y 1 hora). En ciertos escenarios de prueba, las sondas de oligonucleótidos monocatenarias de HER2 y/o Chr17 se usaron en el dispensador de sonda INFORM HER2/Chr17 sobremarcado. Los reactivos para el ensayo con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA incluyen los cócteles de sondas de HER2 marcada con dinitrofenilo (DNP) y del Chr17 marcada con digoxigenina (DIG), los kits de detección ultraView SISH y ultraView Alkaline Phosphatase Red ISH (Ventana Medical Systems, Inc.). Los portaobjetos se desparafinaron a 69 °C, seguido de incubación con tampón citrato de pH 6 a 82 C y mediante digestión con proteasa 3 para ISH durante 20 minutos. La(s) sonda(s) se desnaturalizaron primero durante 8 minutos a 80 °C, luego se hibridaron durante un tiempo de preparación (6 horas es el valor predeterminado para el protocolo aprobado por la FDA) a 44 °C, seguido de 3 lavados en condiciones de rigurosidad con tampón citrato de pH 6,0 a 72 °C. Después de la aplicación de un conector de anticuerpo anti-DNP de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante, la hibridación específica de la sonda de HER2 unida a DNP con su diana se visualizó mediante un precipitado insoluble de cromógeno de plata. Después de la aplicación de un conector de anticuerpo antidigoxigenina de ratón marcado con fosfatasa alcalina, la visualización de la sonda del Chr17 unida a digoxigenina se detectó por el precipitado soluble del sistema cromogénico Fast Red basado en fosfatasa alcalina. Para visualizar la morfología completa del tejido, los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina durante 4 minutos y se tiñeron posteriormente con reactivo azul durante 4 minutos.

D. Tinción de ISH de campo claro automatizada en placas metafásicas de cromosomas

Los cromosomas metafásicos (CGH Metaphase Target Slides, Abbott Molecular) se reticularon por UV en Stratalinker 2400 (Stratagene Modelo n.º C00518) a un nivel de energía de 200 mJ. Luego se trataron con tripsina al 1 % (Sigma cat n.º T1426) a temperatura ambiente durante 5 s. Los portaobjetos se procesaron entonces para la tinción de ISH en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente, excepto que se omitieron las etapas de cocción, desparafinación, acondicionamiento celular y contratinción. Después de que la tinción se completa en el instrumento, los portaobjetos se tiñeron con Giemsa al 4 % (Gibco, cat. n.º 10092-03) diluido en tampón Gurr (Gibco, cat. n.º 10582-013) a temperatura ambiente durante 5 min, y se visualizó la tinción con un microscopio de luz regular.

E Criterios analíticos de puntuación de portaobjetos

Un anatomopatólogo con certificado de especialidad (P.B.) con experiencia en la interpretación de portaobjetos teñidos en DIHS para HER2/Chr17 revisó y puntuó los portaobjetos. Para cada portaobjetos se puntuó la intensidad de la señal y el fondo. Los criterios analíticos de puntuación de portaobjetos (TABLA 1) describen la tinción "aceptable" o "no aceptable". Los criterios de "aceptable" o "no aceptable" corresponden a la capacidad de si los pares de señales para HER2 o Chr17 son enumerables en 20 células en un portaobjetos. Los criterios de puntuación se desarrollaron y usaron como una herramienta analítica rigurosa para fines de optimización del ensayo.

F. Enumeración de señales de HER2 y Chr17

Una vez que se identificó un área diana adecuada, el lector registró las puntuaciones para los números de copias de HER2 y Chr17 que estaban presentes en 20 núcleos representativos. Si la proporción HER2/Chr17 resultante está dentro de 1,8-2,2, se recomienda que el lector puntué 20 núcleos adicionales y la proporción resultante se calcula a partir de los 40 núcleos totales. El estado del gen HER2 se notifica como no amplificado (HER2/Chr17 < 2,0) o amplificado (HER2/Chr17 > 2,0). Se hace referencia a la Guía de interpretación *Ventana INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay* para la divulgación relacionada con el ensayo.

G. Evaluación del rendimiento de la sonda de oligonucleótidos de HER2

La sonda de oligonucleótidos de HER2 hibrida más rápido. Se seleccionó un caso de mama con señal de HER2 débil mediante la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (protocolo aprobado por la FDA, hibridación durante 6 h). Los portaobjetos duplicados se tiñeron con sonda de oligonucleótidos de HER2 y sonda bc de HER2 (6,0 µg/ml cada una) en un tiempo de hibridación más corto (16, 32 y 60 min). Para la hibridación durante 16 min, la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 muestra una intensidad de las señales de HER2 de 1,0 y 1,5 (FIG. 3(A) y (C)), mientras que las intensidades de la tinción de la sonda bc de HER2 son 0,5 y 0,5 (FIG. 3(B) y (D)). Para la hibridación durante 32 min, la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 muestra una intensidad de las señales de HER2 de 1,5 y 1,5, mientras que la intensidad de la tinción de la sonda bc de HER2 es 1,0 y 1,5 (FIG. 3(A)). Para la hibridación durante 60 min, la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 muestra una intensidad de las señales de HER2 de 2,0 y 2,0, mientras que las intensidades de la tinción de la sonda bc de HER2 son 2,0 y 1,5 (FIG. 3(A)).

- 5 Para la hibridación durante 16 min, la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 muestra una cobertura de las señales de HER2 de un 40 % y 30 % (FIG. 3(B) y (C)), mientras que la cobertura de las señales de la tinción de la sonda bc de HER2 es un 5 % y un 20 % (FIG. 3(B) y (D)). Para la hibridación durante 32 min, la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 muestra una cobertura de las señales de HER2 de un 50 % y 50 %, mientras que la cobertura de las señales de la tinción de la sonda bc de HER2 es un 30 % y un 25 % (FIG. 3(B)). Para la hibridación durante 60 min, la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 muestra una cobertura de las señales de HER2 de un 55 % y 60 %, mientras que la cobertura de las señales de la tinción de la sonda bc de HER2 es un 50 % y un 50 % (FIG. 3(B)).
- 10 La sonda de oligonucleótidos de HER2 no mostró señales de fondo en todos los puntos temporales de hibridación analizados, mientras que la tinción de la sonda bc de HER2 tiene un fondo suave (0,75 y 0,25 a 32 min, y 0,25 y 0 a 60 min).
- 15 Para la hibridación durante 2 horas, la tinción de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA muestra una intensidad de las señales de HER2 de 2 y 2,5 y una cobertura de un 60 % y un 65 %. Para la hibridación durante 6 horas, la tinción de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA muestra una intensidad de las señales de HER2 de 2 y 2,5 y una cobertura de un 65 % y un 65 %. No se observó ningún fondo en estos portaobjetos.
- 20 Los datos anteriores sugieren que el oligonucleótido de HER2 hibrida más rápido que la sonda bc de HER2. Se demostró una mayor intensidad de señal y una mejor cobertura en los puntos temporales más tempranos del proceso de hibridación.
- 25 La tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 mostró una tinción favorable cuando se comparó con la sonda bc de HER2 a las mismas concentraciones (3, 6, 9 y 12 µg/ml, tiempos de hibridación (1 y 2 horas) y temperaturas de lavado rigurosas (68 °C, 70 °C y 72 °C). 6 µg/ml de sonda de oligonucleótidos de HER2 podrían lograr una tinción equivalente o mejor que 12 µg/ml de sonda bc de HER2.
- 30 La tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 (12,0 µg/ml) genera señales de forma regular con tamaños uniformes (FIG. 4(A)), mientras que la tinción de la sonda bc de HER2 (12,0 µg/ml) tiene una forma de señal irregular con tamaños diferentes (FIG. 4(B)). La sonda de oligonucleótidos de HER2 genera una señal de fondo mínima (FIG. 4(A)), mientras que la tinción de la sonda bc de HER2 tiene algo de fondo de formación de polvo nuclear (FIG. 4(B)). Dado que la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 demostró una señal de fondo mínima cuando se usa con intervalos de concentración normales, la expusimos a una concentración extremadamente alta (24 µg/ml). La tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 reveló un fondo parduzco que rodea el límite nuclear; sin embargo, este patrón de fondo no interfiere en la enumeración de la señal. La tinción de la sonda bc de HER2 a 24 µg/ml exhibió polvo nuclear que puede confundir señales específicas débiles con señales de fondo inespecíficas.
- 35 La tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 con hibridación durante 1 hora es lo suficientemente robusta para alcanzar el nivel de rendimiento de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas. En particular, se seleccionaron 109 tejidos de mama para la evaluación del rendimiento de la sonda de oligonucleótidos de HER2. Estas muestras se tiñeron primero con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (protocolo aprobado por la FDA, hibridación de 6 h) y mostraron una intensidad de tinción adecuada o "límitrofe" (2 es el valor de corte para aceptable, 1,5 es límitrofe). Esta preselección ayudó a eliminar los tejidos de baja calidad debido a las condiciones preanalíticas. Se considerados aptos 79 tejidos (72,5 %) según la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA. Véase la
- 40 TABLA 4.
- 45

TABLA 4.

109 casos de mama con tejido de calidad mínimamente adecuada	Hib 6 h con PMA para HER2	Hib 1 h, bc para HER2	Hib 1 h, oligo para HER2
N.º de tejidos aptos (%)	79 (72,5 %)	32 (29,3 %)	94 (86,2 %)

- 50 La tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 (12 µg/ml) con hibridación durante 1 h tuvo 94 (86,2 %) tejidos aptos, mientras que la sonda bc de HER2 con hibridación durante 1 h tuvo 32 (29,3 %) tejidos aptos (TABLA 4). Los datos sugieren que la tinción de la sonda de oligonucleótidos de HER2 es lo suficientemente robusta para alcanzar el nivel de rendimiento de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con una hibridación de 6 horas. Entre los 79 tejidos con una intensidad ≥ 2 con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (FIG. 5(A)), la sonda de oligonucleótidos de HER2 alcanzó un rendimiento comparable (77 aptos). Entre los 30 tejidos con una intensidad de 1,5 con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (FIG. 5(B)), la tinción de 17 tejidos se mejoró a una intensidad 2 (por lo tanto, aptos).

H. Evaluación del rendimiento de la sonda de oligonucleótidos del cromosoma 17

- 60 Selección de oligonucleótidos específicos del cromosoma 17

Cada uno de los 28 oligonucleótidos del cromosoma 17 (1,0 µg/ml) se tiñó en 2 tejidos de mama a una temperatura de lavado rigurosa de 70 °C y/o 72 °C. Se excluyeron catorce oligonucleótidos debido a las señales adicionales de reactividad cruzada, es decir, M4.5 (2,0 y 2,5), M6.1 (0 y 0,25), M6.2 (0,5 y 2,5), M7.2 (1,0 y 1,5), M8.1 (2,0 y 2,0), M10.1 (1,5 y 2), M10.2 (2 y 2,5), M11.1 (0 y 2), M14.1 (0,75 y 1,0), M14.2 (1,5 y 1,5), M15.1 (0 y 0,25) y M15.2 (2,0 y 2,0) (FIG. 6(B)). La FIG. 6(D) es un ejemplo de un portaobjetos teñido de M11.2, se presentan de una a dos señales específicas de chr17 con una intensidad adecuada en cada célula. La FIG. 6(C) muestra un ejemplo de portaobjetos teñido de M7.2, se observaron señales adicionales de reactividad cruzada apenas visibles además de las señales específicas de chr17 principales en las células. Se excluyeron dos oligonucleótidos por las señales extremadamente débiles, es decir, M1.2 (0,25 y 0,25) y M2.2 (0 y 0,25) (FIG. 6 (A)). Se seleccionaron un total de 14 oligonucleótidos (M1.1, M2.1, M2.2, M3.1, M5.1, M5.2, M8.2, M9.1, M9.2, M11.2, M12.1, M13.1, M16.1 y M16.2) en el conjunto de la sonda de oligonucleótidos del Chr17 como se detalla en el presente documento.

Se seleccionaron 15 tejidos de mama para la evaluación del rendimiento de la sonda de oligonucleótidos del Chr17. La tinción del cromosoma 17 se realizó antes con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (protocolo aprobado por la FDA, hibridación de 6 h). Las señales del cromosoma 17 en estas muestras (portaobjetos duplicados cada uno) varían de intensidades potentes a débiles (escala de 0-3), la tinción de la sonda de oligonucleótidos del Chr17 (0,5 µg/ml) con hibridación de 1 hora tiene una intensidad de tinción ($2,60 \pm 0,61$ frente a $2,54 \pm 0,84$, $p > 0,05$, FIG. 7(A)), cobertura ($70,50 \pm 14,46$ frente a $66,93 \pm 24,61$, $p > 0,05$, FIG. 5B) y fondo ($0,04 \pm 0,16$ frente a $0,02 \pm 0,07$, $p > 0,05$, FIG. 7(C)) comparables a los de la sonda de PMA del Chr17. Todas las tinciones de Chr17 no aceptables se deben a una intensidad de señal de Chr17 inadecuada, entran las cuales 2 fallaron por la sonda de oligonucleótidos del Chr17 y 5 por la sonda de PMA del Chr17 (FIG. 7(D)). Los datos sugieren que la tinción de la sonda de oligonucleótidos del Chr17 con hibridación durante 1 h es suficientemente robusta para alcanzar el nivel de rendimiento de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h.

Caracterización analítica del ensayo de DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17

Se analizó la especificidad analítica de DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 en placas metafásicas de cromosomas. La sonda de oligonucleótidos de HER2 (señal negra) y la sonda de oligonucleótidos del CHR17 (señal roja) se localizaron en el mismo cromosoma. No se observó hibridación cruzada de la sonda de HER2 o la sonda del CHR17 con otros cromosomas (FIG. 8).

Se realizó la prueba funcional sobre el número mínimamente requerido de oligonucleótidos de HER2. Se sometieron a prueba funcional un 48, 72 y 100 % del número total (1196) de oligonucleótidos de HER2 en 30 portaobjetos de 5 casos de mama. Todos los portaobjetos fueron aptos con la tinción de HER2 (con los criterios de intensidad > 2). Un 48 % de 1196 oligonucleótidos de HER2 tenían una intensidad de HER2 de $2,00 \pm 0$, un 72 % tenía una intensidad de HER2 de $2,45 \pm 0,16$, y un 100 % tenía una intensidad de HER2 de $2,75 \pm 0,35$. Un 100 % (1196 oligonucleótidos) tuvo la tinción de HER2 más potente en comparación con los de un 48 % y 72 % ($p < 0,05$). Un 48 % de 1196 oligonucleótidos de HER2 tenía una cobertura de HER2 de $69,00 \pm 4,60$, un 72 % tenía una cobertura de HER2 de $73,50 \pm 2,42$ y un 100 % tenía una cobertura de HER2 de $77,50 \pm 5,89$. Un 100 % (1196 oligonucleótidos) tenía una cobertura de tinción de HER2 significativamente mayor que los de un 48 % ($p < 0,05$) (FIG. 9).

Se realizó la prueba funcional de la evolución temporal (1, 2 y 6 h) de los oligonucleótidos de Her2 del conjunto completo (1196). En los oligonucleótidos de Her2 del conjunto completo (1196) se sometió a prueba la hibridación durante 1, 2 y 6 horas en 16 portaobjetos de 4 casos de mama. La tinción de los oligonucleótidos de HER2 con hibridación durante 1 h logró un rendimiento de tinción comparable a la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas. No encontramos un vínculo sistemático entre los tiempos de hibridación más prolongados (por ejemplo, 2 y 6 h) y la intensidad de tinción mejorada (FIG. 10).

Se realizó un estudio de equivalencia de DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora en tejidos de mama individuales para comparar la idoneidad de la tinción en comparación con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Se seleccionaron 89 tejidos de mama para la evaluación del rendimiento de DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17. Similar a lo anterior, estas muestras demostraron una intensidad de tinción adecuada o "límitrofe", es decir, intensidad de señal de HER2 $> 1,5$, intensidad de señal de CHR17 $> 1,5$ en al menos un portaobjetos teñido por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Esta preselección ayudó a eliminar los tejidos de baja calidad debido a las condiciones preanalíticas. Se considerados "aptos" 128 portaobjetos (128/146, 85,5 %) para la tinción de HER2 por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 1 h, mientras que 156 portaobjetos (156/174, 87,67 %) se consideraron aptos para la tinción de HER2 por DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora ($p = 0,578$). Se consideraron aptos 103 portaobjetos (103/149, 69,13 %) para la tinción de CHR17 por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas, mientras que 129 portaobjetos (129/175, 73,71 %) se consideraron aptos para la tinción de CHR17 por DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora ($p = 0,363$). No se encontraron diferencias significativas para la tinción de HER2 y CHR17 entre los dos ensayos. Mientras que no se encontraron artefactos de secado de portaobjetos o moteado severo para DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h, 6 portaobjetos teñidos por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h no fueron aptos para evaluación debido a un fondo

de moteado severo, y 5 portaobjetos teñidos por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h no fueron aptos por secado de portaobjetos (11/175, 6,3 %). Véase la TABLA 5.

TABLA 5.

5

	Señal de HER2			Significación
	Apto a la 1. ^a	No apto	Tasa de aptos	
DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/Chr17	156	18	87,67 %	$p = 0,578$
Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA	128	18	85,50 %	

	Señal de CHR17			Significación
	Apto a la 1. ^a	No apto	Tasa de aptos	
DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/Chr17	129	46	73,71 %	$p = 0,363$
Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA	103	46	69,13 %	

Artefactos	Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA	DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/Chr17
Moteado (Fondo 2, no apto)	6	0
Portaobjetos (no apto)	5	0

10 La FIG. 11(A) es un ejemplo de tinción en el Caso n.º 709. La tinción en ISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tuvo una intensidad de HER2 de 2,5, una cobertura de un 70 %, un fondo de 0; una intensidad de Chr17 de 2,5, una cobertura de un 70 % y un fondo 0; mientras que la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tuvo una intensidad de HER2 de 1, una cobertura de un 40 %, un fondo de 0; Chr17: intensidad 1, cobertura 35 %, fondo 0. En las áreas del estroma rodeadas por un círculo, la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tenía falta de tinción; por lo tanto, la intensidad de tinción de HER2 y CHR17 se asignó como 1. Los datos sugieren que el rendimiento de tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora es comparable al de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas. La tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tiene una incidencia menor de fallo de tinción (es decir, moteado severo y secado de portaobjetos) que la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h.

20 Concordancia del estado del gen HER2 entre la tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h y la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h

25 Se seleccionaron para enumeración de señales 63 casos con portaobjetos emparejados de intensidad ≥ 2 tanto para HER2 como para CHR17 mediante DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora y con sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Cincuenta (50) casos se diagnosticaron como "sin amplificación de HER2" tanto mediante tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h como mediante tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Doce (12) casos se diagnosticaron como "con amplificación de HER2" tanto mediante tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h como mediante tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Un caso (ILS32554) se diagnosticó como "con amplificación de HER2" mediante tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h (proporción HER2/Chr17: 2,08), mientras que la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h no está amplificada (proporción HER2/Chr17: 1,92). El porcentaje de concordancia positiva (PPA) es de un 100 % (IC del 95 % para la puntuación: 77,1-100 %) y el porcentaje de concordancia negativa (PNA) es de un 98,04 % (IC del 95 % para la puntuación: 92,7-98,0 %). El porcentaje del coeficiente de variación (% CV) de los recuentos de señales no agrupadas (para HER2 y CHR17) de los portaobjetos emparejados es de $5,66 \pm 4,84$ (< 20 % como aceptable). Véase la TABLA 6.

35

TABLA 6

DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17	Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA		
	Amplificado	No amplificado	Total
Amplificado	12	1*	12
No amplificado	0	50	51
Total	12	51	63

*ILS32554: PMA 1,92, Oligonucleótido 2,08

	<i>n/N</i>	% (IC del 95 % para la puntuación)
Porcentaje de concordancia positiva (PPA)	12/12	100 (77,1-100)
Porcentaje de concordancia negativa (PNA)	50/51	98,04 (92,7-98,0)

5

10

15

La FIG. 11(B) es un ejemplo de tinción en el Caso n.º 731. La tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenía una intensidad de HER2 de 3, una cobertura de un 80 %, un fondo de 0; Chr17: intensidad 2,5, cobertura 75 %, fondo 0; recuento para HER2: 46, recuento para Chr17: 34, proporción: 1,35; mientras que la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tuvo una intensidad de HER2 de 3, una cobertura de un 80 %, un fondo de 0,5; intensidad de CHR17 de 3, cobertura de un 80 %, fondo de 0. Ambas tinciones generaron recuentos de señales de HER2 y CHR17 similares y, por lo tanto, una proporción HER2/CHR17 similar. Se observó fondo de polvo de plata en las tinciones con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Los datos sugieren que la tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h y la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tienen una alta concordancia en los diagnósticos del estado del gen HER2.

20

25

30

35

40

Se completó una evaluación de la robustez de los dos ensayos en una cohorte de micromatrices de tejidos (TMA) que no se preseleccionaron por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h. Noventa y cinco (95) núcleos de tejido de mama en un portaobjetos de TMA se tiñeron con DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h y sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h para la evaluación de la robustez del ensayo en estos tejidos sin la información de las condiciones preanalíticas y la calidad del tejido. Este estudio fue diseñado para evaluar la robustez del ensayo, ya que los tejidos de TMA archivados generalmente se consideran muestras difíciles para el ensayo de ISH. La DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenía 73 núcleos (76,8 %) teñidos con intensidad para HER2 de 2 y superior, mientras que la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tenía 57 núcleos (60,0 %) teñidos con intensidad para HER2 de 2 y superior. La diferencia entre los dos ensayos sobre la intensidad de HER2 alcanza una significación cercana a un IC del 90 % ($p = 0,011$). La DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenía 53 núcleos (55,8 %) teñidos con intensidad de CHR17 de 2 y superior, mientras que la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tenía 35 núcleos (36,80 %) teñidos con intensidad de CHR17 de 2 y superior. La diferencia entre los dos ensayos sobre la intensidad de CHR17 alcanza una significación cercana a un IC del 90 % ($p = 0,012$). Los portaobjetos teñidos en DISH con la sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenían una intensidad de HER2 de $1,89 \pm 0,76$, mientras que los portaobjetos teñidos con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas una intensidad de HER2 de $1,58 \pm 0,76$ ($p = 0,005$). Los portaobjetos teñidos en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenían una intensidad de CHR17 de $1,49 \pm 0,83$, mientras que los portaobjetos teñidos con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h una intensidad de CHR17 de $1,04 \pm 0,87$ ($p = 0,000$). El fondo tanto para DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h ($0,11 \pm 0,18$) como para la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h ($0,04 \pm 0,11$) es muy bajo con respecto al nivel aceptable (< 2). Véase la TABLA 7.

TABLA 7.

Número de portaobjetos a un nivel de intensidad de señal dado

Nivel de intensidad	Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (hib 6 h)	DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 (hib 1 h)	Significación	Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (hib 6 h)	DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 (hib 1 h)	Significación
	Señal de HER2	Señal de HER2		Señal de CHR17	Señal de CHR17	
3	0	5		0	0	
2,5	10	28		4	16	
2	47	40		29	36	
1,5	16	2		11	9	
1	3	10		4	7	
0,5	8	4		21	18	
0	11	6		26	9	
Núcleos de tejido totales	95	95		95	95	
Porcentaje de núcleos de tejido aptos	60,0 % (57/95)	76,8 % (73/95)	$p = 0,011$	35/95 (36,8 %)	53/95 (55,8 %)	$p = 0,012$

5

Puntuaciones de tinción de HER2 y CHR17

	Sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA (hib 6 h)	DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 (hib 1 h)	Significación
Intensidad de HER2	1,58 ± 0,78	1,89 ± 0,76	$p = 0,005$
Fondo de HER2	0,04 ± 0,11	0,11 ± 0,18	$p = 0,001$
Intensidad de CHR17	1,04 ± 0,87	1,49 ± 0,83	$p = 0,000$
Fondo de CHR17	0	0	ND

10

Los datos sugieren que la DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 hora tiene una tinción más potente en tejidos difíciles que la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas.

15

20

25

Además de someterse a prueba en tejidos de mama, también se demostró la viabilidad de DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h en tejidos de pulmón (FIG. 12(A) que muestra la sonda monocatenaria y FIG. 12(B) que muestra la sonda bicatenaria) y gástricos (FIG. 13(A) que muestra la sonda monocatenaria y FIG. 13(B) que muestra la sonda bicatenaria). Además, se sometió a prueba la DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h en portaobjetos duplicados de 10 tejidos de pulmón y 10 tejidos gástricos. La DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tiene un 65 % de aptos para HER2 y un 50 % de aptos para CHR17 (basado en criterios de intensidad ≥ 2), similar a un 55 % de aptos para HER2 y un 50 % para CHR17 de la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h ($p = 0,516$ para HER2 y $p = 1,000$ para CHR17). La FIG. 12(A) - (B) es un ejemplo de tinción en el Caso n.º F101411A1. La tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenía una intensidad de HER2 de 3, una cobertura de un 80 %, un fondo de 0; Chr17: intensidad 3,0, cobertura 80 %, fondo 0; mientras que la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tuvo una intensidad de HER2 de 3, una cobertura de un 80 %, un fondo de 0,5; intensidad de CHR17 de 3, cobertura de un 80 %, fondo de 0. Se observó algo de fondo de plata en el tejido teñido por la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h.

30

Elegimos 10 casos de tejido gástrico que se tiñeron adecuadamente con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 horas. Los portaobjetos duplicados para cada caso se tiñeron con DISH con sonda de

oligonucleótidos de HER2/CHR17 DISH con hibridación durante 1 hora. Dieciocho (18) portaobjetos teñidos con DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 fueron aptos (basado en criterios de intensidad > 2). En 2 casos, uno de los portaobjetos duplicados tenía una tinción inadecuada por DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h. La FIG. 13(A) - (B) es un ejemplo de tinción en el Caso n.º I-5189-C8a. La tinción en DISH con sonda de oligonucleótidos de HER2/CHR17 con hibridación durante 1 h tenía una intensidad de HER2 de 3, una cobertura de un 80 %, un fondo de 0; Chr17: intensidad 3.0, cobertura 80 %, fondo 0; mientras que la tinción con la sonda INFORM HER2 DUAL ISH DNA con hibridación durante 6 h tuvo una intensidad de HER2 de 2,5, una cobertura de un 70 %, un fondo de 0,5; intensidad de CHR17 de 2,5, cobertura de un 75 %, fondo de 0.

10 **Ejemplo 2**

El ejemplo 2 compara el plásmido p17H8 y la sonda de oligonucleótidos del CHR17 de 42-meros (y determina la compatibilidad de la sonda de oligonucleótidos del CHR17 de 42-meros con la sonda de oligonucleótidos de HER2).

15 Plásmido p17H8 (PMA): La sonda de plásmido p17H8 contiene esta secuencia completa. Hay 16 repeticiones de la secuencia de 166 pb. Esta sonda requiere ADN de placenta humana porque da una señal débil por hibridación cruzada con otros cromosomas.

20 Oligonucleótidos (42-meros) de CHR17: La sonda de oligonucleótidos del CHR17 de 42-meros (Ventana P/N: 90682, 10760, 95221) tiene buena especificidad para CHR17, no requiere ADN de placenta humana, pero las condiciones de hibridación óptimas son diferentes de las de la sonda 2 de HER2 (producto INFORM aprobado por la FDA, elaborado a partir de productos de PCR). Su compatibilidad con la sonda de oligonucleótidos de HER2 se evalúa a continuación.

25 Condiciones de ensayo fijas: StdCC2, P3 20 min, desnaturalización 8 min, detección de plata y rojo 8 min, H+E 8 min.

Condiciones que se someten a prueba:

- 30 (1) Concentraciones de oligonucleótido de Chr17 (42 -meros): 0,35 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1,5 µg/ml y 3,0 µg/ml.
- (2) Temperaturas de hibridación: 42 °C, 44 °C y 46 °C.
- (3) Tiempo de hibridación: 1 h, 2 h y 6 h.
- 35 (4) Temperaturas de lavado riguroso: 54°C, 59°C y 65°C.
- (5) Concentración de formamida en el tampón de hibridación: 22,8 % y 33,2 %.

40 Resultados: La FIG. 14(A) muestra una tinción débil de la sonda de oligonucleótidos del CHR17 de 42-meros (las condiciones fueron las siguientes: oligonucleótido de Chr17 (42-meros) 0,75 µg/ml, 46 °C y 6 h de hib (hibridación), lavado riguroso a 59 °C, concentración de formamida: 33,2 %). La FIG. 14(B) muestra que la tinción de Chr17 (42-meros) es más débil que con PMA con formamida al 33,2 %. Aumentar la concentración y el tiempo de hibridación no aumentó la señal. (Las condiciones incluyeron un lavado riguroso a 59 °C, formamida al 33,2 %). La FIG. 14(C) muestra que la formamida al 22,8 % dio una mejor señal de CHR17, pero aún era más débil que con PMA. El aumento de la concentración y del tiempo de hibridación no aumentó la intensidad de la señal. No se observó fondo con lavado riguroso a 59 °C. Sin embargo, la formamida al 22,8 % no es óptima para IHS con oligonucleótidos de HER2 (no compatible). La FIG. 14(D) muestra que la temperatura de lavado riguroso para el oligonucleótido de CHR17 (42-meros) no es compatible con el oligonucleótido de HER2 (68 °C-72 °C); una temperatura rigurosa de 65 °C redujo las señales de CHR17.

50 En resumen, la sonda de oligonucleótidos del CHR17 de 42 meros genera una señal específica, y las concentraciones de 0,75 y 1,5 µg/ml durante 1 h ofrecen la mejor tinción. Sin embargo, la tinción es más débil que con el control de PMA. El aumento de la concentración y del tiempo de hibridación no mejoró la intensidad de la señal. Las condiciones del ensayo de hibridación para la sonda de oligonucleótidos del CHR17 de 42-meros no son compatibles con las de la sonda de oligonucleótidos de HER2: el intervalo óptimo de temperaturas de lavado riguroso para el oligonucleótido de HER2 es de 68 °C-72 °C; y la disminución de la intensidad de tinción del oligonucleótido del CHR17 (42-meros) se vuelve obvia cuando la temperatura sube a 65 °C.

60 Aunque se han analizado anteriormente una serie de aspectos y modos de realización ejemplares, los expertos en la técnica reconocerán ciertas modificaciones, permutaciones, adiciones y subcombinaciones de las mismas que están presentes en la divulgación.

ES 2 689 568 T3

TABLA 8. Secuencias

SEQ ID. NO: 1	TCTCGTCTCGGCCCGACCTGCGTCCTGGGCCCGCAGGGGAGTCCTGCC CCATGCTCCCGGGCGGGGCCGCCCTGTGCCCT
SEQ ID. NO: 2	TATTTTATTTTAATTCGTTGGAAACGGGATAATTTTCAGCTGACTAAACAGA AGCAGTCTCAGAATCTTCTTTGTGATGTTTGCATTCAA
SEQ ID. NO: 3 CHR17_M1.1	AATTCGTTGGAAACGGGATAATTTTCAGCTGACTAAACAGAAGCAGTCTCAGA ATCTTCTTTGTGATGTTTGCATTCAA
SEQ ID. NO: 4 CHR17_M2.1	CTTCGTTGAAACGGGTATATCTTCACATGCCATCTAGACAGAAGCATCCTCA GAAGCTTCTCTGTGATGACTGCATTC
SEQ ID. NO: 5 CHR17_M2.2	TGAACTCTCCTTTTGAGAGCGCAGTTTTGAAACTCTCTTTCTGTGGCATCTGCA AGGGGACATGTAGACCTCTTTGAAG
SEQ ID. NO: 6 CHR17_M3.1	TTTCGTTGGAAACGGAATCATCTTCACATAAAAACTACACAGATGCATTCTCA GGAACTTTTGGTATGTTTGTATTC
SEQ ID. NO: 7 CHR17_M5.1	CCTATGGTAGTAAAGGGAATAGCTTCATAGAAAACTAGACAGAAGCATTCT CAGAAAATACTTTGTGATGATTGAGTTAAC
SEQ ID. NO: 8 CHR17_M5.2	CACAGAGCTGAACATTCCTTTGGATGGAGCAGGTTTGAGACACTCTTTTGT CAATCTACAAGTGGATATTTGGACCTCTCTGAGG
SEQ ID. NO: 9 CHR17_M8.2	GTTTCACATTGCTTTTCATAGAGTAGTTCTGAAACATGCTTTTCGTAGTGTCTAC AAGTGGACATTTGGAG
SEQ ID. NO: 10 CHR17_M9.1	CCTGTGGTGGAAAACGAATTATCGTCACGTAAAACTAGAGAGAAGCATTGT CAGAAA
SEQ ID. NO: 11 CHR17_M9.2	TGCATTCAACTCACAGAGTTGAAGGTTCTTTTCAAAGAGCAGTTTCCAATCA CTCTTTGTGTGG
SEQ ID. NO: 12 CHR17_M11.2	CATTCCCTTTGACAGAGCAGTTTGAAACTCTCTTTGTGTAGAATCTGCAAGT GGAGATATGGACCGCTTT
SEQ ID. NO: 13 CHR17_M12.1	CCTATGGTAGTAAAGGGAATAGCTTCATATAAAAGCTAGACAGTAGCATTCA CAGAAAACCTTTGGTGACGACTGAGTTT
SEQ ID. NO: 14 CHR17_M13.1	ATTCGTTGGAAACGGGATAAACCGCACAGAACTAAACAGAAGCATTCTCAG AACCTTCTTCGTGATGTTTGCATTCAAC
SEQ ID. NO: 15 CHR17_M16.1	CGTAGTAAAGGAAATAACTTCCTATAAAAAGAAGACAGAAGCTTTCTCAGAA AATTCTTTGGGATGATTGAGTTGAACTC
SEQ ID. NO: 16 CHR17_M16.2	ACAGAGCTGAGCATTCTTGCGATGTAGCAGTTTAGAAACACACTTTCTGCA GAATCTGCAATTGCATATTTGGACCTT

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Ventana Medical Systems, Inc.	
5	<120>	Sondas de oligonucleótidos monocatenarias para enumeración de copias de cromosomas o genes	
	<130>	P32027-WO	
10	<150>	US61/943196	
	<151>	21/02/2014	
	<150>	US62/094543	
	<151>	19/12/2014	
15	<160>	16	
	<170>	PatentIn versión 3.5	
20	<210>	1	
	<211>	82	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	1	
		tctcgtctcg gcccccgacc tgcgtcctgg gccgcaggg gagtcctgcc ccattgctccc	60
25		gggcggggcc gccctgtgcc ct	82
	<210>	2	
	<211>	91	
	<212>	ADN	
30	<213>	Homo sapiens	
	<400>	2	
		tatttttatt ttaattcgtt ggaaacggga taatttcagc tgactaaaca gaagcagtct	60
		cagaatcttc tttgtgatgt ttgcattcaa a	91
35	<210>	3	
	<211>	79	
	<212>	ADN	
40	<213>	Homo sapiens	
	<400>	3	
		aattcgttgg aaacgggata atttcagctg actaaacaga agcagtctca gaatcttctt	60
45		tgtgatgttt gcattcaaa	79
	<210>	4	
	<211>	79	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
50	<400>	4	
		cttcgttcga aacgggtata tcttcacatg ccattctagac agaagcatcc tcagaagctt	60
		ctctgtgatg actgcattc	79
55	<210>	5	
	<211>	79	
	<212>	ADN	

ES 2 689 568 T3

	<213> Homo sapiens		
	<400> 5		
	tgaactctcc ttttgagagc gcagttttga aactctcttt ctgtggcattc tgcaaggga		60
	catgtagacc tctttgaag		79
5	<210> 6		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 6		
	tttcggttga aacggaatca tcttcacata aaaactacac agatgcattc tcaggaactt		60
	tttggtgatg tttgtattc		79
15	<210> 7		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 7		
	cctatggtag taaaggaat agcttcatag aaaaactaga cagaagcatt ctcagaaaat		60
20	acttttgtgat gattgagttt aac		83
	<210> 8		
	<211> 87		
	<212> ADN		
25	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	cacagagctg aacattcctt tggatggagc aggtttgaga cactcttttt gtacaatcta		60
	caagtggata tttggacctc tctgagg		87
30	<210> 9		
	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 9		
	gtttcacatt gcttttcata gagtagttct gaaacatgct tttcgtagtg tctacaagtg		60
	gacatttgga g		71
	<210> 10		
	<211> 58		
40	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 10		
	cctgtggtgg aaaacgaatt atcgtcacgt aaaaactaga gagaagcatt gtcagaaa		58
45	<210> 11		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 11		

ES 2 689 568 T3

	tgcattcaac tcacagagtt gaaggttctt tttcaaagag cagtttccaa tcaactctttg	60
	tgtgg	65
	<210> 12	
	<211> 71	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	cattcccttt gacagagcag tttggaaact ctctttgtgt agaatctgca agtggagata	60
	tggaccgctt t	71
10	<210> 13	
	<211> 80	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 13	
	cctatggtag taaaggaaat agcttcatat aaaagctaga cagtagcatt cacagaaaac	60
	tcttggtgac gactgagttt	80
	<210> 14	
20	<211> 80	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 14	
	atttcgttgg aaacgggata aaccgcacag aactaaacag aagcattctc agaaccttct	60
25	tcgtgatggt tgcattcaac	80
	<210> 15	
	<211> 80	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 15	
	cgtagtaaag gaaataactt cctataaaaa gaagacagaa gctttctcag aaaattcttt	60
	gggatgattg agttgaactc	80
35	<210> 16	
	<211> 79	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 16	
	acagagctga gcattccttg cgatgtagca gtttagaaac acactttctg cagaatctgc	60
	aattgcatat ttggacctt	79

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la detección *in situ* de una región de control del cromosoma humano 17, comprendiendo dicho sistema:
- 5 un conjunto de dos o más sondas de control monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control del satélite alfa del cromosoma humano 17, en el que X = 2-14, las sondas de control están marcadas cada una con al menos un primer marcador, en el que cada sonda de control comprende:
- 10 - una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3-16; o
- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 3-16, siendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 3-16; o
- 15 - una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 3-16, o complementos de la misma.
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que cada sonda de control comprende:
- 20 - una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 3-16, siendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 3-16; o
- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 3-16, o
- 25 - complementos de la misma.
3. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las sondas de control comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos.
- 30 4. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las sondas de control se dirigen contra entre 2 y 14 partes distintas dentro de la región de control.
5. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las sondas de control están marcadas cada una con al menos 2, al menos 3, al menos 4, o al menos 5 primeros marcadores.
- 35 6. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el al menos un primer marcador comprende un hapteno.
- 40 7. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una sonda diana específica para una región diana del cromosoma humano 17, en el que la sonda diana está marcada con al menos un segundo marcador.
- 45 8. El sistema de la reivindicación 7, en el que la sonda diana es específica para una región diana cerca o alrededor del locus del gen HER2, o en la que la sonda diana es específica para una región entre los nucleótidos 35 027 979 y 35 355 516 del cromosoma humano 17.
9. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además un instrumento de tinción de ISH, estando configurado el instrumento para poner en contacto la sonda de control con una muestra de tejido.
- 50 10. Un kit que comprende un recipiente que contiene un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. Un portaobjetos que comprende una pluralidad de núcleos teñidos cromogénicamente para el cromosoma 17, en el que el portaobjetos se prepara usando un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 55 12. Un procedimiento para la hibridación *in situ* de una muestra de tejido, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra de tejido con un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 60 13. Un procedimiento para hibridación *in situ* dual de campo claro que comprende:
- poner en contacto una muestra de tejido con un conjunto de dos o más sondas de control monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control del satélite alfa del cromosoma humano 17, en el que X = 2-14, en el que cada sonda de control está marcada con al menos un primer marcador y comprende:
- 65 - una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3-16; o

ES 2 689 568 T3

- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 3-16, siendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 3-16; o
- 5
- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 3-16, o
 - complementos de la misma;
- 10
- poner en contacto la muestra de tejido con una sonda diana monocatenaria específica para una región diana cerca o alrededor del locus del gen HER2 del cromosoma humano 17, marcándose la sonda diana con al menos un segundo marcador;
- 15
- hibridar las sondas en condiciones durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 3 horas;
- enjuagar la muestra para eliminar la sonda no unida; y
- teñir la muestra para detectar las sondas hibridadas.
- 20
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la muestra se tiñe con un primer color cromogénico para detectar las sondas de control y un segundo color cromogénico distinto para detectar la sonda diana específica para una región diana cerca o alrededor del locus del gen HER2 del cromosoma humano 17.
- 25
15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14, en el que las sondas hibridan en condiciones durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 2 horas, opcionalmente en el que las sondas hibridan en condiciones durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 1 hora.
- 30
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la muestra de tejido es una muestra de tejido incluida en parafina y fijada en formol (FFPE).
- 35
17. Un procedimiento de puntuación para un cromosoma para el número de copias del gen HER2, comprendiendo dicho procedimiento:
- obtener una muestra de tejido que se ha sometido a hibridación *in situ* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que se usa una sonda de control específica para el cromosoma humano 17 y una sonda diana específica para HER2;
- identificar un área de núcleos neoplásicos con la mayoría de los números de copias; y
- 40
- contar señales enumerables para la señal de HER2 en al menos 20 núcleos; y
- calcular la proporción de la señal de HER2 con respecto a la señal del cromosoma 17 (proporción HER2/CHR17).
- 45
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que si la proporción HER2/CHR17 está dentro de 1,8-2,2, entonces las señales enumerables se cuentan en 20 núcleos adicionales y la proporción HER2/CHR17 se calcula a partir de los 40 núcleos totales.
- 50
19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que una proporción HER2/CHR17 de menos de 2,0 se considera no amplificada y una proporción de HER2/CHR17 mayor que o igual a 2,0 se considera amplificada.
20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 que comprende además calcular el número promedio de copias de HER2 por núcleo.

5'-T[DNP]CTCGTCTCGGCCCGACCT
 [DNP]GCGTCCTGGGCCCGCAGGGG[DNP]
 AGTCCTGCCCATGCTCCCG[DNP]
 GGCGGGGCCGCCCTGTGCC[DNP]T-3'

FIG. 1(A)

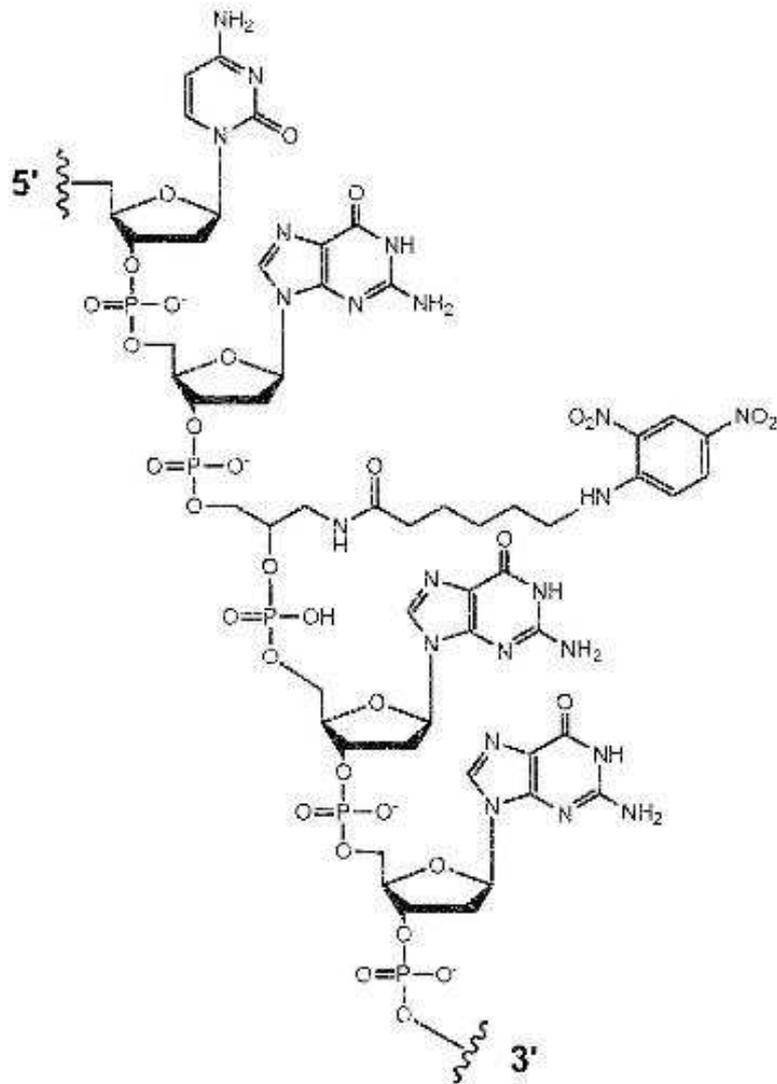


FIG. 1(B)

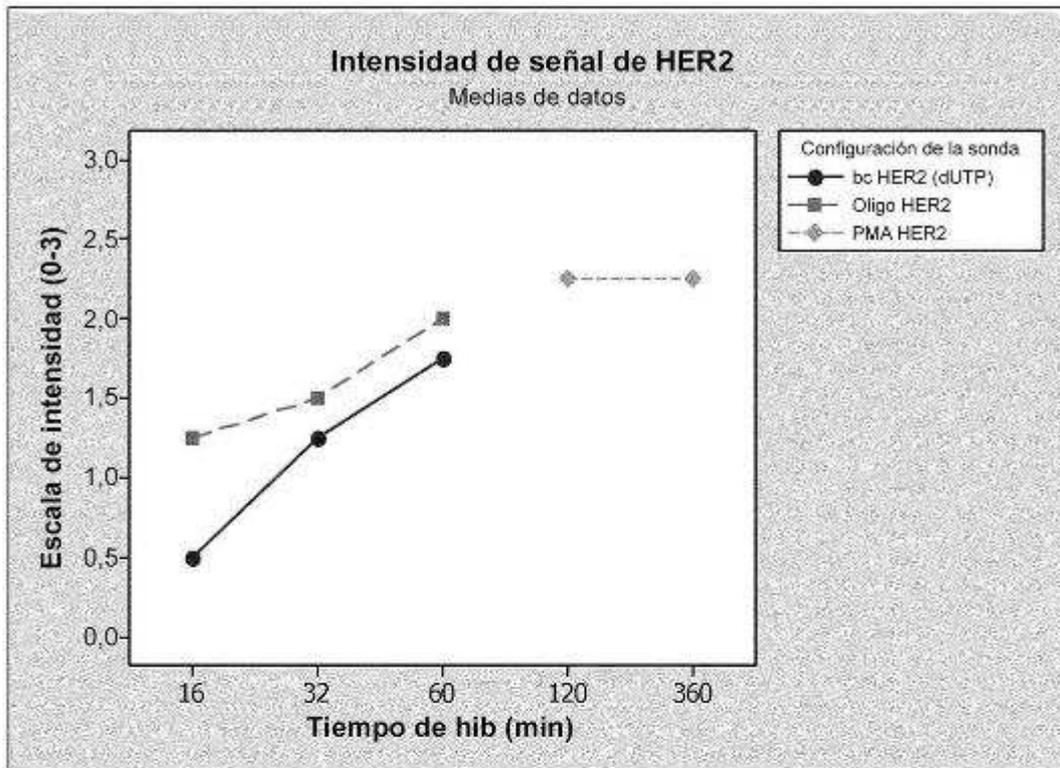


FIG. 3(A)

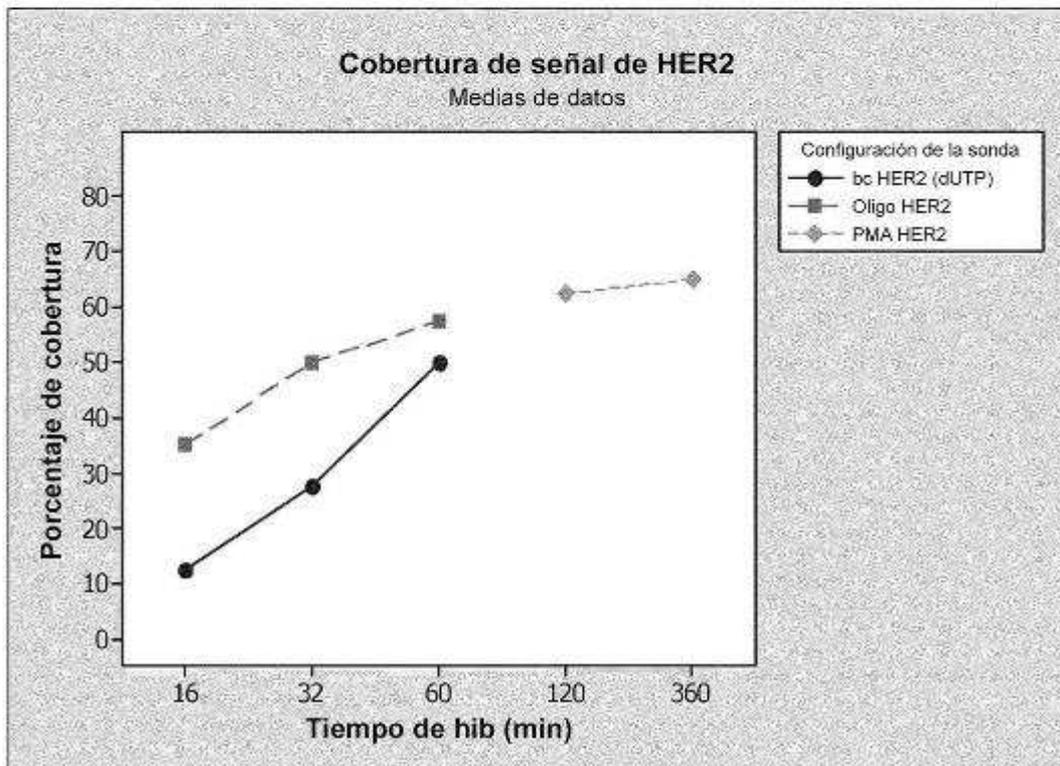
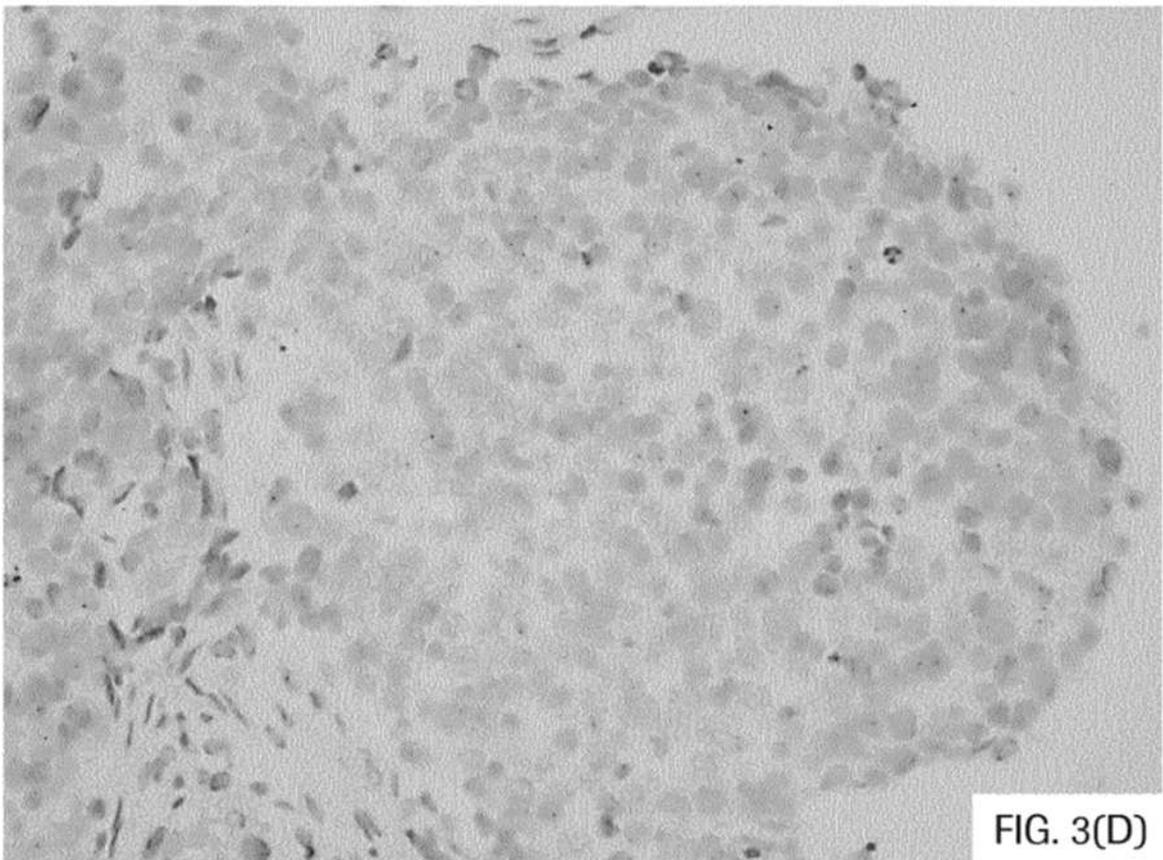
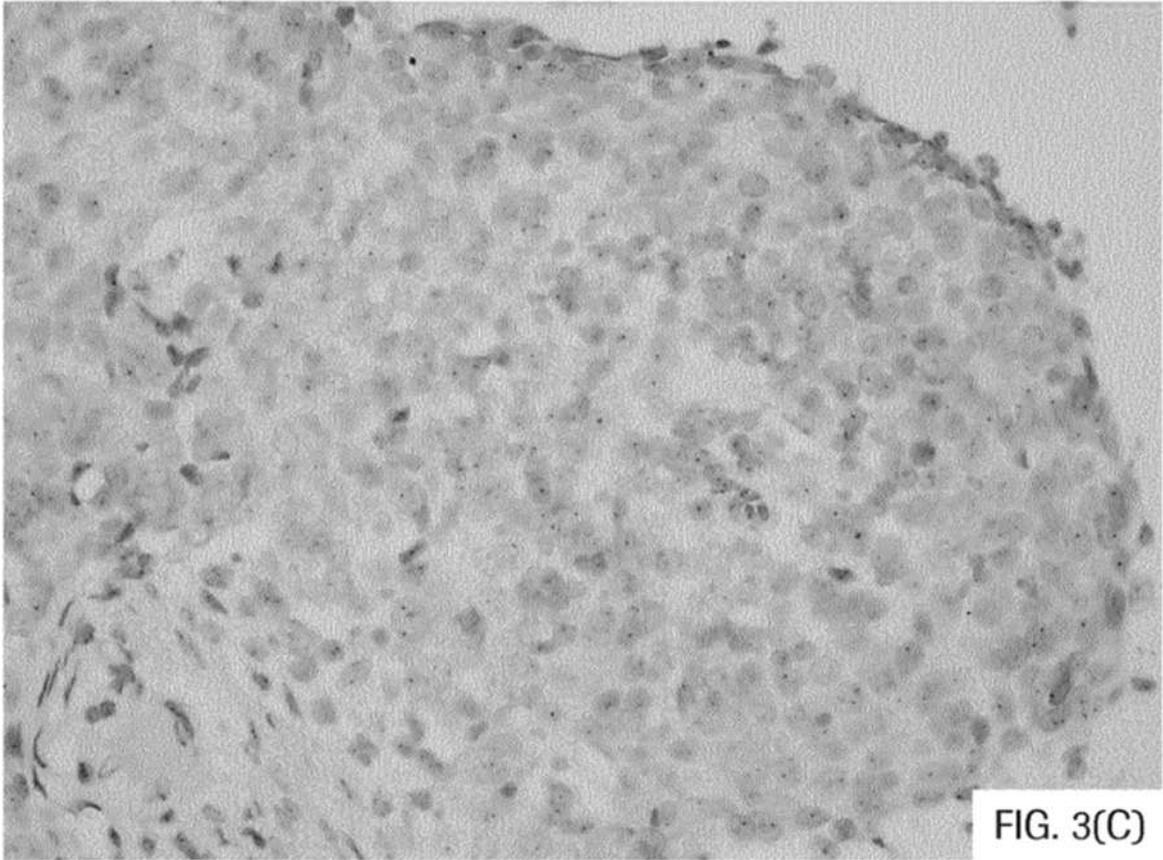


FIG. 3(B)



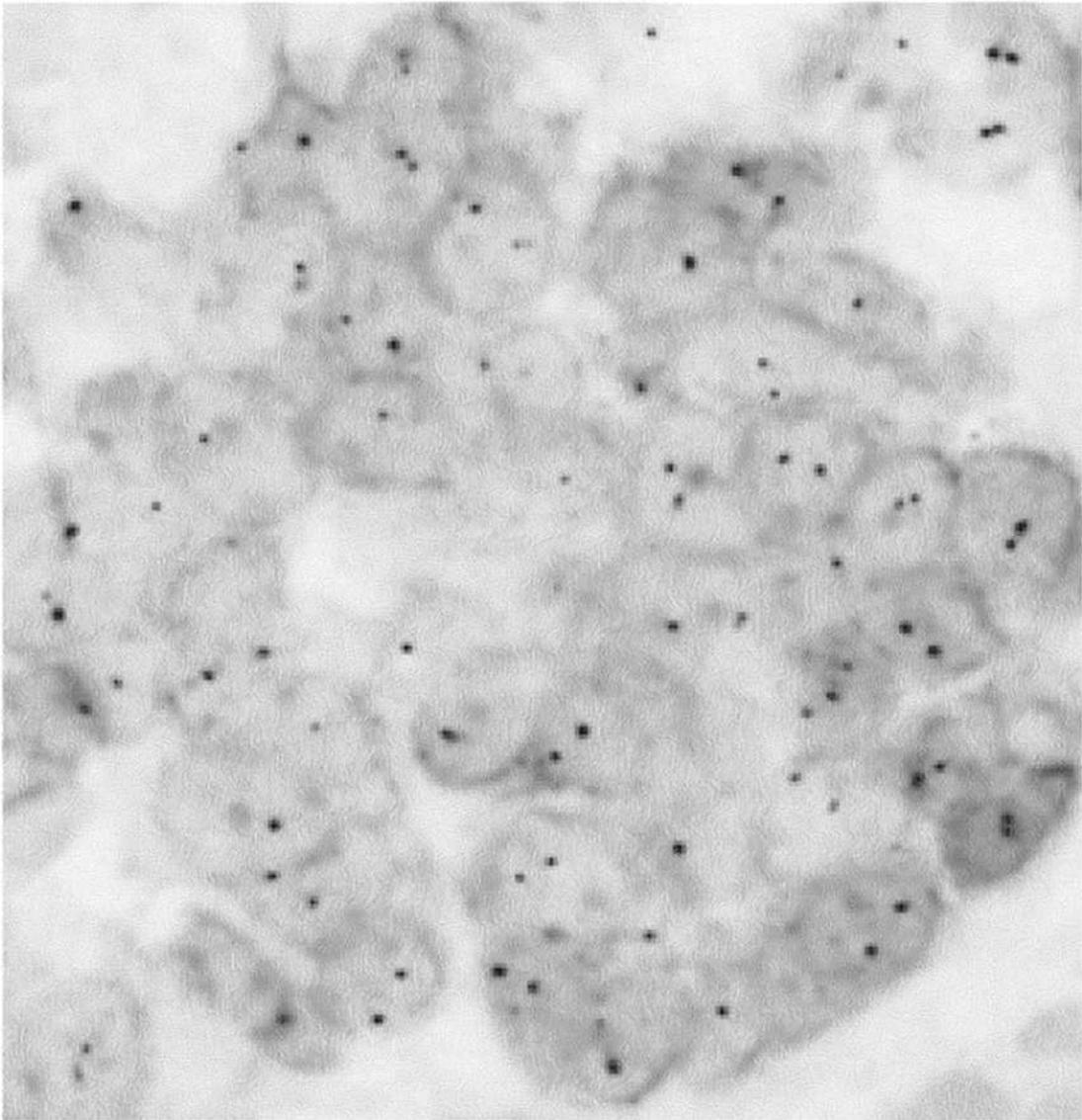


FIG. 4(A)

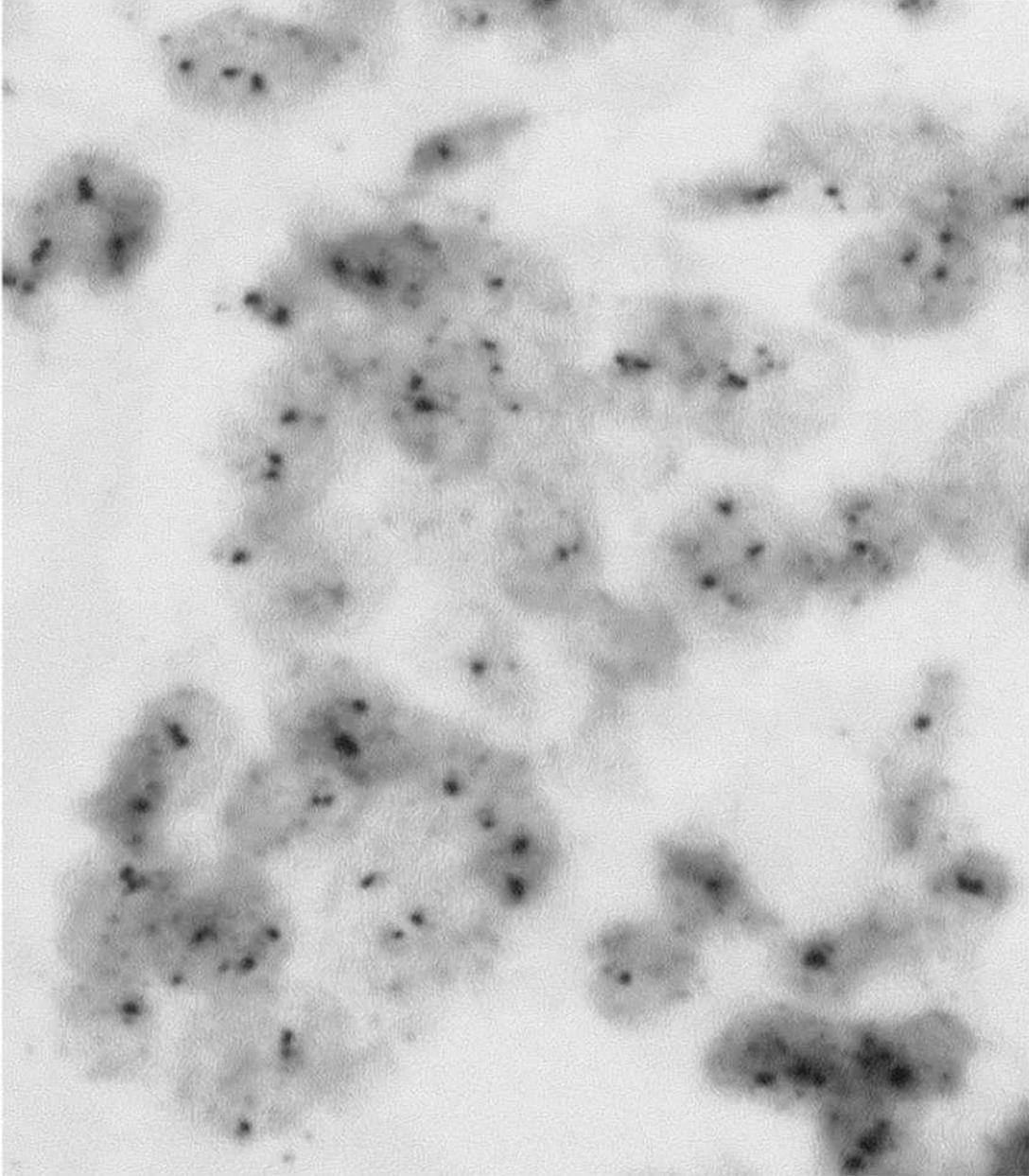


FIG. 4(B)

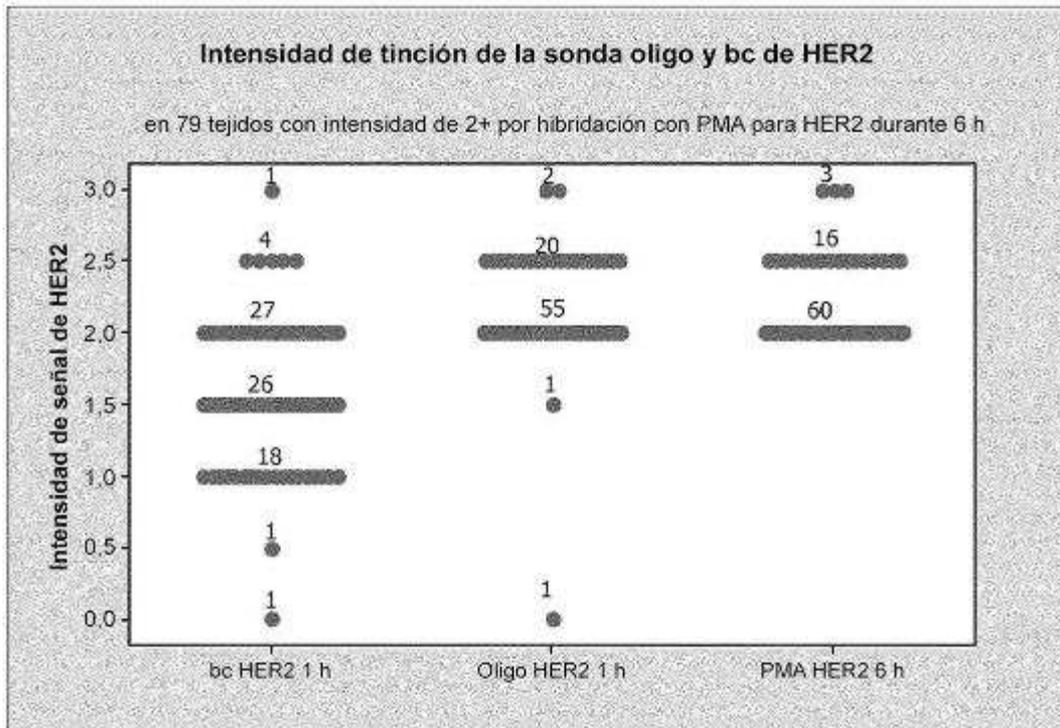


FIG. 5(A)

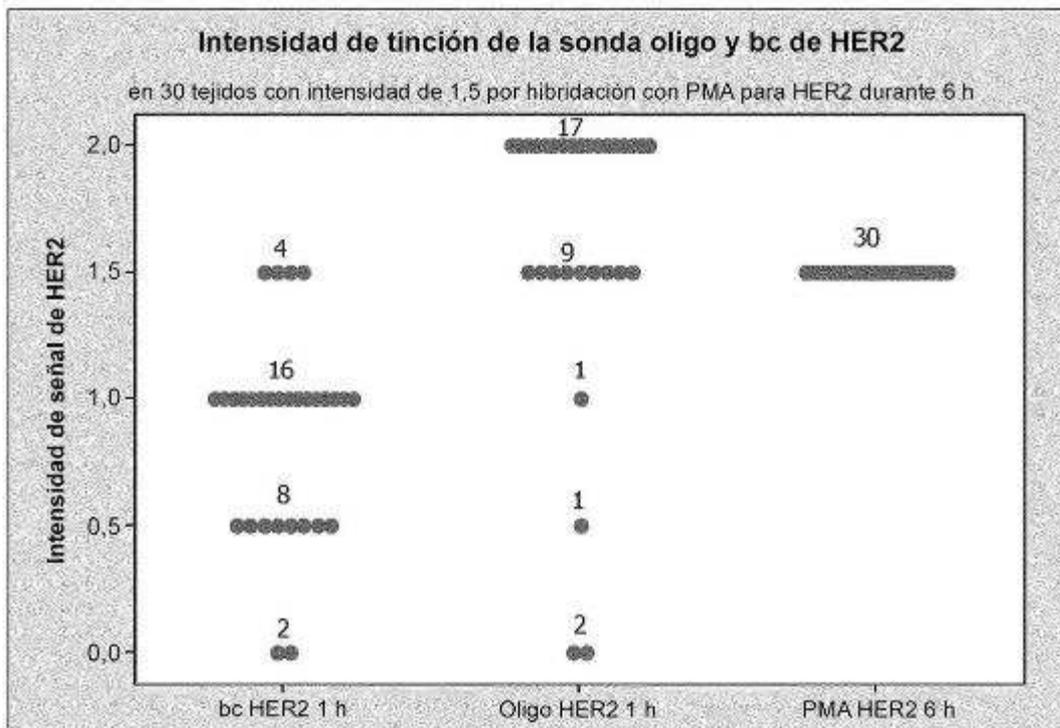


FIG. 5(B)

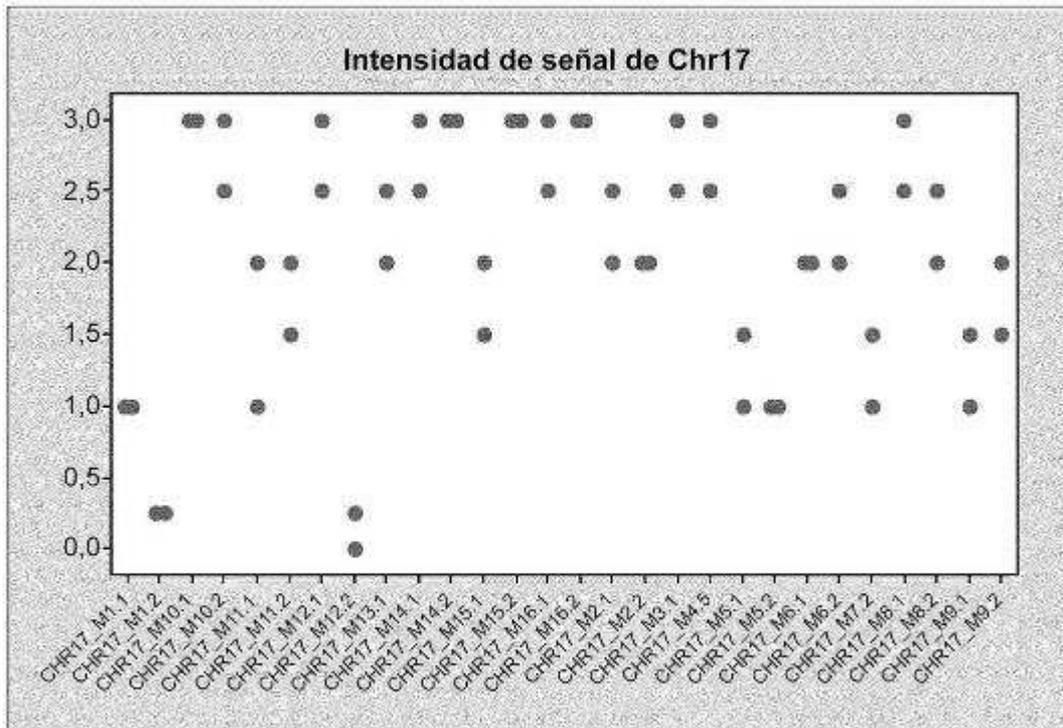


FIG. 6(A)

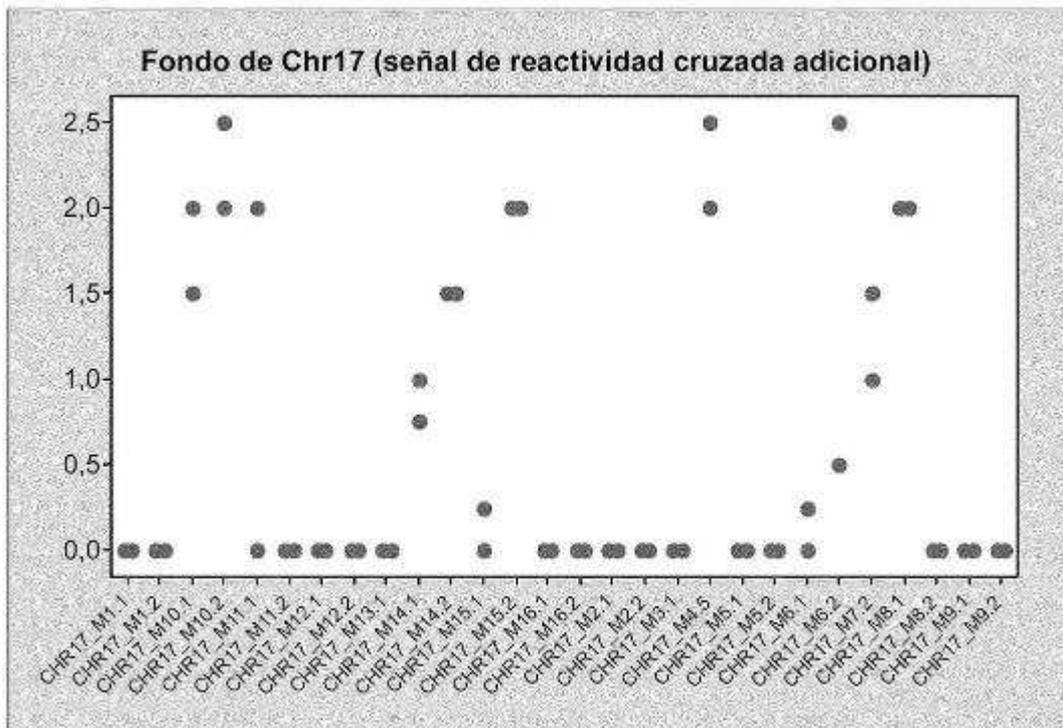


FIG. 6(B)

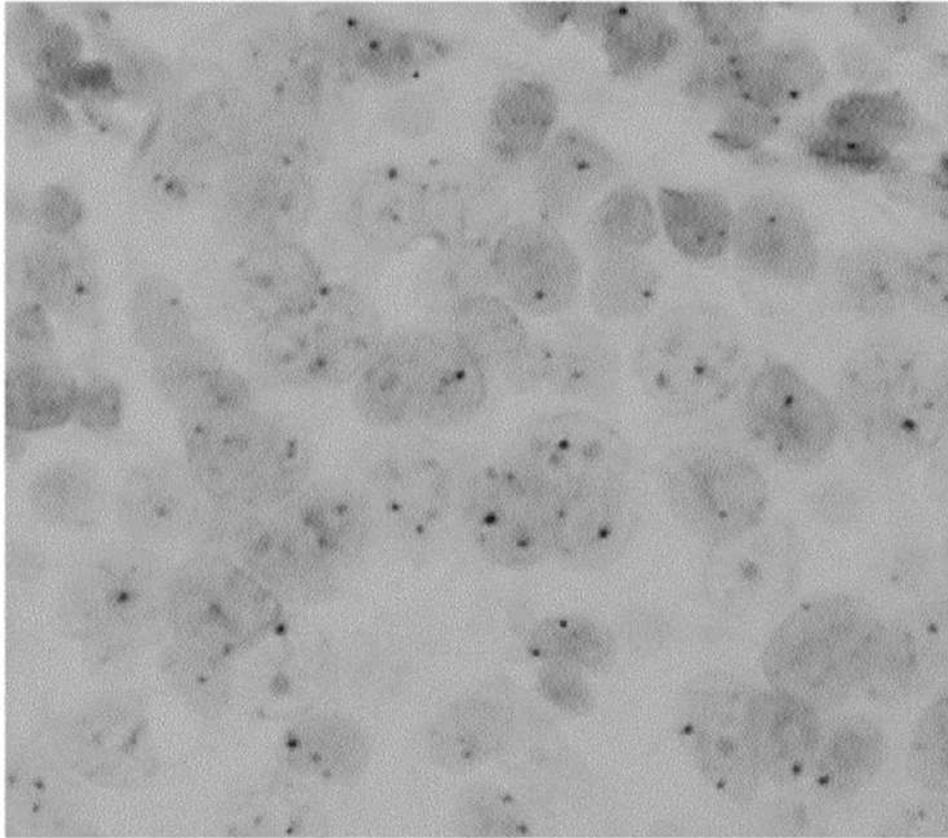


FIG. 6(C)

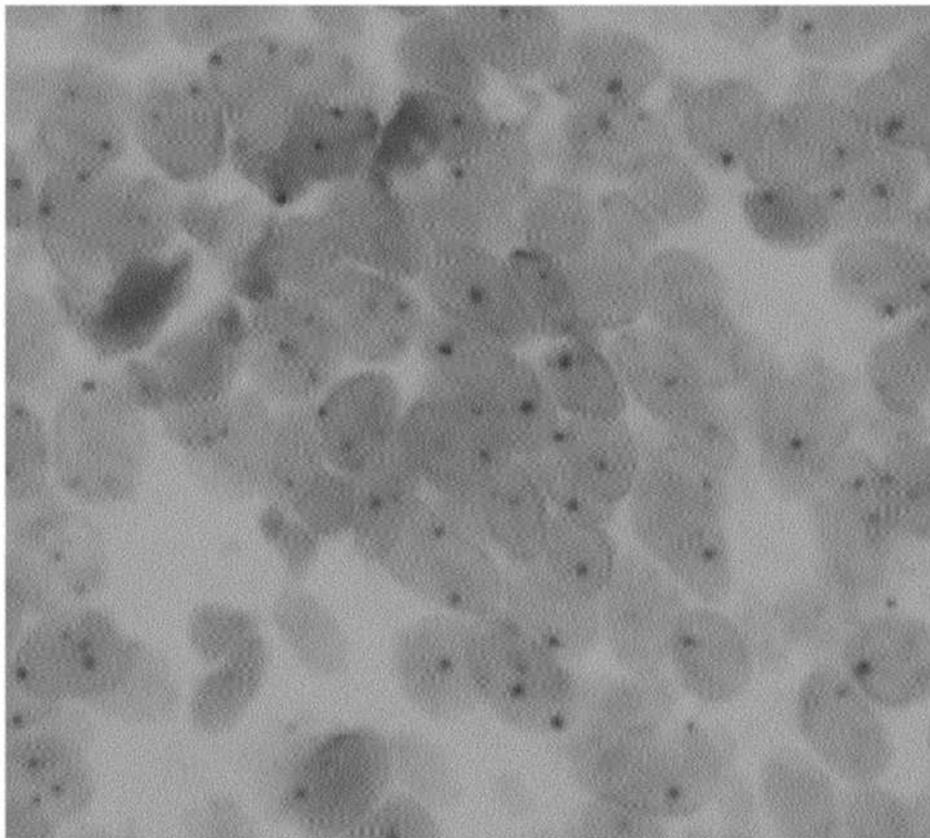


FIG. 6(D)

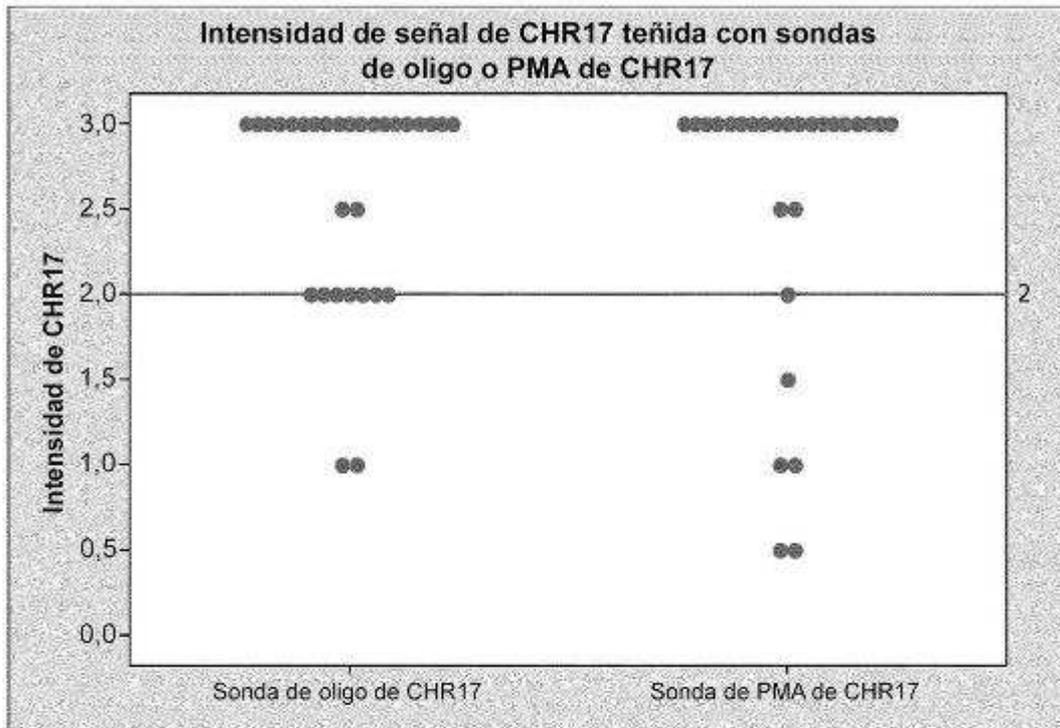


FIG. 7(A)

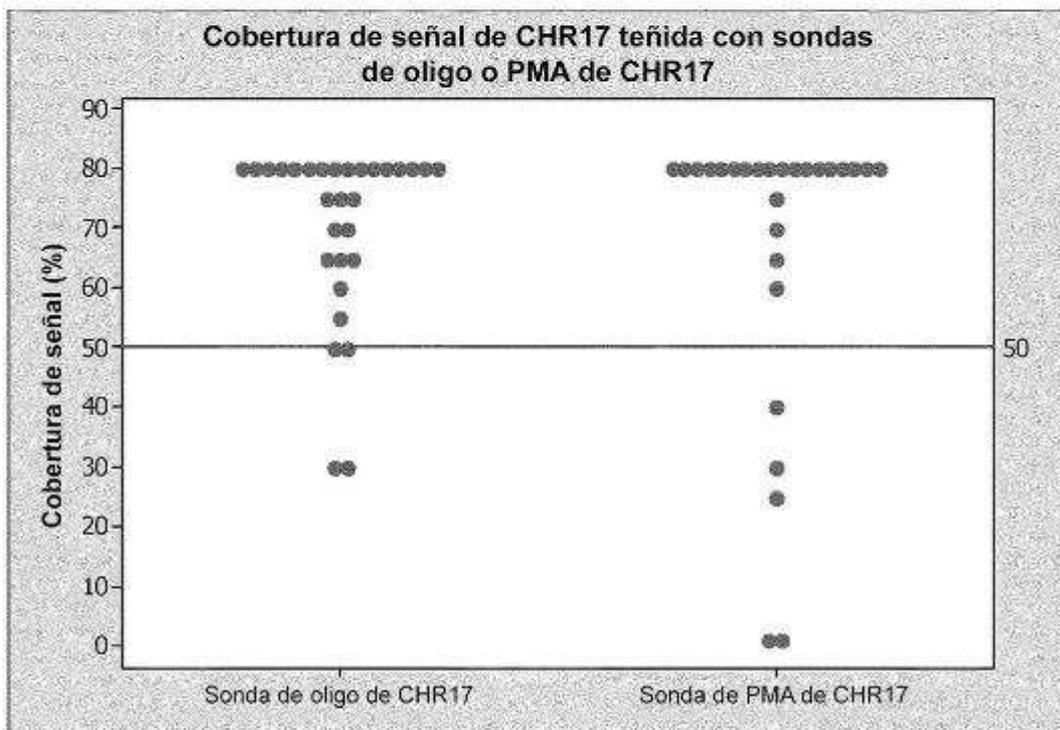


FIG. 7(B)

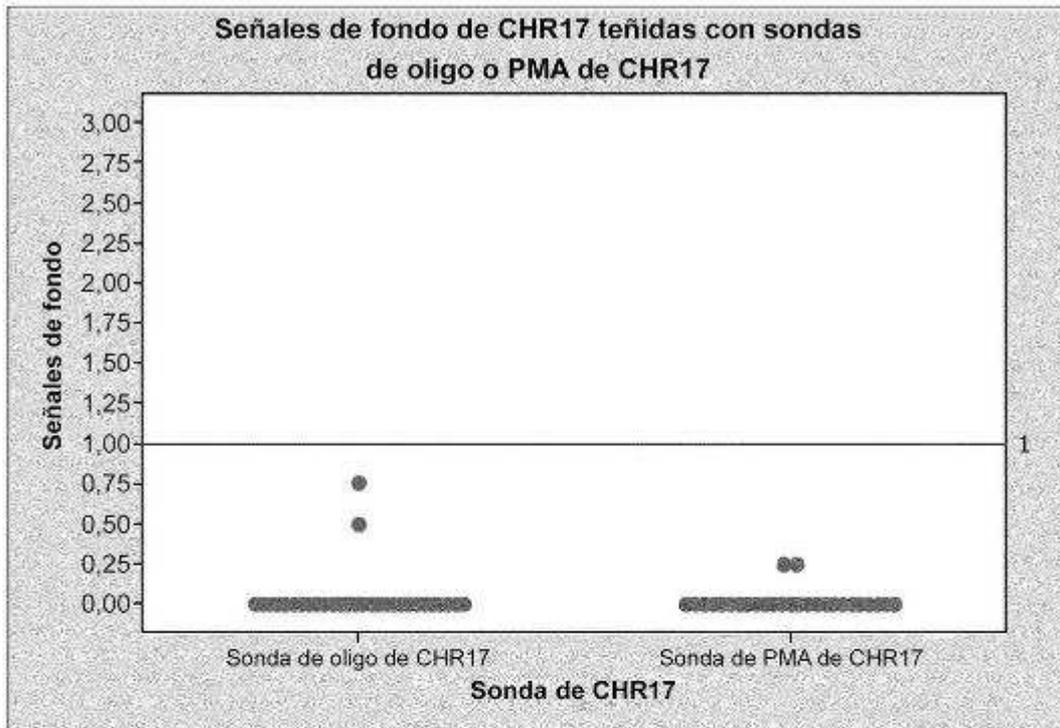


FIG. 7(C)



FIG. 7(D)

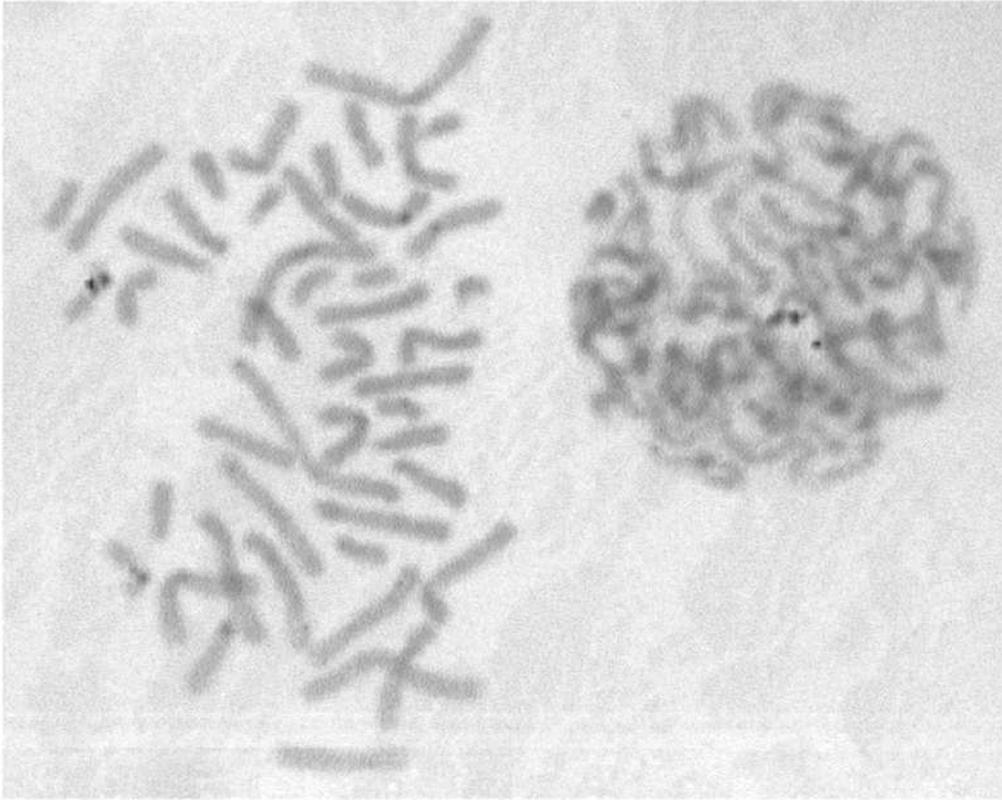


FIG. 8

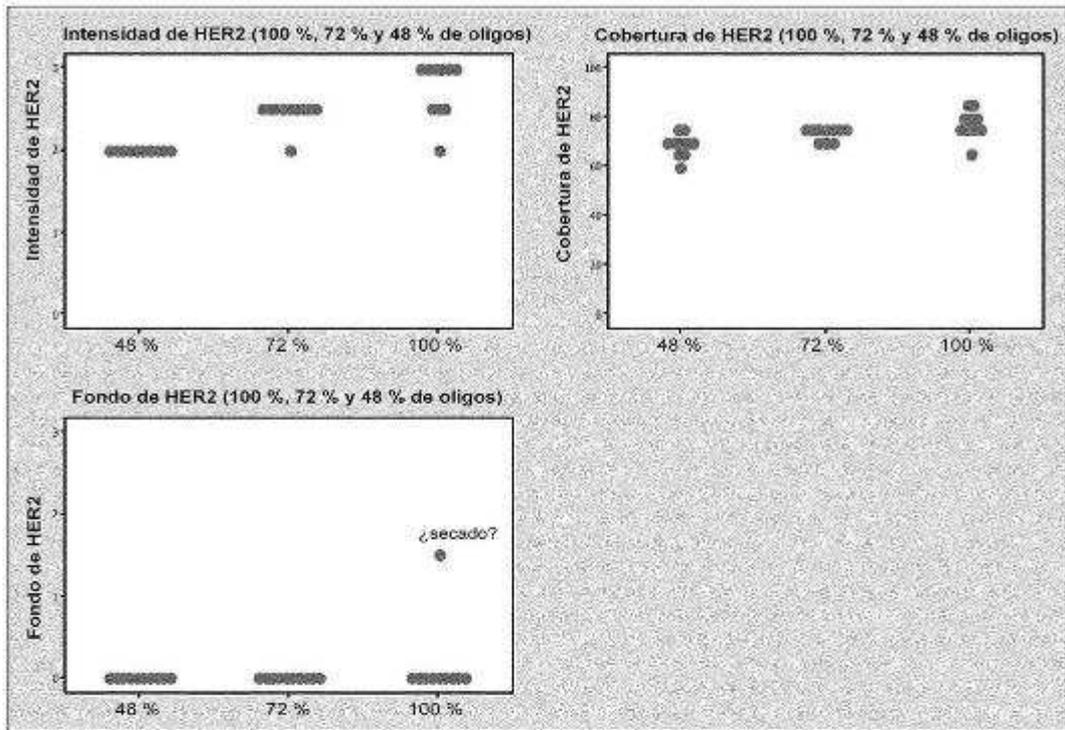


FIG. 9

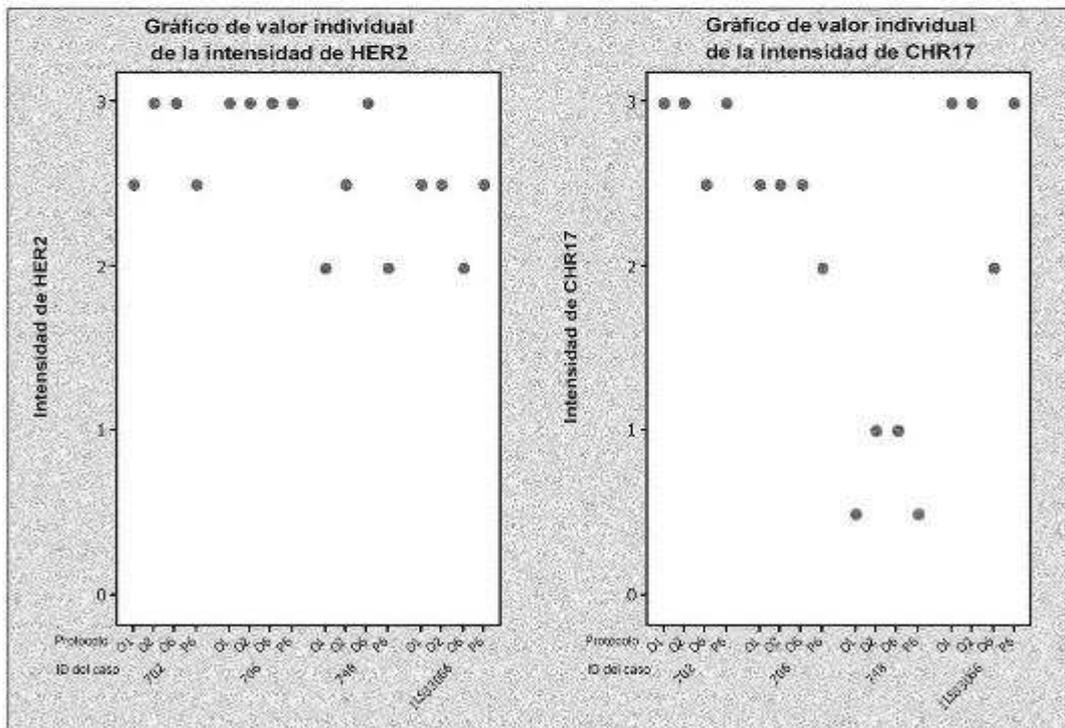


FIG. 10

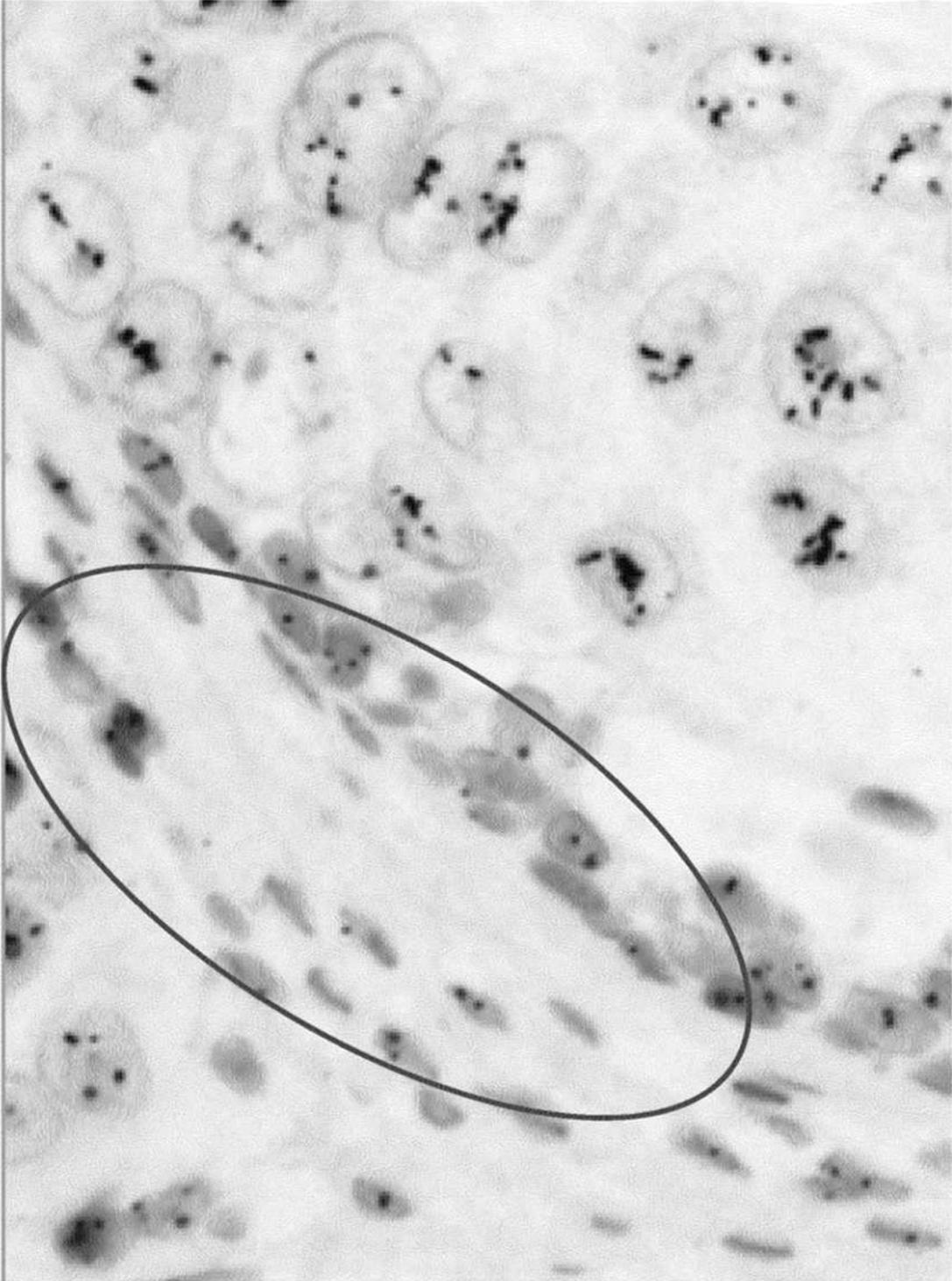


FIG. 11(A)

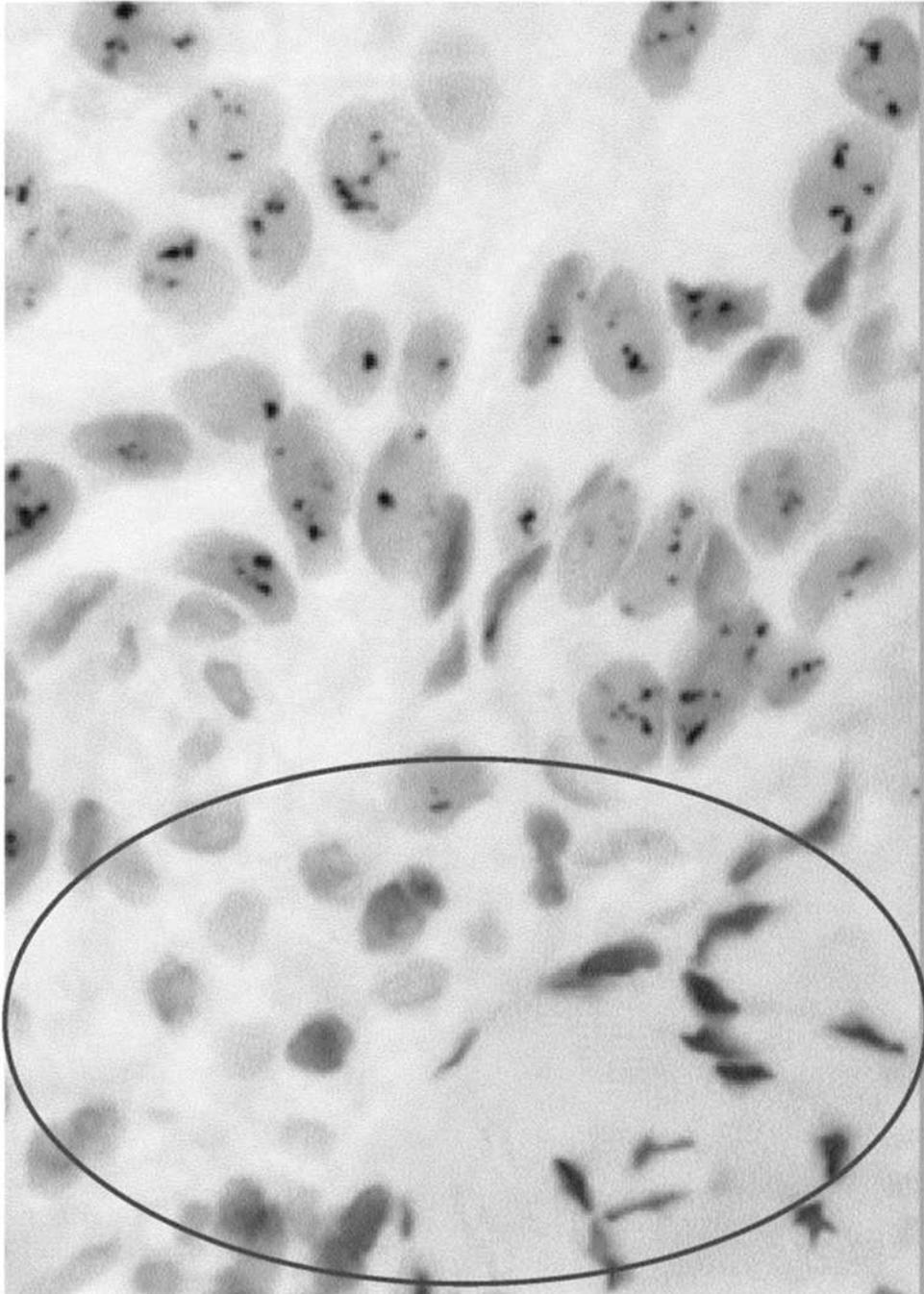
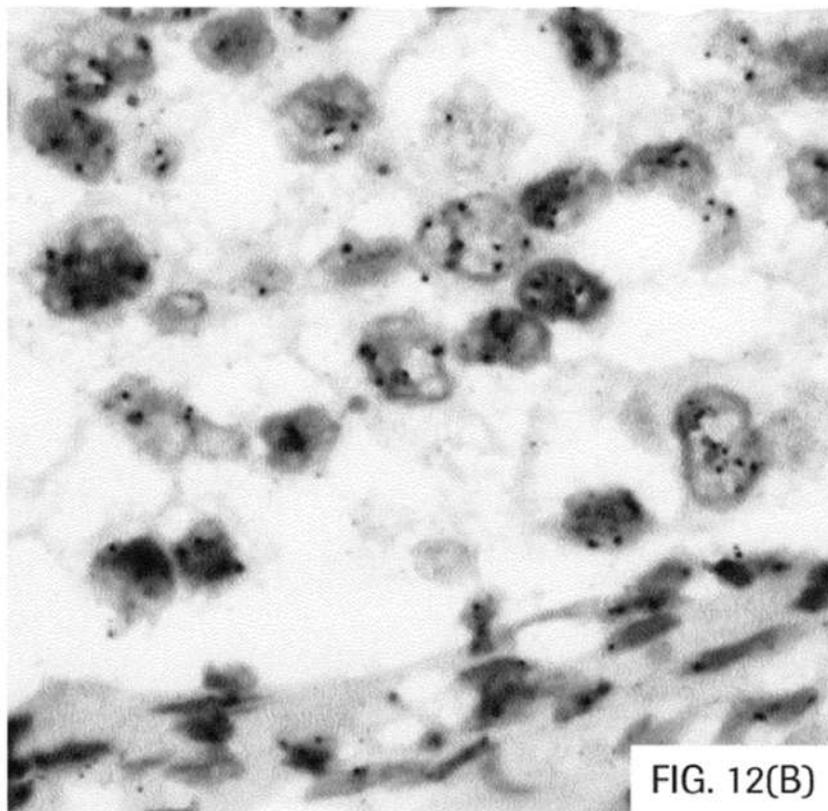
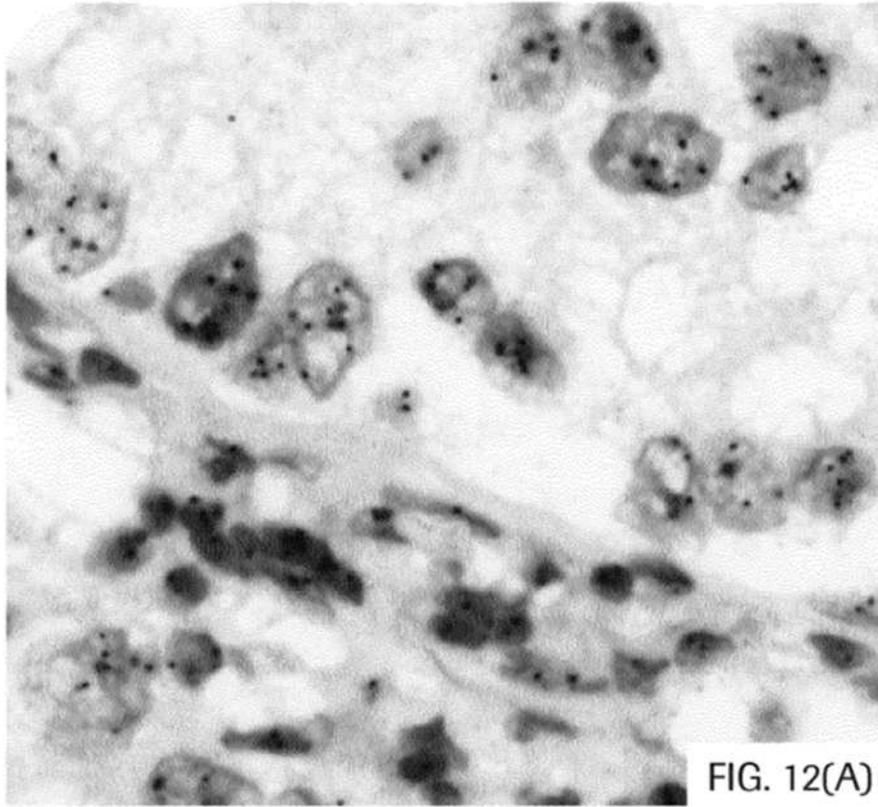
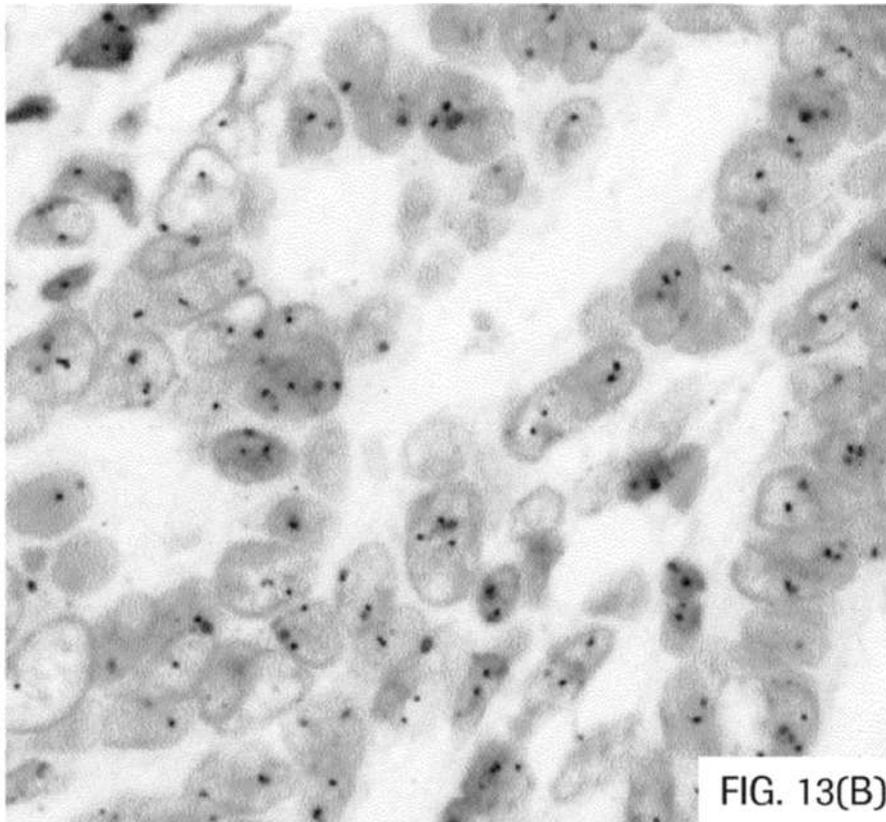
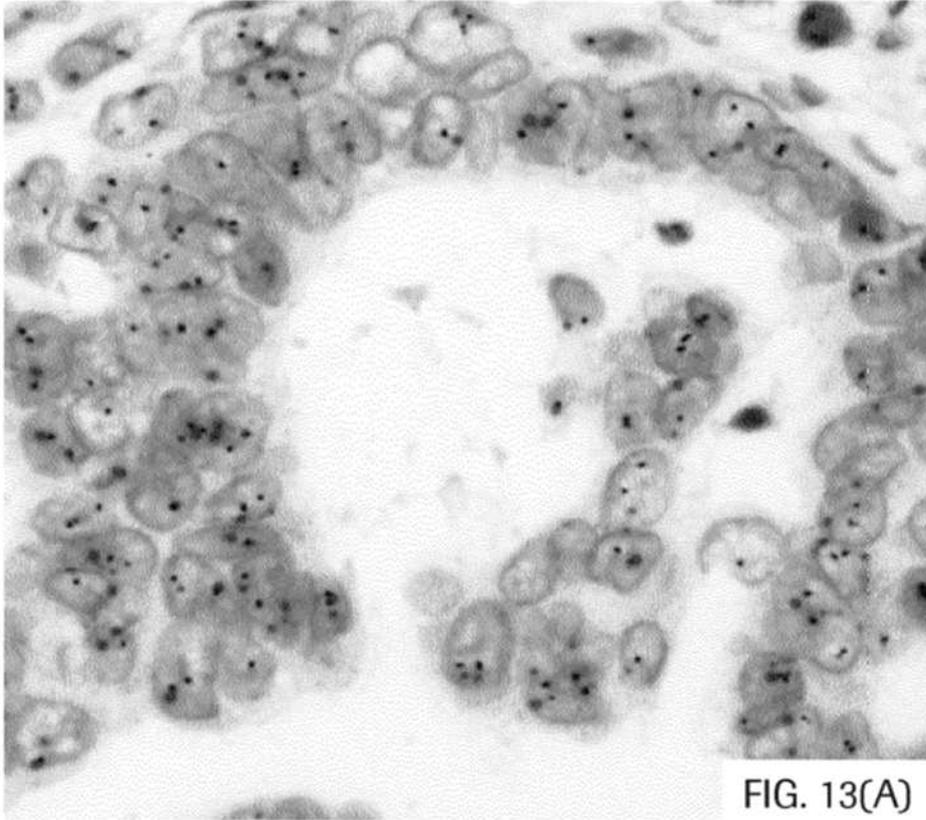


FIG. 11(B)





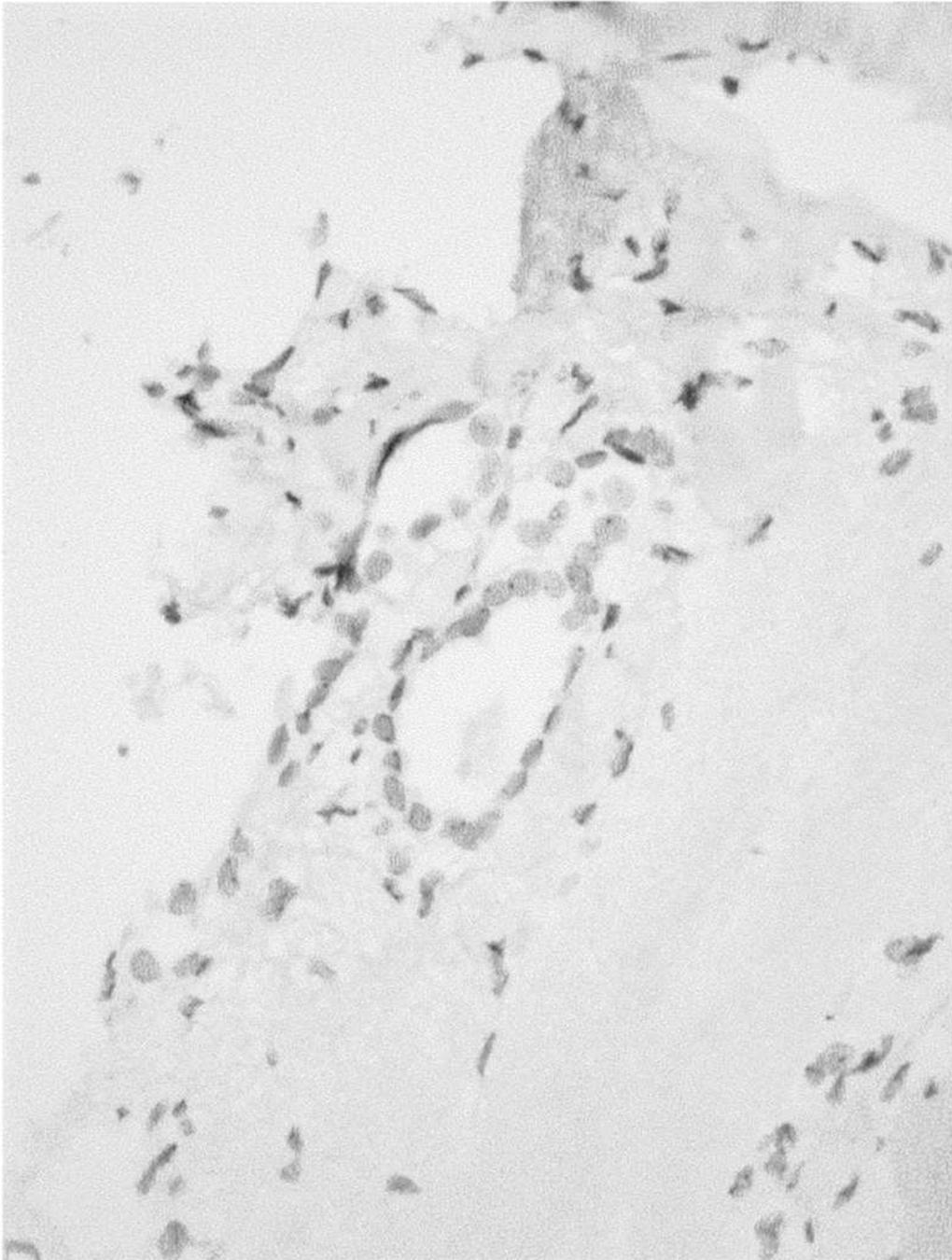


FIG. 14(A)

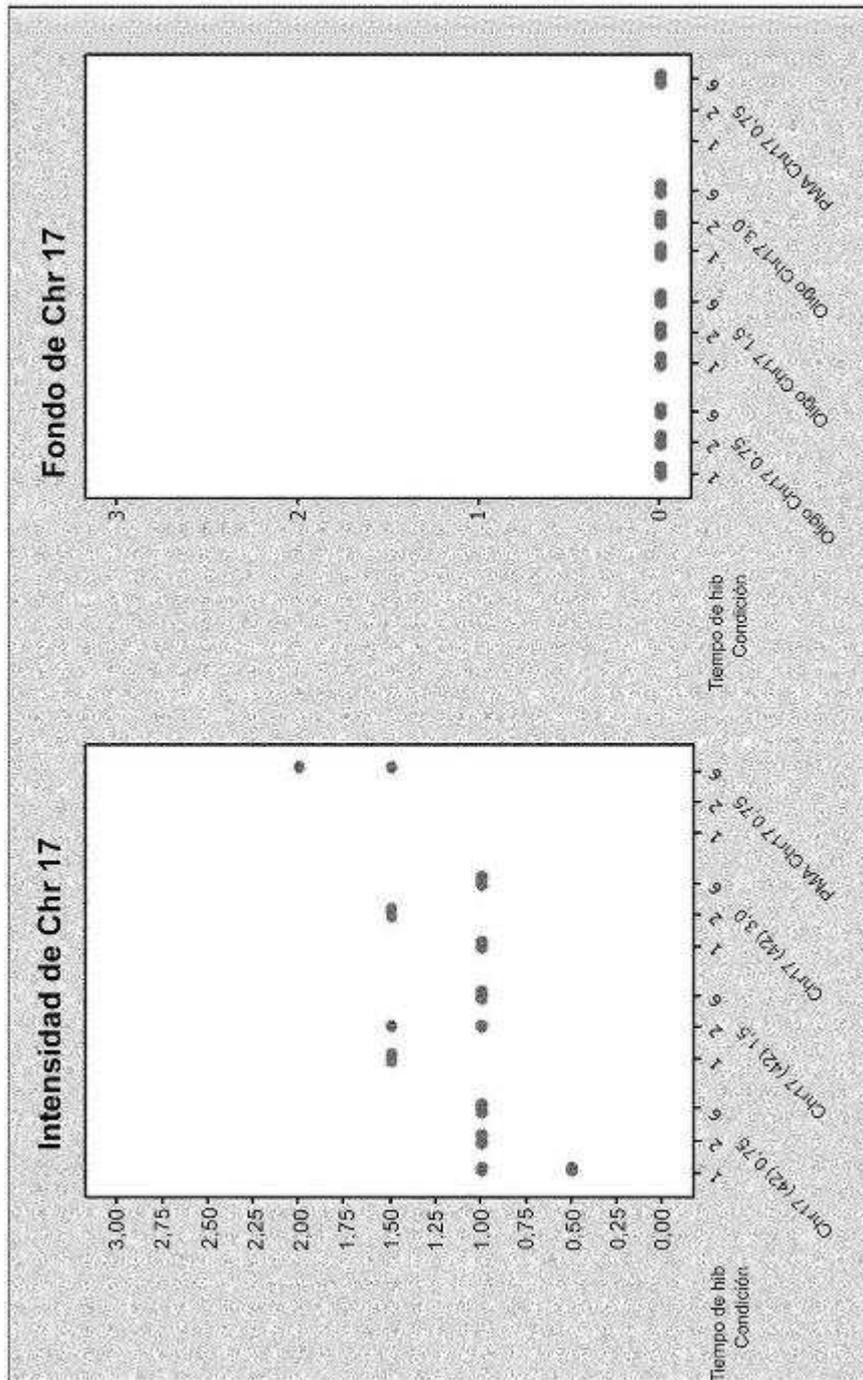


FIG. 14(B)

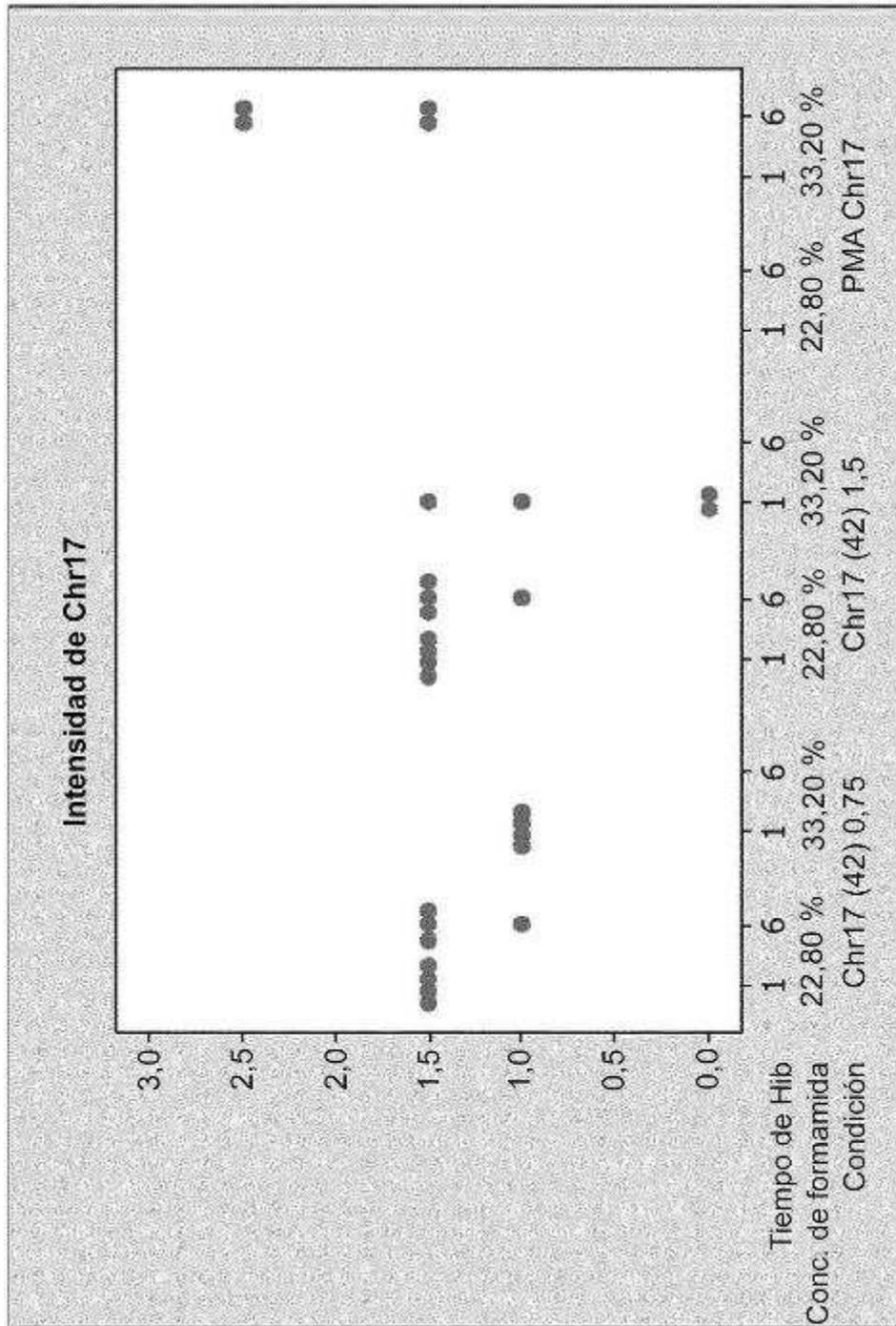


FIG. 14(C)

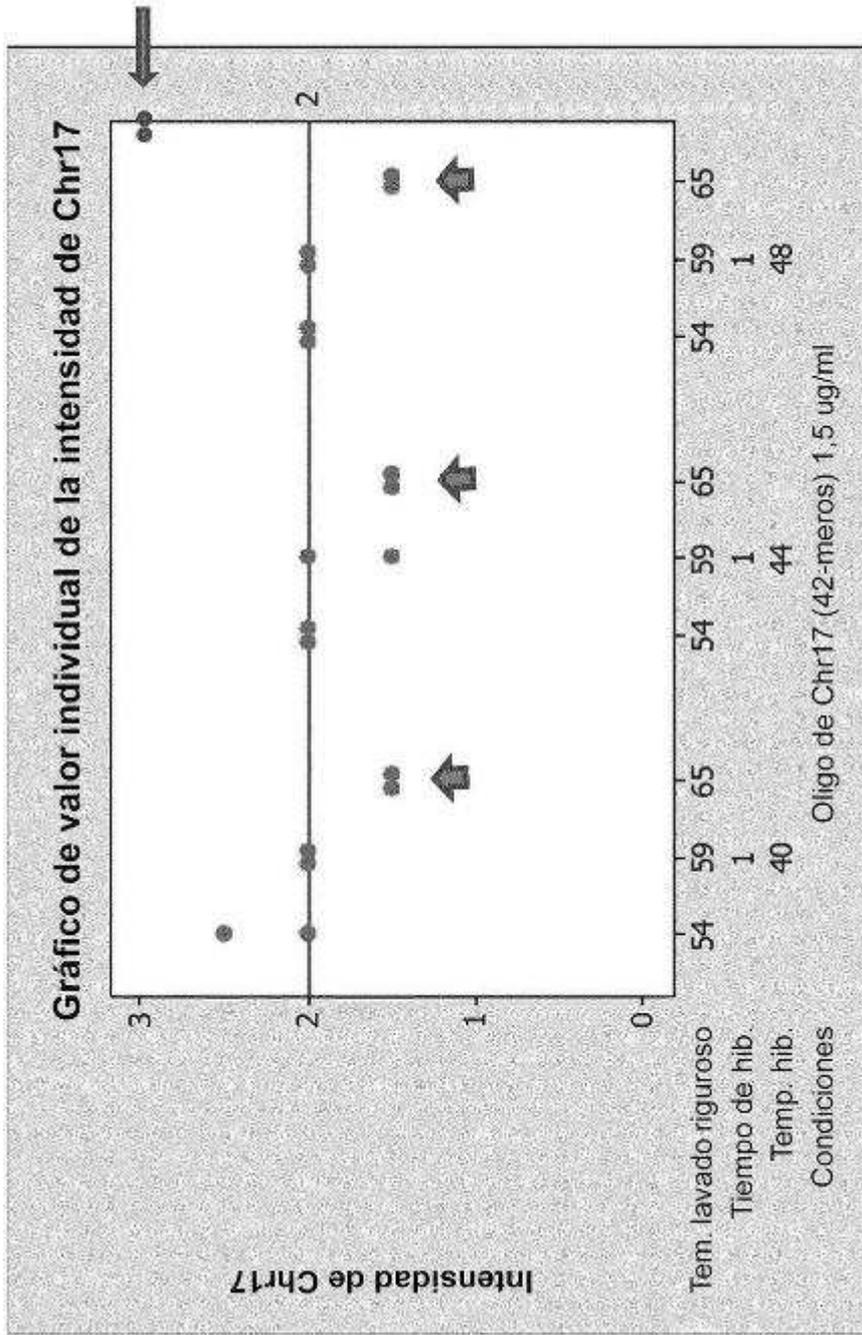


FIG. 14(D)

Oligos de CHR17	Longitud nt	n.º resultados en CHR17		n.º resultados fuera de la diana		
		>85 % de identidad	>85 % de identidad	>85 % de identidad	Tramo continuo	cromosomas
M1.1	79	23	5	>=78 nt	1, 3, 20	
M11.2	71	17	8	71 nt	X, 1	
M12.1	80	7	7	80 nt	X	
M13.1	80	19	18	>=78 nt	1, 9, 20	
M16.1	80	19	16	80 nt	1	
M16.2	80	16	11	80 nt	1	
M2.1	79	21	33	79 nt	1	
M2.2	79	18	14	>=72 nt	X	
M3.1	79	23	16	>=70 nt	22, 20, X, 2, 14, 11, 21, 3	
M5.1	83	25	33	>=71 nt	1	
M5.2	87	16	22	>=76 nt	1, 3, 16	
M8.2	71	19	38	>=66 nt	1, X, 14	
M9.1	58	19	20	>=57 nt	1, X, 11, 12	
M9.2	65	17	7	>=58 nt	1, X, 11, 22	

FIG. 15

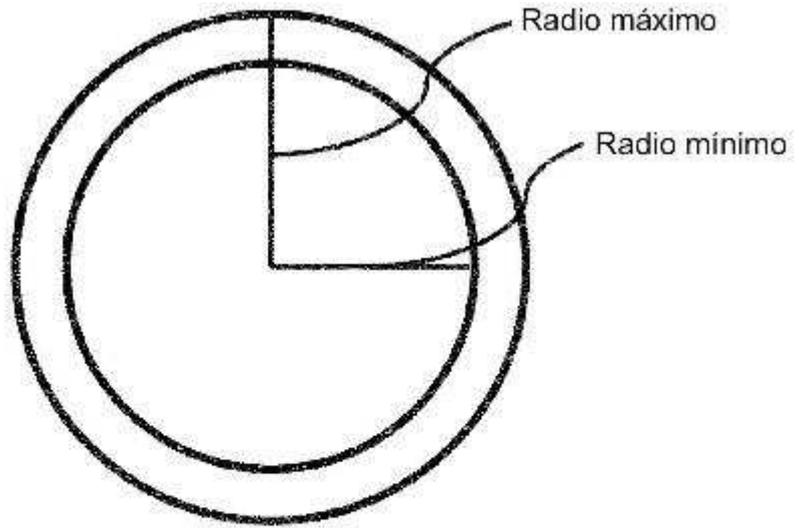


FIG. 16(A)

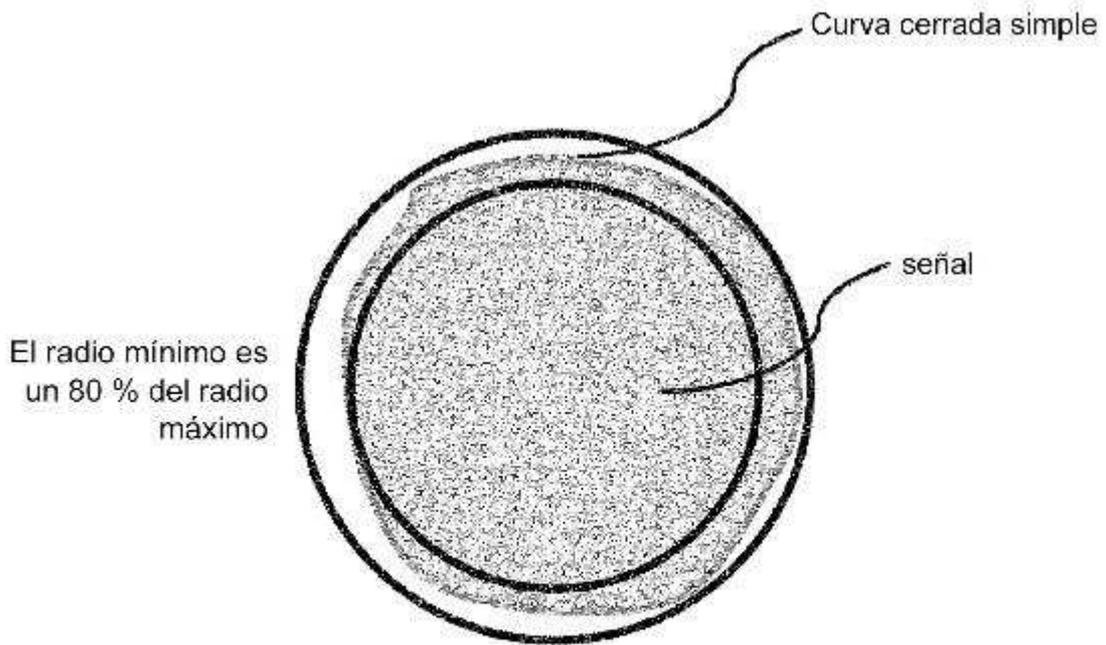


FIG. 16(B)

El radio mínimo es un 50 % del radio máximo

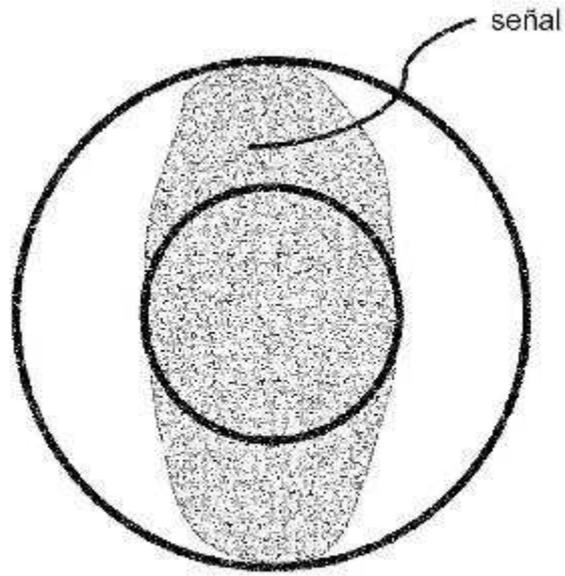


FIG. 16(C)

El radio mínimo es un 75 % del radio máximo

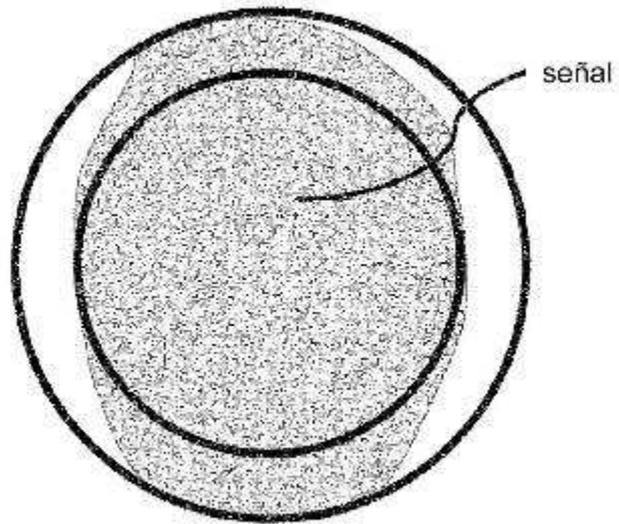


FIG. 16(D)