

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 603**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2015 E 15002200 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3109324**

54 Título: **Procedimiento para la detección de aberraciones cromosómicas**

30 Prioridad:

**23.06.2015 EP 15001845**  
**13.07.2015 EP 15002075**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.03.2019**

73 Titular/es:

**ZYTOVISION GMBH (100.0%)**  
**Fischkai 1**  
**27572 Bremerhaven, DE**

72 Inventor/es:

**ROGALLA, PIERE y**  
**HAUKE, SVEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 702 603 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

Procedimiento para la detección de aberraciones cromosómicas

La presente invención se refiere al campo técnico de los procedimientos de detección de anomalías cromosómicas o bien aberraciones cromosómicas.

- 5 En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí mediante hibridación *in situ*. Además, la presente invención se refiere a una composición adecuada para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, así como a sus usos de acuerdo con la invención. Otro objeto de la presente invención son, además, los usos de al menos tres sondas de hibridación específicas de locus, diferentes entre sí y marcadas con marcadores de detección.
- 10 Finalmente, es objeto de la presente invención un kit para la detección de aberraciones cromosómicas.

Muchas enfermedades tumorales se fundamentan en mutaciones cromosómicas estructurales y numéricas, tales como translocaciones, inversiones, duplicaciones de segmentos, deleciones, inserciones, duplicaciones, aneuploidías y amplificaciones. La detección de estas modificaciones como marcador predictivo, de pronóstico o de diagnóstico diferencial tiene lugar, por norma general, mediante hibridaciones *in situ* (ISH).

- 15 La hibridación *in situ* se basa en la hibridación o bien el emparejamiento de bases complementarias de cadenas sencillas de ácido nucleico, en particular cadenas sencillas de ADN, de modo que se pueden detectar secuencias de ácidos nucleicos específicas en una muestra, en particular en un tejido o preparado celular. Para ello, sondas marcadas de forma directa o indirecta, preparadas de forma sintética, se hibridan con cadenas sencillas de ácidos nucleicos de la muestra y, a continuación, se detectan.

- 20 Para los fines de detección pueden pasar a emplearse, entre otros, segmentos de ácidos nucleicos marcados por fluorescencia o bien sondas de hibridación marcadas por fluorescencia (ISH fluorescentes (FISH)). Además de ello, pueden pasar a emplearse sondas marcadas con antígenos, en particular, sondas marcadas con haptenos que, a continuación, se hacen visibles con ayuda de anticuerpos mediante reacciones de color, de modo que es posible un análisis por microscopía óptica ((ISH de campo claro (BrISH), ISH cromogénica (CISH), ISH con plata (SISH)).

- 25 La ventaja de las FISH es que pueden detectarse simultáneamente y se forma claramente diferenciable entre sí múltiples regiones genómicas. Para ello, segmentos de ácidos nucleicos que fijan como objetivo diferentes regiones genómicas o bien son específicos para ellas se marcan o bien acoplan en cada caso con colorantes de fluorescencia, diferentes que se diferencian entre sí en su espectro de absorción y/o emisión. Si sondas de múltiples colores de este tipo, que comprenden sondas individuales separadas y diferentes, se utilizan, p. ej., en preparados de cromosomas en metafase o en preparados de núcleo celular en interfase, entonces los distintos colores pueden representarse de manera separada uno de otro mediante el uso de filtros de microscopio específicos que conducen intervalos de longitudes de onda de la luz definidos con precisión para la excitación de los colorantes sobre el preparado, así como intervalos de longitudes de onda definidos con precisión de la luz emitida por los colorantes hacia el evaluador (el denominado conjunto de filtros de paso banda sencilla). Además de ello, existen también filtros
- 30 o bien conjuntos de filtros que permiten la representación simultánea de diferentes colorantes de fluorescencia y, por consiguiente, de varios segmentos de ácidos nucleicos. En el caso de dos colorantes de fluorescencia diferentes se habla, por ejemplo, de un conjunto de filtros de paso banda dual.

- 35 Sin embargo, a la representación simultánea se le establecen límites claros, dado que por cada región genómica que es detectada por una sonda específica solo puede utilizarse un marcador. Además, los intervalos de absorción y emisión de los colorantes se encuentran a menudo tan próximos uno junto a otro que no pueden ser separados uno de otro mediante los juegos de filtro de microscopio. Por estos motivos, en la FISH se analizan simultáneamente de manera habitual solo dos colores (naranja/rojo y verde) o bien tres colores (naranja/rojo y verde simultáneamente o bien conjuntamente con una contratinción azul del núcleo (DAPI)). Aproximadamente las mismas limitaciones que se exponen para FISH son válidas también para la BrISH. Aquí, el estado de la técnica es el uso de dos haptenos, la mayoría de las veces elegidos del grupo de biotina, dinitrofenilo (DNP) y digoxigenina, y dos enzimas acopladas a anticuerpos, la mayoría de las veces fosfatasa alcalina y peroxidasa.

- 40 Las limitaciones mencionadas en la representación simultánea o bien el análisis tienen una influencia determinante sobre la combinación (composición) o bien el ajuste de las sondas para la detección de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas que pueden llevarse a cabo para el diagnóstico de tumores con células que se encuentran en la interfase solamente con las denominadas sondas específicas de locus, utilizándose ocasionalmente en paralelo a la detección de mutaciones cromosómicas numéricas también las denominadas sondas específicas para secuencias repetitivas.

- 45 Por sondas específicas de locus se entienden aquellas sondas que fijan como objetivo segmentos de ADN elegidos de un cromosoma, la mayoría de las veces genes individuales o genes contiguos, con un tamaño en total de hasta aproximadamente 1.000 kb y se designan como sondas gen específicas o como sondas de copia única. Sondas específicas para secuencias repetitivas son sondas que fijan como objetivo secuencias repetitivas y, por lo tanto, fijan como objetivo regiones con un tamaño de varios miles de kb. Estas sondas comprenden, por ejemplo, también sondas centrómeros o alfa-satélites.

En relación con la detección de translocaciones e inversiones existen, en principio, dos técnicas determinantes y combinaciones de sondas o bien composiciones de sondas en las que se fundamentan: el principio de la formación de señales de fusión (los denominados enfoques de doble color-fusión doble) (documento WO 02/092130 A2), por una parte, así como de la separación de señales de fusión (los denominados enfoques de separación de dos colores o escisión de dos colores) por otra parte. En la exposición que sigue de estos dos principios y en los modelos de señales derivados se ha de tener en cuenta que una célula normal es, por norma general, diploide, es decir, cada uno de los alelos se presenta por duplicado. Dado que en el caso de aberraciones, por norma general, en cada caso solo se ve afectado uno de los dos alelos, junto a la señal aberrante es visible, por norma general, también además, la señal normal del alelo que no ha sido afectado por la aberración. Para una mejor comprensión, en lo que sigue no se describe siempre explícitamente el modelo de señales de la señal normal.

En el caso de los enfoques de doble color-fusión doble, la región de un primer punto de ruptura del cromosoma es flanqueado de modo proximal y distal por segmentos de ácidos nucleicos del mismo color (p. ej., naranja), la región de un segundo punto de ruptura, es decir, del participante en la translocación recíproco es flanqueado de forma proximal y distal por segmentos de ácidos nucleicos de un segundo color (p. ej., verde). La situación normal, es decir, rupturas cromosómicas en la región de los dos participantes en la translocación se caracteriza en este caso por una señal verde y una señal naranja separada en el espacio.

En el caso de una translocación recíproca se producen rupturas dentro de los puntos de ruptura de los dos participantes en la translocación, y la región proximal de uno de los participantes en la translocación se fusiona con la región distal del otro participante, y viceversa. Por consiguiente, se forman dos pares de señales verde/naranjas, denominadas también señales de fusión, dado que a menudo se solapan las señales de diferente color. El inconveniente de estas técnicas de sondas es que las señales de fusión solo se forman cuando los puntos de ruptura de los dos participantes en la translocación se encuentran en la región en los segmentos de ácidos nucleicos marcados respectivos. En el caso de translocaciones que solo afectan a uno de los dos participantes, no se forman señales de fusión. En este caso, se produce únicamente la formación de una señal adicional con el color de la señal que es característico para el participante afectado por la translocación. Esto significa que resulta una señal verde adicional cuando el punto de ruptura de la translocación se encontraba en la región que fue cubierta por los ácidos nucleicos marcados con el fluorocromo verde. El inconveniente de esta composición de sondas es que con ayuda de los dos colores utilizados solo se marcan las dos regiones del punto de ruptura de la misma translocación o bien inversión y, por consiguiente, solo se puede detectar una translocación o bien inversión específica.

En el caso de los enfoques de separación de dos colores, la región de un punto de ruptura es flanqueada de forma proximal y distal por segmentos de ácidos nucleicos marcados de forma diferente o marcados con color (p. ej., distal naranja, proximal verde). La situación normal, es decir, sin ruptura cromosómica de esta región, se caracteriza en este caso por una señal de fusión. En una situación aberrante, es decir, cuando se produce una ruptura cromosómica entre los segmentos de la sonda, las señales se separan entre sí en el espacio. La diferencia entre la situación normal y la situación aberrante se caracteriza, por lo tanto, por la distancia de las señales de distinto color. Con este procedimiento, no son posibles afirmaciones sobre participantes en la translocación implicados. Únicamente permite sacar la conclusión de que ha tenido lugar una transposición cromosómica específica. El inconveniente de esta combinación de sondas es que con ayuda de los dos colores utilizados solo se puede detectar una única región del punto de ruptura y, por consiguiente, únicamente una translocación o bien inversión específica.

En lo que afecta a deleciones, aneuploidías y amplificaciones, se emplea habitualmente solo una técnica determinante y una combinación de sondas en la que se fundamenta que se refiere, por lo general, a sondas, específicas de locus. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias sondas específicas de locus se amplían también mediante las denominadas sondas específicas de secuencias repetitivas tales como, por ejemplo, sondas de centrómeros o alfa-satélites: el principio de la detección de la ganancia o pérdida de señales mediante la aparición de deleciones, aneuploidías y amplificaciones tiene lugar habitualmente en los denominados enfoques de sonda de dos colores. También en el caso de este principio que se describe en lo que sigue, además de ello, en el estado de la técnica se describen enfoques de FISH triples que fijan como objetivo la detección de sucesos de translocación diferentes que pueden agruparse uno junto a otro en una región cromosómica (es decir, están afectados diferentes genes que se encuentran en la vecindad). En este caso, para la evaluación correspondiente de los modelos de señales se analizan en cada caso solo dos colores que detectan una aberración individual, no jugando papel alguno en cada caso el tercer color. Se utilizan tres sondas específicas de locus diferentes que en cada caso están marcadas con otro marcador.

En lo que se refiere a la ISH de campo claro (BrISH) utilizando más de dos colores, en el estado de la técnica se describe al respecto la realización de una hibridación *in situ* triple cromogénica que, en general, fija como objetivo la detección de tres regiones cromosómicas repetitivas. Según el estado actual de la técnica, las translocaciones se detectan mediante BrISH solo utilizando dos haptenos y, por consiguiente, dos colorantes. En la solicitud de patente WO 2012/150022 A1 se describe un procedimiento que da a conocer la aplicación de tres sondas diferentes mediante el método de BrISH utilizando los tres marcadores biotina, digoxigenina y DNP que conducen a tres colores diferentes, para la detección de inversiones.

El documento US 6 576 421 B1 describe un procedimiento para la detección de translocaciones asociadas con el cáncer, en el que se utilizan tres sondas, de las cuales dos se hibridan en un lado de un punto de ruptura sobre un

cromosoma de fusión y la tercera sonda sobre el otro lado del punto de ruptura. Cada una de las sondas está marcada con un marcador que se diferencia de los de las otras sondas.

5 El documento US 6 344 315 B1 da a conocer procedimientos para la tinción de material cromosómico en interfase, en los que se utiliza una sonda de ácidos nucleicos que presenta una longitud mayor que 50.000 bases y en los que, por ejemplo, para la realización de un procedimiento FISH se utiliza una sonda ABL marcada con biotina que es detectada de forma indirecta con el fluorocromo Texas Rojo y una sonda BCR marcada con digoxigenina que es detectada indirectamente con el fluorocromo FITC.

El documento WO 93/21345 A1 describe procedimientos para la detección de una deleción de un gen, en los que se utilizan dos sondas que están provistas de marcadores fluorescentes diferentes entre sí.

10 El documento WO 2005/111235 A2 describe un procedimiento que comprende el uso de tres colores para fines de detección. Sin embargo, la región cromosómica, que es marcada por el tercer marcador de una sonda, no está afectada directamente por una modificación, de modo que en el caso de una modificación de la estructura del cromosoma se elimina la primera señal de fusión, de modo que una nueva señal de escisión y una nueva fusión-  
15 Además de ello, en el estado de la técnica se describen enfoques triples de FISH, que se dirigen a la detección de diferentes sucesos de translocación que pueden agruparse una junto a otro en una región cromosómica (es decir, están afectados diferentes genes que se encuentran en vecindad). En este caso, para la correspondiente evaluación de los modelos de señales se analizan en cada caso solo dos colores que detectan una única aberración, no jugando papel alguno el tercer color. Se utilizan tres sondas diferentes específicas de locus que en cada caso están marcadas con otra etiqueta.

20 En lo que concierne a la ISH de campo claro (BrISH) utilizando más de dos colores, en el estado de la técnica se describe al respecto la realización de una hibridación *in-situ* triple cromogénica, que, en general, fija como objetivo la detección de tres zonas cromosómicas repetitivas. Según el estado actual de la técnica, las translocaciones se detectan mediante BrISH solamente utilizando dos haptenos y, por consiguiente, dos colorantes. En la solicitud de patente WO 2012/150022 A1 se describe un procedimiento que da a conocer la aplicación de tres sondas diferentes  
25 mediante el método BrISH utilizando los tres marcadores, biotina, digoxigenina y DNP, que conducen a tres colores diferentes, para la detección de inversiones

El documento WO 2005/111235 A2 describe un procedimiento que describe el uso de tres colores para fines de detección. Sin embargo, la región cromosómica que es marcada por el tercer marcador de una sonda no se ve afectada directamente por una modificación, de modo que en el caso de una variación en la estructura del cromosoma se elimina la primera señal de fusión, de modo que se forma una nueva señal de escisión y una nueva  
30 señal de fusión. Este procedimiento emplea sondas que están marcadas en cada caso solo con un marcador. Además, con estos procedimientos solo se puede detectar una posible translocación que viene determinada por las sondas.

El documento WO 02/093130 A3 da a conocer un procedimiento para la detección de translocaciones cromosómicas utilizando dos o, alternativamente, cuatro marcadores o bien colorantes que en cada caso flanquean de modo distal y proximal los puntos de ruptura de los dos puntos de ruptura implicados en una translocación. Este procedimiento no ofrece posibilidad alguna de detectar más de una translocación en la región del punto de ruptura que es  
35 flanqueada por las sondas.

la señal surge. Este método emplea sondas marcadas con un solo marcador a la vez. Además, con estos métodos, solo se puede detectar una posible translocación dictada por las sondas

El documento WO 02/093130 A3 da a conocer un procedimiento para la detección de translocaciones cromosómicas utilizando dos o, alternativamente, cuatro marcadores o bien colorantes que en cada caso flanquean de modo distal y proximal los puntos de ruptura de los dos puntos de ruptura implicados en una translocación. Este procedimiento no ofrece posibilidad alguna de detectar más de una translocación en la región del punto de ruptura que es  
45 flanqueada por las sondas.

En conjunto, se puede establecer, por consiguiente, que con los procedimientos conocidos del estado de la técnica no es posible detectar al mismo tiempo o bien de forma simultánea de una manera eficaz varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí en células o bien tejidos mediante la hibridación *in situ*.

Una asociación simultánea o bien paralela de regiones de ADN o bien cromosomas definidas en el marco de la hibridación *in situ* solo se conoce hasta ahora en el caso de procedimientos para la detección de cromosomas enteros con un tamaño en seres humanos entre aproximadamente 50 Mpb y 250 Mpb o regiones cromosómicas mayores, p. ej., brazos de cromosomas, utilizando las denominadas sondas de pintura de cromosomas completos (WCP) o sondas de pintura de cromosomas parciales (PCP). Con las técnicas en las que se fundamentan, p. ej., mFISH (FISH multiplex), SKY-FISH (cariotipado espectral), FISH multicolor, COBRA-FISH (FISH marcado por  
55 relación binaria combinada) o también FISH de 24 colores, pueden marcarse y diferenciarse aprovechando aproximadamente cuatro a siete colorantes de fluorescencia diferentes, en conjunto veinticuatro sondas de pintura de cromosomas diferentes. En un procedimiento similar, en una denominada FISH de 42 colores se pueden marcar de manera diferente las sondas específicas de los brazos del cromosoma de todos los cromosomas. Los

- procedimientos antes mencionados son adecuados, sin embargo, solo para células que se encuentran en la metafase. Los procedimientos antes mencionados solo son posibles, dado que con las sondas utilizadas en los mismos solo pueden evaluarse regiones genómicas/cromosómicas en metafases de material cromosómico al menos esencialmente sin transposición. Con procedimientos de este tipo no es posible un análisis de las células en la interfase que, en general, en principio permite un análisis del material genético de tumores sólidos. Además de ello, las sondas que pasan a emplearse en este caso pueden ser detectadas de forma relativamente sencilla, dado que fijan como objetivo grandes regiones. La evaluación de estos análisis no puede tener lugar de forma manual, es decir, teniendo en cuenta las señales en el microscopio de fluorescencia, sino únicamente de forma basada en ordenador con ayuda de un software de evaluación adecuado.
- 5
- 10 Los métodos y combinaciones de sondas conocidos actualmente en el estado de la técnica para BrISH y FISH en relación con mutaciones cromosómicas o bien aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, en particular en relación con tumores o bien enfermedades cancerígenas, están ligados con determinadas desventajas. Así, no existen composiciones de sondas específicas de locus y métodos que permitan una detección y discriminación segura, sencilla y rápida de varias mutaciones cromosómicas o bien aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas potenciales diferentes.
- 15
- En particular, en el caso de las mutaciones cromosómicas estructurales no es en absoluto posible o solo lo es con dificultad el análisis simultáneo o paralelo de varias mutaciones cromosómicas diferentes que no se condicionan, es decir, que no intercambian material cromosómico alguno o bien que no son recíprocas, en particular en enfoques de separación discontinuos en los que se fundamentan.
- 20
- Por lo tanto, la presente invención tiene por misión proporcionar un procedimiento o bien una composición que sea adecuado o bien adecuada para la detección o bien el análisis de mutaciones cromosómicas o bien aberraciones cromosómicas y que evite al menos ampliamente o bien al menos debilite los inconvenientes del estado de la técnica precedentemente descritos.
- 25
- En particular, la presente invención tiene por misión proporcionar un procedimiento, el cual posibilite una detección fiable y simultánea de varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, en particular aberraciones cromosómicas independientes entre sí (es decir, no recíprocas), en particular en un enfoque. De igual manera, la presente invención tiene por misión proporcionar un procedimiento que, además de ello, posibilite también la asociación de aberraciones cromosómicas a una determinada región del cromosoma o bien del ADN.
- 30
- Para la solución del problema precedentemente expuesto, la presente invención propone un procedimiento para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, de acuerdo con la reivindicación 1; ejecuciones ventajosas adicionales son objeto de las reivindicaciones dependientes respectivas.
- 35
- Además, es objeto de la presente invención una composición para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva o bien una composición para uso en el tratamiento profiláctico o bien terapéutico o bien en el diagnóstico o bien pronóstico de enfermedades relacionadas con aberraciones cromosómicas.
- De nuevo, otro objeto de la presente invención es el uso de una composición según la presente invención de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva.
- Además, la presente invención se refiere al uso de al menos tres, preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus, diferentes entre sí, de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva.
- 40
- Además, es objeto de la presente invención el uso de al menos una sonda de hibridación específica de locus marcada con al menos dos marcadores de detección de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva.
- Finalmente, es objeto de la presente invención un kit o bien kit de partes o conjunto para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí; otras propiedades ventajosas son objeto de la reivindicación subordinada respectiva.
- 45
- Se sobreentiende que ejecuciones, formas de realización o similares particulares en lo que sigue, que solo se describen en relación con un aspecto de la invención, son válidas también de manera correspondiente en relación con los otros aspectos de la invención, sin que esto requiera una mención expresa.
- Además, en el caso de todos los datos cuantitativos relativos o bien porcentuales, en particular referidos al peso, mencionados en lo que sigue se ha de tener en cuenta que estos se han de elegir por parte del experto en la materia en el marco de la presente invención de manera que en la suma de las sustancias constitutivas, sustancias activas, aditivos o bien coadyuvantes o similares respectivos resulte siempre 100% o bien 100% en peso. Sin embargo, esto se sobreentiende por parte del experto en la materia.
- 50
- Por lo demás, se cumple que el experto en la materia pueda desviarse de los datos numéricos, de intervalos o cuantitativos recogidos en lo que sigue, referidos a la aplicación o condicionados por el caso particular, sin que abandone el marco de la presente invención.
- 55

Además, se cumple que todos los datos de parámetros o similares mencionados en lo que sigue pueden determinarse o bien calcularse con procedimientos de determinación normalizados o explícitamente indicados o bien con métodos de determinación en sí habituales para el experto en la materia.

5 Para la solución del problema precedentemente mencionado, la presente invención - conforme a un **primer** aspecto de acuerdo con la invención - propone un procedimiento para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, en particular aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, preferiblemente aberraciones cromosómicas estructurales mediante hibridación *in situ* por detección de regiones de cromosomas y/o del ADN en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, en el que la hibridación *in situ* se lleva a cabo como hibridación *in situ* en interfase,

10 y en el que la hibridación *in situ* se lleva a cabo con al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en el que, en particular, para generar al menos una señal mixta, al menos una de las sondas de hibridación específica de locus se marca con al menos otro marcador de detección distinto del primer marcador de detección, referida a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, de modo que se genera un modelo de señales, y

15 en el que aberraciones cromosómicas presentes son identificadas con ayuda del modelo de señales y/o son asociadas a una región del cromosoma y/o del ADN.

20 Con otras palabras, la presente invención se fundamenta en el principio base de posibilitar, mediante la generación deliberada de señales mixtas en modelos de señales generados mediante hibridaciones *in situ* en interfase, posibilitar la detección paralela o bien simultánea de varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, en particular, aberraciones cromosómicas independientes entre sí, es decir, no recíprocas, en una muestra biológica, así como su asociación a regiones de cromosomas o bien de ADN detectadas.

25 En particular, por consiguiente, en el marco de la presente invención puede estar previsto que en el caso de las aberraciones cromosómicas se trate de aberraciones cromosómicas independientes entre sí. Expresado con otras palabras, conforme a la invención puede estar previsto que las aberraciones cromosómicas no sean dependientes una de otra. De igual manera, puede estar previsto que las aberraciones cromosómicas no sean recíprocas.

De acuerdo con una forma de realización particular de la presente invención, se prefiere, además, que las aberraciones cromosómicas no estén relacionadas con aberraciones cromosómicas recíprocas o bien independientes entre sí, o bien no estén asociadas con las mismas.

30 La presente invención está ligada a numerosas ventajas y particularidades que se discuten en lo que sigue de una manera no limitante y que se han de evaluar como un indicio de la patentabilidad de la presente invención.

35 En el marco de la presente invención se ha conseguido, en conjunto y de manera totalmente sorprendente, proporcionar un procedimiento para la detección de aberraciones cromosómicas que, en el marco de una hibridación *in situ* en interfase, permita, por una parte, una detección inequívoca de varias aberraciones cromosómicas estructurales o bien numéricas posibles y, por otra parte, la diferenciación inequívoca de estas aberraciones cromosómicas o bien la asociación inequívoca de las aberraciones cromosómicas detectadas a determinadas regiones de cromosomas o bien del ADN determinadas en un único enfoque de hibridación. En particular, en el caso de las aberraciones cromosómicas se puede tratar de aberraciones cromosómicas independientes entre sí que no se condicionan o bien que no son recíprocas. Hasta ahora, esto no era posible en el estado de la técnica, en particular en el marco de hibridaciones *in situ* en interfase.

40 Con el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden analizar claramente de manera más rápida y eficaz, por consiguiente, en particular muestras biológicas a investigar en cuanto a aberraciones cromosómicas, tales como, por ejemplo, tejidos tumorales, en particular tejidos tumorales, dado que una muestra individual puede ser examinada paralelamente o bien en un enfoque en cuanto a varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí. Además de ello, posibles aberraciones cromosómicas detectadas pueden ser asociadas a una región del ADN o bien del cromosoma definida, o bien concreta.

45 Además, con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención se puede reducir de manera significativa la cantidad de muestra necesaria para la detección de aberraciones cromosómicas. Esto es particularmente ventajoso ante los antecedentes de que la extracción de tejido para fines de investigación, en particular en relación con el diagnóstico o bien reconocimiento de un análisis continuo de enfermedades cancerígenas, que mientras tanto tiene lugar habitualmente mediante biopsia con aguja fina, la cual permite únicamente la extracción de una cantidad limitada de muestra, mientras que, por el contrario, biopsias abiertas, que permiten también la extracción de cantidades mayores de tejido, se llevan a cabo de manera crecientemente menos frecuente.

55 Además, en virtud de la elevada eficiencia del procedimiento de acuerdo con la invención se reduce la cantidad necesaria de materiales en ocasiones costosos tales como enzimas, colorantes de fluorescencia y similares, para la realización de la hibridación *in situ*, de modo que el procedimiento es también ventajoso en relación con aspectos económicos y ecológicos.

Para una mejor comprensión de la presente invención se definen en lo que sigue las expresiones y los términos centrales del procedimiento de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, bajo la expresión de las aberraciones cromosómicas, denominadas de manera sinónima también como anomalías cromosómicas, se entienden, en particular, aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas. En el caso de aberraciones cromosómicas estructurales se presentan variaciones en la estructura de un cromosoma de modo que éstas se pueden designar también como mutación cromosómica. En particular, en este caso se puede tratar de inversiones, translocaciones, deleciones, duplicaciones de segmentos, inserciones, duplicaciones o bien amplificaciones. Por el contrario, aberraciones cromosómicas numéricas conducen a una modificación del número de cromosomas. De manera sinónima se utiliza también la expresión mutación del genoma. En el caso de aberraciones cromosómicas o bien mutaciones del genoma numéricas puede tratarse, en particular, de aneuploidías o bien poliploidías. El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la detección de aberraciones cromosómicas estructurales.

La hibridación *in situ* empleada de acuerdo con la invención se basa en la hibridación o bien el emparejamiento de bases complementarias de cadenas sencillas de ácidos nucleicos, en particular cadenas sencillas de ADN, de modo que en una muestra, tal como un tejido o un preparado celular, se pueden detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos. En el marco de la hibridación *in situ* se hibridan sondas de hibridación marcadas de forma directa o indirecta producidas de forma sintética, en particular específicas de locus, con cadenas sencillas de ácidos nucleicos de la sonda y, a continuación, se detectan.

Básicamente, la hibridación *in situ* puede tener lugar o bien puede llevarse a cabo en diferentes estadios del ciclo celular de las células o bien núcleos celulares examinados, habiéndose establecido una realización en la metafase, cuando los cromosomas se presentan en estado condensado, o en la interfase, cuando los cromosomas se presentan descondensados. En función del objetivo o bien la finalidad de la hibridación *in situ* no siempre es posible una realización en cromosomas condensados en la metafase, en particular, por ejemplo en el caso de la investigación de las células de tumores sólidos en cuanto a aberraciones cromosómicas. De acuerdo con la invención, por lo tanto, está previsto llevar a cabo la hibridación *in situ* en células o bien núcleos celulares que se encuentren en la interfase.

Por sondas de hibridación específicas de locus se entienden en el marco de la presente invención para una determinada región del cromosoma o bien región del ADN sondas específicas o bien complementarias a una región del cromosoma o bien región del ADN determinada del material de ADN o bien del material genético en una muestra a investigar. Habitualmente, las sondas de hibridación utilizadas de acuerdo con la invención se basan en ácidos nucleicos o bien segmentos de ácidos nucleicos y están en condiciones de unirse o bien de hibridarse específicamente a la región del cromosoma o bien a la región del ADN a detectar. La región del cromosoma o bien la región del ADN a detectar puede presentar una longitud variable. En particular, puede estar previsto que una región del cromosoma o bien región del ADN a detectar comprenda, parcialmente o por completo, un único gen o bien un gen individual. De igual manera, puede estar también previsto que una región del cromosoma o bien región del ADN a detectar comprenda, parcialmente o por completo, varios genes, preferiblemente genes contiguos, preferiblemente dos genes.

En lo que afecta a la ejecución de acuerdo con la invención de las sondas de hibridación en especial puede estar particularmente previsto que una sonda de hibridación específica de locus se base en varios, en particular en una pluralidad de segmentos de ácidos nucleicos (sinónimamente también segmentos de sonda) que en su conjunto se designan como una sonda de hibridación específica de locus. Además de ello, es posible - aun cuando menos preferido - que las sondas de hibridación específicas de locus se basen en un único segmento de ácido nucleico o bien se formen mediante un único segmento de ácido nucleico.

Marcadores de detección designan en el marco de la presente invención materiales o bien sustancias que se acoplan para fines de determinación o bien de detección a ácidos nucleicos o bien a segmentos de ácidos nucleicos, en particular sondas de hibridación. La elección de marcadores de detección adecuados se encuentra en el conocimiento habitual del experto en la materia y no requiere de explicaciones adicionales en este punto. Los segmentos de ácidos nucleicos marcados con marcadores de detección y unidos o bien hibridados en el segmento de ADN o bien cromosoma a determinar o bien a detectar, mediante hibridación *in situ* pueden ser detectados directa o indirectamente por parte del experto en la materia mediante procedimientos en sí conocidos y adaptados a los marcadores de detección utilizados, por ejemplo mediante microscopía de fluorescencia o bien tras reacción particularmente enzimática o bien visualización mediante sustratos colorantes que han reaccionado enzimáticamente mediante microscopía de campo claro. En particular, mediante los marcadores de detección en las sondas de hibridación específicas de locus, en el marco de la hibridación *in situ* se genera un modelo de señales que sirve como base para la investigación de una muestra en cuanto a posibles aberraciones cromosómicas.

Además, la expresión "marcador de detección" utilizada de acuerdo con la invención se refiere en lo que sigue a la clase o bien al tipo de marcador de detección y no al dato numérico de moléculas de marcadores de detección, es decir, formulaciones tales como "al menos un marcador de detección" se refieren a un tipo determinado de un marcador de detección o bien a la elección determinada de un marcador de detección. La expresión "varios marcadores de detección" se refiere, por consiguiente, asimismo a la elección de marcadores de detección

diferentes entre sí de tipo diferente y no al número empleado de moléculas de marcadores de detección. El hecho de que en el marco del marcaje de sondas de hibridación éstas sean acopladas habitualmente con más de una molécula de marcador de detección lo sobreentiende el experto en la materia.

5 Las sondas de hibridación específicas de locus empleadas de acuerdo con la invención, en particular segmentos de sondas o bien segmentos de ácidos nucleicos, se hibridan, por consiguiente, específicamente a una región del ADN o bien del cromosoma elegida del material genético, en una sonda y generan un modelo de señales en base al marcador de detección acoplado en el marco de la hibridación *in situ*. Por un modelo de señales se entiende en el marco de la presente invención la totalidad de todas las señales generadas mediante la hibridación *in situ* en base a las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con marcadores de detección.

10 A este respecto, en el marco de la presente invención se ha demostrado, sorprendentemente, que mediante el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus con al menos dos marcadores de detección diferentes entre sí se puedan generar en el modelo de señales, señales mixtas bien detectables y, además de ello, bien diferenciables de las restantes señales, las cuales permiten la asociación de una aberración cromosómica separada a una región del ADN o bien del cromosoma detectada. En el caso de una señal mixta en el sentido de la invención se trata, por consiguiente, de una señal que es generada por al menos dos, pero igualmente también por varios marcadores de detección diferentes entre sí que se encuentran en una sonda de hibridación específica de locus. Dado que las señales mixtas son generadas por los al menos dos, en particular varios marcadores de detección de una sonda de hibridación específica de locus, éstas son visibles también en el caso de aberraciones cromosómicas en el modelo de señales de la hibridación *in situ* o bien se mantienen también en el caso de aberraciones cromosómicas. Formas de realización o bien ejecuciones posibles de las sondas de hibridación específicas de locus para la generación de señales mixtas se explican todavía con detalle más adelante.

Formas de realización preferidas del procedimiento de acuerdo con la invención se exponen en detalle en lo que sigue:

25 De acuerdo con una primera forma de realización de acuerdo con la invención, puede estar previsto que los primeros marcadores de detección de las sondas de hibridación específicas de locus empleadas sean en cada caso iguales. De acuerdo con una segunda forma de realización de acuerdo con la invención, igualmente preferida, puede estar previsto que las sondas de hibridación específicas de locus empleadas estén marcadas con primeros marcadores de detección en cada caso diferentes entre sí.

30 Con otras palabras, de acuerdo con la invención puede estar previsto que las sondas de hibridación específicas de locus empleadas - de forma puramente a modo de ejemplo y no limitativa - presenten como primer marcador de detección, p. ej., el mismo colorante de fluorescencia o el mismo hapteno.

35 De igual manera, las sondas de hibridación específicas de locus empleadas presentan, por ejemplo - y asimismo no de forma limitante - colorantes de fluorescencia diferentes entre sí, haptenos diferentes entre sí o similares como en cada caso un primer marcador de detección. Un marcaje con primeros marcadores de detección diferentes entre sí se ha manifestado ventajoso, en particular en relación con la detección de aberraciones cromosómicas que van acompañadas de rupturas del cromosoma tales como translocaciones o bien inversiones.

En lo que se refiere, además de ello, a la detección de acuerdo con la invención de aberraciones cromosómicas, está de acuerdo con la invención el que en la muestra se detecten y/o determinen al menos dos, en particular varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí de una pluralidad de posibles aberraciones cromosómicas.

40 De igual manera, puede estar previsto que en la muestra se determinen al menos dos, en particular varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí de una pluralidad de posibles aberraciones cromosómicas de forma paralela, en particular simultánea.

45 De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, puede estar previsto que el procedimiento de acuerdo con la invención se lleve a cabo como procedimiento múltiple para la determinación simultánea de varias aberraciones cromosómicas diferentes entre sí.

50 Una particular ventaja - tal como ya se ha expuesto precedentemente - del procedimiento de acuerdo con la invención con respecto a los procedimientos conocidos en el estado de la técnica para la detección de aberraciones cromosómicas mediante hibridación *in situ* estriba, por consiguiente, en que ahora ya se pueden examinar muestras, en particular sobre la base de células o bien núcleos celulares que se encuentran en la interfase, en un único enfoque de hibridación de manera simultánea o bien paralela en cuanto a varias posibles aberraciones cromosómicas bajo la asociación de éstas a una determinada región del ADN o bien del cromosoma.

55 A este respecto, puede estar previsto, en particular, que aberraciones cromosómicas en el modelo de señales sean identificadas mediante la al menos una señal mixta, en particular varias señales mixtas o bien sean asociadas a las regiones del cromosoma y/o del ADN a detectar. A este respecto, se remite en particular a la Fig. 7, de la cual se puede deducir a modo de ejemplo la detección de acuerdo con la invención de aberraciones cromosómicas en forma de amplificaciones. De acuerdo con la Fig. 7, se examinan cuatro regiones del cromosoma diferentes, empleándose cuatro sondas de hibridación diferentes entre sí, de las cuales tres están marcadas con al menos un marcador de

detección adicional para la generación de señales mixtas específicas en cada caso (véase la Fig 7a)). Sobre la base del marcaje de tres de las cuatro regiones del cromosoma con una señal mixta en cada caso específica puede asociarse el "racimo" generado mediante la amplificación de una región detectada del cromosoma en el modelo de señales de una sonda de hibridación o bien de una región detectada del cromosoma (véase la Fig. 7b)).

5 De acuerdo con la invención, por consiguiente, puede estar previsto, en particular, que el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus adicionales tenga lugar con el al menos un marcador de detección adicional de modo que las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con al menos un marcador de detección adicional generen en cada caso señales mixtas diferentes entre sí en el modelo de señales.

10 De igual manera, puede estar previsto - en particular, para el caso de que se tengan que detectar aberraciones cromosómicas que no resultan de rupturas del cromosoma, tales como amplificaciones tales como deleciones - que el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus adicionales tenga lugar con al menos otro marcador de detección, de modo que mediante cada una de las sondas de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección adicional en el modelo de señales se genere una señal mixta específica para una región del cromosoma y/o del ADN. A este respecto, en el marco de la presente invención se prefiere, por consiguiente, que  
15 cada una de las regiones detectadas por una sonda de hibridación específica de locus pueda ser asociada a una señal específica, en particular a una señal mixta dentro del modelo de señales.

Además, de acuerdo con la invención se prefiere que el marcaje de otras sondas de hibridación específicas de locus con el al menos un marcador de detección adicional tenga lugar de modo que a cada una de las aberraciones cromosómicas a detectar en el modelo de señales se asocie, con ayuda de una señal mixta específica, una región  
20 del cromosoma y/o del ADN detectada.

En lo que concierne al número de las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con al menos un marcador de detección adicional, dicho número es variable y depende, en particular, del número de las aberraciones cromosómicas a detectar o bien a examinar:

25 De acuerdo con la invención, se prefiere que al menos dos, en particular al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, de preferencia al menos cinco, de manera particularmente preferida al menos seis, de manera muy particularmente preferida al menos siete de otras sondas de hibridación específicas de locus sean marcadas con al menos otro marcador de detección distinto del primero. De igual manera, puede estar previsto que mediante al menos dos, en particular al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, de preferencia al menos cinco, de manera particularmente preferida al menos seis, de manera muy particularmente preferida al menos siete de otras sondas de  
30 hibridación específicas de locus en el modelo de señales se generen en cada caso para una región del cromosoma y/o del ADN, señales mixtas específicas.

Este modo de proceder de acuerdo con la invención antes expuesto es adecuado, en particular, para el caso de que se tengan que detectar aberraciones cromosómicas que no resulten de roturas del cromosoma, tales como amplificaciones o deleciones. Sobre la base de un aumento del número de sondas de hibridación marcadas con al menos uno, preferiblemente varios marcadores de detección adicionales, que en cada caso generan una señal mixta individual, se puede aumentar por consiguiente también el número de aberraciones cromosómicas a detectar o bien  
35 a determinar al mismo tiempo.

De acuerdo con otra forma de realización especial de la presente invención, es además posible detectar aberraciones cromosómicas que resulten de rupturas del cromosoma, tales como, p. ej., translocaciones o  
40 inversiones y asociarlas a una región del cromosoma o bien del ADN determinada:

De acuerdo con esta forma de realización de acuerdo con la invención puede estar previsto que en cada caso dos sondas de hibridación específicas de locus flanqueen un segmento del cromosoma, en particular una zona del punto de ruptura, en donde las sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso un segmento del cromosoma, en particular la zona del punto de ruptura, están marcadas con marcadores de detección diferentes  
45 entre sí, de modo que mediante las sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura se genere en el modelo de señales una señal de fusión, en particular para el caso de que no se presente aberración cromosómica alguna.

Con otras palabras, de acuerdo con esta forma de realización de la presente invención está previsto que las regiones de ADN o bien del cromosoma a detectar se encuentren distales y próximas a segmentos del cromosoma específicamente elegidos, en particular regiones del punto de ruptura potenciales sobre un cromosoma. En este caso, puede estar previsto, en particular, que el segmento del cromosoma dispuesto en posición distal o bien proximal sea detectado con una sonda de hibridación adicional, marcada con al menos otro marcador de detección  
50 distinto del primer marcador de detección.

Por una región del punto de ruptura se entienden en el marco de la presente invención aquellas regiones de un cromosoma que pueden verse afectadas por rupturas del cromosoma. Como consecuencia de rupturas del cromosoma pueden producirse aberraciones cromosómicas en base a transposiciones estructurales, en particular translocaciones o bien inversiones. Para una serie de enfermedades se conocen en cada caso aberraciones cromosómicas específicas para la enfermedad que se basan en rupturas del cromosoma, en particular  
55

translocaciones o bien inversiones. Con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención pueden examinarse, por consiguiente, varias regiones del punto de ruptura, en particular conocidas, en el material genético de una muestra, en particular de una muestra de tejido, en cuanto a la presencia de aberraciones cromosómicas.

5 En el caso de esta forma de realización de acuerdo con la invención se genera, por consiguiente, mediante las dos sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso una región del punto de ruptura, una señal de fusión, la cual es generada en base a los dos marcadores de detección diferentes entre sí de la primera y segunda sonda de hibridación específica de locus, en particular para el caso de que no se presente aberración cromosómica alguna.

10 A diferencia de las señales mixtas ya previamente descritas, que son generadas por diferentes marcadores de detección de una sonda de hibridación específica de locus, las señales de fusión son generadas por sondas de hibridación específicas de locus distintas entre sí que se presentan hibridadas en la muestra en estrecha proximidad una de otra en el material genético o bien el ADN.

15 Con otras palabras, por consiguiente, en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención se genera una señal de fusión para el caso de que en un punto de ruptura flanqueado no se presente aberración cromosómica alguna y las sondas de hibridación específicas de locus empleadas se hibridan en la sonda en estrecha proximidad con el material genético o bien el ADN. Por el contrario, si en la región de un punto de ruptura está presente una aberración cromosómica, las sondas de hibridación específicas de locus empleadas ya no pueden estar en estrecha proximidad en virtud de la transposición estructural de un segmento de ADN. En lugar de una señal de fusión se detectan entonces en el modelo de señales dos señales individuales (denominadas de manera sinónima también  
20 "señal híbrida") que son preferiblemente distintas entre sí.

Además de ello, las sondas de hibridación marcadas con al menos otro marcador de detección diferente del primer marcador de detección generan señales mixtas a base del primer marcador de detección y del al menos otro marcador de detección de la sonda de hibridación respectiva. Estas pueden configurar, por consiguiente, una señal mixta y de fusión con una segunda sonda de hibridación que flanquea un segmento del cromosoma, en particular  
25 una región del punto de ruptura en el modelo de señales, para el caso de que no se presente aberración cromosómica alguna. En el caso de aberraciones cromosómicas se genera, por el contrario, sobre la base de las sondas de hibridación que flanquean en células o bien núcleos celulares normales un segmento del cromosoma, en particular una región del punto de ruptura, de las que al menos una está marcada con un marcador de detección adicional, se generan en el modelo de señales una señal individual así como una señal individual que va acompañada de una señal mixta.  
30

En el marco de la presente invención es posible, por consiguiente, con ayuda de las señales mixtas a base de las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con al menos un marcador de detección adicional, asociar aberraciones cromosómicas a regiones del punto de ruptura definidas o bien regiones del cromosoma o bien del ADN detectadas.

35 Por consiguiente, de acuerdo con la invención se prefiere que en cada caso la sonda de hibridación marcada con al menos un marcador de detección adicional, distinto del primero, genere con la segunda sonda de hibridación específica de locus que flanquea un segmento del cromosoma, en particular una región del punto de ruptura en el modelo de señales, una señal mixta y de fusión, en particular para el caso de que no esté presente aberración cromosómica alguna.

40 Además de ello, puede estar previsto que la sonda de hibridación marcada con al menos un marcador de detección adicional diferente del primero y la segunda sonda de hibridación específica de locus que flanquea un segmento del cromosoma, en particular una región del punto de ruptura, generen en el modelo de señales en cada caso una señal individual, en particular en donde la sonda de hibridación marcada con al menos un marcador de detección adicional en el modelo de señales genera además, una señal mixta, en particular para el caso de que esté presente una  
45 aberración cromosómica.

En particular, en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención puede estar previsto, por consiguiente, que en el modelo de señales se asocien aberraciones cromosómicas mediante señales mixtas a una región del cromosoma y/o del ADN detectada, y/o a un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura.

50 De acuerdo con esta forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención es posible, por consiguiente, representar o bien marcar una serie de regiones del punto de ruptura potenciales mediante la hibridación *in situ* en interfase de manera simultánea en una muestra individual. Para el caso de que no haya tenido lugar aberración cromosómica alguna en los puntos de ruptura marcados, en el modelo de señales se generan señales de fusión, mientras que, por el contrario, la aparición de señales individuales o bien señales divididas indica la presencia de aberraciones cromosómicas. En base a las señales mixtas adicionalmente generadas, pueden  
55 asociarse señales individuales o bien señales divididas a una sonda de hibridación determinada y, por consiguiente, a una región del punto de ruptura determinado (véase la Fig. 1).

En particular, en el marco de la presente invención puede estar previsto que se empleen al menos seis, preferiblemente al menos ocho, de preferencia al menos diez, de manera particularmente preferida al menos doce,

5 todavía más preferiblemente al menos catorce sondas de hibridación específicas de locus diferentes, en donde en cada caso dos sondas de hibridación específicas de locus flanquean en cada caso a un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura, o bien que a lo sumo se empleen veinticuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes, flanqueando en cada caso dos sondas de hibridación específicas de locus en cada caso a un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura.

10 Además, de acuerdo con la invención se prefiere que el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus adicionales tenga lugar con al menos otro marcador de detección diferente del primero, de modo que en el modelo de señales, con ayuda de señales de fusión y mixtas, pueda identificarse y/o asociarse cada uno de los segmentos del cromosoma flanqueados, en particular la región del punto de ruptura y/o cada una de las regiones del cromosoma y/o ADN a detectar.

15 A este respecto, se prefiere particularmente, de acuerdo con la invención, que una primera región del punto de ruptura a investigar esté flanqueada por dos sondas de hibridación que en cada caso presenten solo un marcador de detección, de modo que esta región del punto de ruptura en el modelo de señales sea visible únicamente mediante una señal de fusión o bien dos señales individuales o divididas. Por el contrario, a cada una de las regiones del punto de ruptura a investigar se asocia, mediante el marcaje de al menos una de las dos sondas de hibridación flanqueantes con al menos un marcador de detección adicional en el modelo de señales, una señal mixta específica o bien individual, de modo que en el modelo de señales se pueda representar en conjunto, de forma diferenciable entre sí, una pluralidad de regiones del cromosoma o bien del ADN, en particular regiones del punto de ruptura.

20 De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, puede estar previsto que

(a) una primera sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección A y una segunda sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección B flanqueen un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura, y generen en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* una señal de fusión A-B,

25 (b) 2 a 12 sondas de hibridación específicas de locus adicionales flanqueen hasta seis segmentos del cromosoma adicionales, en particular regiones del punto de ruptura, en donde asimismo en cada caso una de las dos sondas de hibridación específicas de locus que flanquean un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura, está marcada con un marcador de detección A, y en cada caso una de las dos sondas de hibridación específicas de locus que flanquean un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura, esté marcada con un marcador de detección B, de modo que las sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura, generan en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* una señal de fusión A-B, y

30 (c) al menos una, preferiblemente varias de las sondas de hibridación específicas de locus están marcadas con al menos un marcador de detección X adicional, de modo que las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con al menos un marcador de detección adicional generan en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* señales de fusión y mixtas A-B/X,

en donde en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* las señales de fusión y mixtas A-B/X se modifican, en el caso de aberraciones cromosómicas, a señales mixtas A/X y/o B/X, y/o

40 en donde en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* las señales de fusión A-B se modifican, en el caso de aberraciones cromosómicas, a señales individuales A y/o B,

de modo que aberraciones cromosómicas, con ayuda del modelo de señales generado mediante la hibridación *in situ*, son asociadas a una región del cromosoma y/o del ADN y/o a un segmento del cromosoma, en particular la región del punto de ruptura, flanqueado por dos sondas de hibridación específicas de locus.

45 En lo que afecta además de ello al marcador de detección X previsto en la forma de realización previamente descrita, éste puede estar formado por un único marcador de detección, en particular un marcador de detección X<sub>1</sub>.

Además de ello, puede estar previsto que el marcador de detección X esté formado por varios marcadores de detección diferentes entre sí, preferiblemente elegidos del grupo de los marcadores de detección X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ..., y/o X<sub>n</sub>, en donde el índice "n" representa un número natural entero de 1 a 20, en particular de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5.

50 A este respecto, puede estar previsto, además, que los marcadores de detección X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ..., y/o X<sub>n</sub> para la generación de señales mixtas diferentes entre sí, en particular específicas, se empleen en relaciones diferentes entre sí.

De acuerdo con una forma de realización adicional, es también posible que el marcador de detección X esté formado por varios marcadores de detección diferentes entre sí, preferiblemente elegidos del grupo de los marcadores de detección X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y/o X<sub>6</sub>. A este respecto, se prefiere que los marcadores de detección X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y/o X<sub>6</sub> para la generación de señales mixtas diferentes entre sí, en particular específicas, se empleen en relaciones diferentes entre sí.

En el marco de la presente invención se ha conseguido, por consiguiente, de manera sorprendente que incluso sobre la base de unos pocos marcadores de detección individuales se pueda generar una pluralidad de señales mixtas específicas, marcando para la generación de señales mixtas las sondas de hibridación específicas de locus con al menos un marcador de detección adicional para la generación de señales mixtas, con varios marcadores de detección diferentes entre sí.

En particular, de acuerdo con la invención puede estar previsto que para la generación de señales mixtas en el marco del marcaje de sondas de hibridación específicas de locus se empleen varios marcadores de detección, en particular dos a seis, diferentes entre sí, en relaciones (cuantitativas) en cada caso diferentes entre sí. A modo de ejemplo - y de ningún modo de forma limitante - una sonda de hibridación específica de locus puede presentar - junto al primer marcador de detección - tres marcadores de detección adicionales, ascendiendo en este caso la proporción del primer marcador de detección a 20%, la proporción del segundo marcador de detección a 60% y la proporción del tercer marcador de detección a 20%, referido a los tres marcadores de detección adicionales.

De acuerdo con de nuevo una forma de realización adicional de la presente invención, puede estar previsto que

(a) una primera sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección A y una segunda sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección B flanqueen un primer segmento del cromosoma, en particular una primera región del punto de ruptura y generen en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* una señal de fusión A-B,

(b) una tercera sondas de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección A, y una cuarta sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección B, flanqueen un segundo segmento del cromosoma, en particular una segunda región del punto de ruptura y generen en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* una señal de fusión A-B, y

(c) la tercera sonda de hibridación específica de locus y/o la cuarta sonda de hibridación específica de locus estén marcadas con un marcador de detección  $X_1$  adicional y en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* generen señales de fusión y mixtas A-B/ $X_1$ ,

en donde en el modelo de señales las aberraciones cromosómicas del primer segmento del cromosoma, en particular de la primera región del punto de ruptura, son identificadas mediante señales individuales A y/o B y/o en donde en el modelo de señales las aberraciones cromosómicas del segundo segmento del cromosoma, en particular de la segunda región del punto de ruptura, son identificadas mediante señales mixtas A/ $X_1$  y/o B/ $X_1$ , y/o son asociadas al segundo segmento del cromosoma, en particular a la segunda región del punto de ruptura.

En lo que concierne al modo de proceder para el análisis de aberraciones cromosómicas en el modelo de señales generado mediante la hibridación *in situ* se ha manifestado particularmente eficiente que en una primera etapa se detecten y/o analicen las señales de fusión generadas por parte de los primeros marcadores de detección, y en una etapa subsiguiente, en el caso de la aparición de señales individuales, tenga lugar una detección y/o un análisis de las señales mixtas y su asociación a las regiones del cromosoma y/o del ADN detectadas.

En particular, esto puede tener lugar de manera que primeramente en el caso del análisis del modelo de señales se utilice un filtro a través del cual sean visibles únicamente las señales generadas por los primeros marcadores de detección, es decir, las señales de fusión o bien señales individuales potenciales. Dado que solo en el caso de la aparición de señales individuales en el modelo de señales se presentan aberraciones cromosómicas, las cuales requieren de un análisis ulterior, se representan, en particular mediante el uso de otro filtro, en particular de un filtro adecuado para la representación de las señales mixtas, también las señales mixtas, con ayuda de las cuales - en visualización conjunta con la posición de las señales de fusión o bien individuales en el modelo de señales - se pueden asociar aberraciones cromosómicas a una región del cromosoma o bien del ADN específica.

Además, de acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención puede estar previsto que la detección del modelo de señales tenga lugar mediante un análisis sustentado por ordenador. Esto es particularmente ventajoso cuando para la generación de señales mixtas, las sondas de hibridación estén marcadas con más de al menos un marcador de detección adicional, preferiblemente al menos dos marcadores de detección adicionales, preferiblemente varios marcadores de detección adicionales en relaciones diferentes o bien definidas entre sí. Los análisis sustentados por ordenador permiten, con ayuda de mediciones de las porciones de color o bien colores en los que se fundamentan también la diferenciación de señales mixtas que no pueden ser diferenciadas una de otra a simple vista o bien en el caso de observación al microscopio de fluorescencia.

De acuerdo con la invención, por consiguiente, puede estar previsto, en particular, que la detección de translocaciones o bien inversiones tenga lugar utilizando hasta veinticuatro sondas de hibridación específicas de locus, en donde en cada caso dos sondas de hibridación específicas de locus flanquean de manera distal y proximal a una región del punto de ruptura respectivo, y sondas de hibridación específicas de locus individuales de estos pares de sondas son marcadas al mismo tiempo con marcadores de detección adicionales. Preferiblemente, por consiguiente, en un enfoque pueden examinarse hasta doce regiones del punto de ruptura diferentes con hasta doce enfoques tandas de separación diferentes para la representación de hasta doce translocaciones o bien inversiones. La detección de una translocación específica tiene lugar a través de la identificación de las separaciones de los

pares de sondas o bien de las señales de fusión de los pares de sondas y con ayuda de los colores mixtos o bien señales mixtas respectivos.

5 Asimismo es posible detectar, con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención, translocaciones e inversiones utilizando hasta veinticuatro sondas de hibridación específicas de locus, en donde en cada caso dos sondas flanquean de modo distal y proximal a una región del punto de ruptura respectiva, estos pares de sondas están marcados en cada caso con los mismos marcadores A y B, estando marcada en cada caso una sonda con el marcador A y la otra sonda en cada caso con el marcador B, y sondas individuales de estos pares de sondas están marcadas al mismo tiempo con marcadores de detección X adicionales. La detección de una translocación y/o  
10 inversión específica tiene lugar a través de la modificación de señales de fusión y mixtas A-B/X específicas en el caso de una aberración cromosómica a señales mixtas A/X y/o B/X nuevas y separadas. En este caso, opcionalmente pueden no utilizarse también en el caso de un par de sondas marcador X adicional alguno, de modo que solo para este par de sondas resultan la señal A y/o B separadas habituales en el caso de la aberración en la que se fundamenta.

15 Por consiguiente, por vez primera es también posible que en un primer análisis de varias mutaciones cromosómicas diferentes, potencialmente detectables, solo de las señales A y B aprovechando sistemas de filtración específicos, p. ej., filtros dobles para las señales A y B, que únicamente visualizan las señales A y B, pero no otros marcadores X, primeramente pueda afirmarse rápidamente si ha tenido lugar en todo caso una separación de las señales de fusión A-B y, en general, se presente una translocación o bien inversión. Solo en el caso de la aparición positiva de señales A o bien B separadas tiene lugar entonces la evaluación de las señales mixtas con participación del marcador X y, con ello, la asociación inequívoca de la translocación en la que se fundamenta.  
20

En lo que sigue se describen además otras particularidades o bien posibilidades de ejecución del procedimiento de acuerdo con la invención que son válidas de manera correspondientes para todas las formas de realización del procedimiento de acuerdo con la invención previamente expuestas:

25 En lo que se refiere a las distintas regiones del cromosoma o bien del ADN a detectar en cada caso mediante una sonda de hibridación específica de locus individual, éstas presentan, en el marco de la presente invención, preferiblemente una longitud menor que 5 Mpb, en particular menor que 2 Mpb, preferiblemente menor que 1 Mpb, preferiblemente menor que 750 kpb, de manera particularmente preferida menor que 500 kpb. De igual manera, puede estar previsto que la región del cromosoma y/o del ADN a detectar mediante una sonda de hibridación específica de locus individual presente una longitud de al menos 500 pb, en particular de al menos 1 kpb,  
30 preferiblemente de al menos 5 kpb, de preferencia de al menos 10 kpb. Finalmente, puede estar previsto también que la región del cromosoma y/o del ADN a detectar mediante una sonda de hibridación específica de locus individual presente una longitud en el intervalo de 500 pb a 5 Mpb, en particular en el intervalo de 1 kpb a 2 Mpb, preferiblemente en el intervalo de 5 kpb a 1 Mpb, preferiblemente en el intervalo de 10 kpb a 750 kpb, de manera particularmente preferida en el intervalo de 10 kpb a 500 kpb.

35 En lo que concierne, además de ello, a la ejecución adicional de las sondas de hibridación específicas de locus empleadas de acuerdo con la invención, éstas se presentan preferiblemente en forma de segmentos de ácidos nucleicos, en particular en forma de polinucleótidos, polinucleótidos modificados, segmentos de ácidos nucleicos modificados, oligonucleótidos y/u oligonucleótidos. En lo que se refiere especialmente a los segmentos de ácidos nucleicos modificados se puede tratar, en particular, de *ácidos nucleicos bloqueados* (LNA) o ácidos nucleicos peptídicos (PNA).  
40

De acuerdo con una primera forma de realización de la presente invención puede estar previsto, además, que las sondas de hibridación específicas de locus sean formadas por en cada caso un segmento de ácido nucleico individual, que en cada caso cubre a la región del cromosoma y/o del ADN a detectar.

45 De acuerdo con otra forma de realización y además de ello preferida de la presente invención puede estar previsto también que las sondas de hibridación específicas de locus sean formadas en cada caso por una pluralidad de segmentos de ácidos nucleicos ("segmentos de sondas"), que en cada caso cubren a la región del cromosoma y/o del ADN a detectar. A este respecto, se prefiere, además, que los distintos segmentos de ácidos nucleicos ("segmentos de sondas") de una sonda de hibridación específica de locus presenten una longitud en el intervalo de 5 a 2.000 pb, en particular en el intervalo de 10 a 1.500 pb, preferiblemente en el intervalo de 50 a 1.000 pb.

50 En lo que concierne además de ello a la generación de señales mixtas mediante el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus con al menos un marcador de detección adicional, distinto del primero, para la generación deliberada de señales mixtas, ésta puede tener lugar de manera diferente:

55 De acuerdo con una primera forma de realización al respecto de la presente invención puede estar previsto que para la generación de señales mixtas los segmentos de ácidos nucleicos ("segmentos de sondas") de una sonda de hibridación específica de locus estén marcados, además de con el primer marcador de detección, con otro marcador de detección diferente del primer marcador de detección. Sondas de hibridación marcadas de este modo generan, por consiguiente, una señal mixta que únicamente se basa en dos marcadores de detección diferentes entre sí.

Además de ello, de acuerdo con otra forma de realización de la presente invención - en particular ante los

antecedentes de aumentar la anchura de banda de señales mixtas específicas o bien aumentar el número de señales mixtas específicas o bien diferentes entre sí - puede estar previsto que para la generación de señales mixtas los segmentos de ácidos nucleicos ("segmentos de sondas") de una sonda de hibridación específica de locus estén marcados, además de con el primer marcador de detección, con varios, en particular dos a veinte, preferiblemente dos a diez, de preferencia dos a seis marcadores de detección diferentes del primer marcador de detección. En este caso, puede estar previsto, en particular, que los marcadores de detección se empleen en cantidades diferentes entre sí.

De acuerdo con la invención puede estar previsto, por consiguiente, que para la generación de señales mixtas en el marco del marcaje de sondas de hibridación específicas de locus se empleen varios marcadores de detección diferentes entre sí en relaciones en cada caso diferentes entre sí. Por ejemplo - y de ningún modo de forma limitante - una sonda de hibridación específica de locus puede presentar - además del primer marcador de detección - tres marcadores de detección adicionales, ascendiendo en este caso la proporción del primer marcador de detección a 20%, la proporción del segundo marcador de detección a 60% y la proporción del tercer marcador de detección a 20%, referido a los tres marcadores de detección adicionales.

De acuerdo con esta forma de realización puede estar previsto, por consiguiente, que las sondas de hibridación presenten, además del primer marcador de detección, al menos dos, preferiblemente varios marcadores de detección diferentes entre sí. Mediante el empleo de los distintos marcadores de detección en relaciones diferentes entre sí puede aumentarse en conjunto el número de señales mixtas específicas, en particular diferenciables entre sí, lo cual posibilita de nuevo la detección de un mayor número de aberraciones cromosómicas detectables.

En el marco del marcaje de sondas de hibridación específicas de locus puede estar previsto básicamente, además, de acuerdo con la invención, que fragmentos de ácidos nucleicos individuales de una sonda específica para la hibridación estén marcados con solamente un marcador de detección. En este caso, se puede tratar del primer marcador de detección y/o de cualquier otro marcador de detección (véase la Fig. 2 I)).

Expresado de otro modo, por consiguiente es posible, de acuerdo con la invención, que una primera porción de los segmentos de ácidos nucleicos de una sonda de hibridación específica de locus esté marcada solo con el primer marcador de detección y porciones adicionales de los segmentos de ácidos nucleicos de una sonda de hibridación específica de locus estén marcadas en cada caso con un marcador de detección adicional, diferente del primer marcador de detección. La generación de señales mixtas puede tener lugar, por consiguiente, de acuerdo con una forma de realización de la presente invención, al presentar marcadores de detección diferentes entre sí que forman la señal mixta en segmentos de ácidos nucleicos diferentes entre sí de una sonda específica para la hibridación (véase la Fig. 2 I)).

Además, puede estar previsto que segmentos de ácidos nucleicos individuales de una sonda específica para la hibridación estén marcados con varios marcadores de detección diferentes entre sí, en particular se puede tratar en este caso del primer marcador de detección y/o de cualquier otro marcador de detección (véase la Fig. 2 II)).

De acuerdo con esta forma de realización de la presente invención puede estar previsto, por consiguiente, que los marcadores de detección que forman la señal mixta, distintos entre sí, se presenten en los mismos segmentos de ácidos nucleicos de una sonda específica para la hibridación o bien se presenten conjuntamente sobre los segmentos de ácidos nucleicos de una sonda específica para la hibridación (la denominada "sonda mixta") (véase la Fig. 2 II)).

Además de ello, en el marco puede estar previsto también combinar entre sí las dos formas de realización antes mencionadas para la generación de señales mixtas, es decir, que una parte de los segmentos de ácidos nucleicos que configuran una señal mixta de una sonda de hibridación específica de locus esté marcada solamente con un marcador de detección y que otra o varias partes adicionales de los segmentos de ácidos nucleicos de una sonda específica para la hibridación estén marcadas con al menos dos marcadores de detección diferentes.

Además de ello, también es posible generar señales mixtas cuando entre segmentos de ácidos nucleicos hibridados individuales de una sonda de hibridación específica de locus marcada con al menos un marcador de detección adicional esté presente una separación de como máximo 3 Mpb, en particular de como máximo 2,5 Mpb, preferiblemente de como máximo 2 Mpb, de preferencia de como máximo 1 Mpb, de manera particularmente preferida de como máximo 500 kb, todavía más preferiblemente de como máximo 200 kb. Expresado de otro modo, por consiguiente es posible también de acuerdo con la invención generar una señal mixta cuando entre los distintos segmentos de ácidos nucleicos hibridados de una sonda de hibridación específica de locus marcada con al menos un marcador de detección adicional se presente en estado hibridado un "hueco" de como máximo 3 Mpb, en particular de como máximo 2,5 Mpb, preferiblemente de como máximo 2 Mpb, de preferencia de como máximo 1 Mpb, de manera particularmente preferida de como máximo 500 kb, todavía más preferiblemente de como máximo 200 kb (véase la Fig. 2 III)).

Por consiguiente, se pueden generar señales mixtas, en particular, mediante el uso de "marcadores mixtos" de una sonda individual. En particular, para la formación de las señales mixtas específicas para una región cromosómica o un segmento genómico I) todos los segmentos de una sonda u opcionalmente también solo segmentos individuales

de una sonda pueden estar marcados con varios marcadores o II) segmentos iguales pueden estar marcados con en cada caso marcadores diferentes o III) segmentos alternantes pueden estar marcados con diferentes marcadores, de modo que también aquí finalmente solo sea visible o bien detectable una señal mixta (véanse las Figs. 2 I a III)).

5 Marcadores mixtos y señales mixtas en el sentido del procedimiento de acuerdo con la invención pueden formarse también en este caso cuando segmentos individuales o todos los segmentos antes mencionados bajo I) a I) se solapan solo en parte.

10 Marcadores mixtos pueden resultar también en el sentido del procedimiento de acuerdo con la invención cuando segmentos individuales o grupos de segmentos de una sonda, que están marcados con al menos un marcador y otros segmentos individuales o grupos de segmentos de la sonda que están marcados con al menos otro marcador, presenten una distancia de 2 Mpb, opcionalmente 1 Mpb, opcionalmente 500 kb y opcionalmente 200 kb.

15 Por consiguiente, marcadores mixtos y señales mixtas en el sentido del procedimiento de acuerdo con la invención pueden resultar también cuando se utilicen dos o más sondas de igual secuencia o casi de igual secuencia, es decir, dos o más sondas que fijen como objetivo las mismas regiones cromosómicas específicas o los mismos segmentos genómicos, pero estén marcadas con diferentes marcadores, pudiendo coincidir las sondas mencionadas también solo en un 95%, opcionalmente 90%, opcionalmente 80%, opcionalmente 70%, opcionalmente 60%, opcionalmente 50%, resultando las diferencias mediante variaciones de la secuencia de secuencias básicamente similares o mediante un solapamiento parcial de zonas solo individuales de las sondas.

20 La elección de marcadores de detección adecuados como tales para la realización se encuentra dentro del conocimiento habitual del experto en la materia y tiene lugar en función del método empleado para la realización de la hibridación *in situ*. Habitualmente, mediante la elección de marcadores de detección adecuados puede tener lugar un marcaje directo o un marcaje indirecto de las sondas de hibridación.

25 Resultados particularmente buenos se obtienen en el marco de la presente invención cuando los marcadores de detección se elijan del grupo de colorantes; sustratos colorantes; colorantes de quimioluminiscencia, en particular acridinio; radioisótopos; marcadores de espín; enzimas, en particular fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de soja y/o beta-galactosidasa; haptenos, en particular digoxigenina, biotina, 2,4-dinitrofenol, 5(6)-carboxifluoresceína, rodamina, bromodesoxiuridina, acetilaminofluoreno, trinitrofenol, derivados de trinitrofenol, estradiol y/o 2,4-dinitrofenol; puntos cuánticos; perlas; aminohexileno; pirenos; y/o colorantes de fluorescencia, en particular fluoresceína, derivado de fluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, cumarina, derivado de cumarina, rodamina, derivado de rodamina, tetrametilrodamina, lisamina, Texas Rojo, AMCA, TRITC, colorante IR, colorante Alexa, colorante Dyomics, ficoeritrinas, cascada azul, Oregón Verde 488, Pacífico Azul y/o rodamina verde.

30 En lo que se refiere a la realización de la hibridación *in situ* como tal, ésta puede tener lugar de distinta manera.

En particular, de acuerdo con una primera forma de realización preferida de la hibridación *in situ* puede estar previsto que ésta tenga lugar bajo el marcaje directo de las sondas de hibridación, en particular mediante hibridación *in situ* del fluorescencia (FISH).

35 De igual manera, puede estar previsto que la hibridación *in situ* tenga lugar bajo el marcaje de las sondas de hibridación con colorantes de fluorescencia, en particular para el intervalo de emisión visible, infrarrojo y/o ultravioleta, preferiblemente para los intervalos de emisión verde, naranja/rojo, rojo, oro y/o azul.

40 De acuerdo con otra forma de realización preferida de la hibridación *in situ* puede estar previsto igualmente que ésta tenga lugar bajo marcaje indirecto de las sondas de hibridación, en particular mediante la hibridación *in situ* de campo claro (BrISH).

Además, puede estar previsto de acuerdo con la invención que la hibridación *in situ* tenga lugar bajo el marcaje de las sondas de hibridación con haptenos, en particular biotina, digoxigenina y/o DNP, y subsiguiente detección mediante fosfatasa alcalina acoplada a anticuerpos, peroxidasa acoplada a anticuerpos y/o beta-galactosidasa acoplada a anticuerpos.

45 En lo que concierne al análisis de hibridaciones *in situ* basadas en fluorescencia, éstas tienen lugar preferiblemente utilizando conjuntos de filtros individuales o bien múltiples específicos que permiten, en particular, la representación intencionada de señales de fusión y mixtas.

50 Además de ello, puede ser ventajoso, en particular en el caso de la generación de señales mixtas a base de más de al menos un marcador de detección adicional, en particular en el caso de la generación de marcadores mixtos a base de al menos dos marcadores de detección adicionales, preferiblemente varios marcadores de detección adicionales en relaciones diferentes o bien definidas entre sí, realizar una evaluación mediante análisis sustentado por ordenador. Además de ello, puede estar previsto también, en particular, mediante análisis sustentado por ordenador, proporcionar imágenes superpuestas que permiten una representación común de los modelos de señales de diferentes conjuntos de filtro, individuales o bien múltiples.

55 Básicamente, con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede detectar una pluralidad de diferentes tipos

de aberraciones cromosómicas. En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención puede emplearse para la detección de translocaciones, inversiones, duplicaciones de segmentos, deleciones, inserciones, duplicaciones, aneuploidías y amplificaciones, en particular translocaciones y/o inversiones.

5 En el marco del procedimiento de acuerdo con la invención puede estar previsto en este caso que las aberraciones cromosómicas estén relacionadas con enfermedades, en particular tumores malignos, preferiblemente carcinomas, sarcomas y/o leucemias.

Los genes a examinar en cuanto a aberraciones cromosómicas potenciales se eligen preferiblemente del grupo de  
 10 ALK1, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B, TGF, BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1, RUNX1T1, EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6, WT1, HER2/ERBB2, FGFR1, ALK, CCND1, CDK4, CD274, PDCD1LG2, EGR1, EGFR, ESR1, ETV1, FGF3,4,19, FGFR2, FGFR3, FHIT (RCC), KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYB, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, SOX2, TERT, TOP2A, TP53, TYMS y/o VHL.

15 Resultados particularmente buenos se alcanzan en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención cuando el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea para la detección de inversiones y/o translocaciones: En el marco de una forma de realización preferida de la presente invención, el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea para la detección de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular en tumores de pulmón, estando afectados, particularmente, los genes ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B y/o TGF.

20 Además, puede estar previsto que el procedimiento de acuerdo con la invención se emplee para la detección de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular en linfomas y leucemias, estando afectados, particularmente, los genes BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1 y/o RUNX1T1.

25 De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea para la detección de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular en sarcomas, estando afectados, particularmente, los genes: EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6 y/o WT1.

30 También de acuerdo con la invención puede estar previsto que el procedimiento de acuerdo con la invención se emplee para la detección de inversiones y/o translocaciones, estando afectados particularmente los genes ALK y ROS1.

Además de ello, en el marco de la presente invención se consiguen resultados extraordinarios cuando el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea para la detección de amplificaciones y/o deleciones:

35 Para la detección de amplificaciones o bien deleciones pueden emplearse hasta veinticuatro sondas específicas de locus diferentes, fijando como objetivo en cada caso una sonda una región genómica respectiva, y en donde las distintas sondas están marcadas con marcadores diferentes en diferentes combinaciones y relaciones. Con ayuda de las señales mixtas resultantes en el modelo de señales se pueden diferenciar inequívocamente entre sí las diferentes sondas específicas de locus. Por consiguiente, en un procedimiento se pueden examinar hasta veinticuatro eventos de amplificación y/o deleción diferentes de las regiones genómicas afectadas. La detección de  
 40 una amplificación o deleción específica tiene lugar a través del recuento de las diferentes señales mixtas o bien colores mixtos.

Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea para la detección de diferentes amplificaciones y deleciones, en particular en tumores de mama, intestino y pulmón, estando afectados particularmente los genes HER2/ERBB2, FGFR1, ALK, CCND1, CDK4, CD274, PDCD1LG2, EGR1, EGFR, ESR1, ETV1, FGF3,4,19, FGFR2, FGFR3, FHIT (RCC), KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYB, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN,  
 45 SMARCB1, SOX2, TERT, TOP2A, TP53, TYMS y/o VHL.

Por consiguiente, en conjunto, en el marco de la presente invención se encontró, sorprendentemente, que utilizando sondas específicas de locus con marcadores mixtos resultan señales mixtas bien detectables y evaluables y de forma de segura, que permiten identificar inequívocamente regiones cromosómicas afectadas por una aberración.  
 50 Por consiguiente, el procedimiento de acuerdo con la invención permite por vez primera y de manera sorprendente la detección de varias mutaciones cromosómicas estructurales y/o numéricas diferentes. Esto no es posible con el estado de la técnica.

Otro objeto de la presente invención es – de acuerdo con un segundo aspecto de acuerdo con la invención – una composición para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes, en particular aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, preferiblemente aberraciones cromosómicas estructurales, mediante hibridación *in situ*, en particular mediante la detección de regiones del cromosoma y/o del ADN en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, en particular mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo la composición al menos tres,  
 55

preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, y en donde al menos una de las sondas de hibridación específica de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva.

5 De igual manera, objeto de la presente invención es – de acuerdo con este aspecto de acuerdo con la invención – una composición para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico y/o en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con aberraciones cromosómicas, en particular tumores malignos, preferiblemente carcinomas, sarcomas y/o leucemias, de manera particularmente preferida tumores de pulmón, linfomas, leucemias, sarcomas, carcinomas de mama y/o cáncer de intestino, comprendiendo la composición al menos tres,  
10 preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, y en donde al menos una de las sondas de hibridación específica de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva.

15 A este respecto, puede estar previsto, en particular, que las composiciones de acuerdo con la invención para llevar a cabo un procedimiento tal como se describió precedentemente, estén determinadas o bien se empleen.

En relación con particularidades adicionales a este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes con respecto a los aspectos restantes de acuerdo con la invención que son correspondientemente válidos también en relación con este aspecto de la invención.

20 Además de ello, objeto de la presente invención es – de acuerdo con un tercer aspecto de acuerdo con la invención – el uso de una composición, en particular tal como se describió precedentemente, para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, en particular aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, preferiblemente aberraciones cromosómicas estructurales, mediante hibridación *in situ*, en particular mediante detección de regiones del cromosoma y/o del ADN en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, en particular por medio del procedimiento precedentemente  
25 descrito.

En relación con particularidades adicionales a este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes con respecto a los aspectos restantes de acuerdo con la invención que son correspondientemente válidos también en relación con este aspecto de la invención.

30 Otro objeto de la presente invención es, además – de acuerdo con un cuarto aspecto de acuerdo con la invención – el uso de al menos tres, preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en donde al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, para la detección de aberraciones cromosómicas, en particular aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, mediante hibridación *in situ*, en particular  
35 mediante detección de regiones del cromosoma y/o del ADN en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, preferiblemente por medio de un procedimiento tal como el precedentemente descrito.

40 De igual manera, objeto de la presente invención es de acuerdo con este aspecto de la invención el uso de al menos tres, preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en donde al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, preferiblemente en el marco de un procedimiento de acuerdo con la invención precedentemente descrito, en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con aberraciones cromosómicas, en particular tumores malignos, preferiblemente carcinomas, sarcomas y/o leucemias,  
45 de manera particularmente preferida tumores de pulmón, linfomas, leucemias, sarcomas, carcinomas de mama y/o cáncer de intestino.

En relación con particularidades adicionales a este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes con respecto a los aspectos restantes de acuerdo con la invención que son correspondientemente válidos también en relación con este aspecto de la invención.

50 También es objeto de la presente invención, además, - de acuerdo con un quinto aspecto de acuerdo con la invención – el uso de al menos una sonda de hibridación específica de locus marcada con al menos dos marcadores de detección, junto con al menos, una, en particular al menos dos, preferiblemente al menos tres sondas de hibridación específicas de locus adicionales, diferentes entre sí, marcadas en cada caso con al menos un primer  
55 marcador de detección, para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, en particular aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, preferiblemente aberraciones cromosómicas estructurales, mediante hibridación *in situ*, en particular mediante detección de regiones del cromosoma y/o del ADN en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, preferiblemente por medio de un procedimiento tal como el precedentemente descrito.

En relación con particularidades adicionales a este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes con respecto a los aspectos restantes de acuerdo con la invención que son correspondientemente válidos también en relación con este aspecto de la invención.

5 Finalmente, es objeto de la presente invención – de acuerdo con un sexto aspecto de acuerdo con la invención – un kit o bien kit de partes o conjunto para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí, en particular aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, preferiblemente aberraciones cromosómicas estructurales, mediante hibridación *in situ*, en particular mediante detección de regiones del cromosoma y/o del ADN en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, que comprende al menos tres, preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en donde al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, en particular en donde el kit está previsto y/o se emplea para llevar a cabo el procedimiento precedentemente descrito.

15 A este respecto, puede estar previsto, en particular, que las al menos tres, preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí se presenten en una composición común, en particular en una composición tal como se expuso precedentemente. De igual manera, puede estar previsto que las al menos tres, preferiblemente al menos cuatro sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí se presenten separadas una de otra en composiciones separadas.

20 En relación a particularidades adicionales a este aspecto de la invención, se puede remitir a las realizaciones precedentes con respecto a los aspectos restantes de acuerdo con la invención que son correspondientemente válidas también en relación con este aspecto de la invención.

En lo que sigue se describe con mayor detalle la presente invención con ayuda de dibujos y Ejemplos. Muestran:

La Fig. 1: representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de dos translocaciones.

25 La Fig. 2: representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención que se refiere al uso de varios marcadores para la representación de marcadores mixtos y señales mixtas.

La Fig. 3: esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH cuádruple. “ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH Probe” de la razón social ZytoVision GmbH.

30 La Fig. 4: esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH cuádruple. “ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH Probe” de la razón social ZytoVision GmbH.

La Fig. 5: esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH séxtuple. “ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH Probe” de la razón social ZytoVision GmbH.

La Fig. 6: esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH séxtuple. “ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix II NG-FISH Probe” de la razón social ZytoVision GmbH.

35 La Fig. 7: representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de cuatro aberraciones numéricas.

40 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención, para la detección de dos translocaciones utilizando cuatro sondas y tres marcadores, estando una sonda marcada al mismo tiempo con dos marcadores. Muestra el modelo de señales en el caso de células normales, así como en el caso de células con translocación del gen ALK en 2p23 o del gen ROS1 en 6q22. Ambas regiones del punto de ruptura (ALK y ROS1) son flanqueadas en cada caso por el marcador A o bien B de la sonda ISH cuádruple y proporcionan en cada caso una señal de fusión A-B. Un lado de la región del punto de ruptura de ALK es flanqueado además de ello también con el marcador C, de modo que se produce un marcador mixto A/C.

45 En la interfase de una célula normal (sin aberraciones ALK o ROS1), los loci del gen ROS1 son marcados por señales de fusión A-B y los loci del gen ALK son marcados por señales de fusión A-B que van acompañadas de señales mixtas A/C. En la interfase de una célula afectada por una translocación ALK, el gen ALK afectado por la translocación es marcado por una señal separada del marcador B, así como de una señal mixta A/C separada de la anterior. En la interfase de una célula afectada por una translocación ROS1, el gen ROS1 afectado por la translocación es marcado mediante una señal separada del marcador A, así como de una señal separada del marcador B.

50 La Fig. 2 muestra una representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención que se refiere al uso de varios marcadores para la representación de marcadores mixtos y señales mixtas. Por motivos de claridad, se recogen solamente dos marcadores. Señales mixtas que pueden formarse específicamente para una sonda específica de locus y, por consiguiente, para una región cromosómica o un segmento genómico, pueden formarse

cuando I) segmentos de una sonda son marcados con marcadores en cada caso diferentes y/o II) todos los segmentos de una sonda u, opcionalmente, también solo segmentos individuales de una sonda son marcados con varios marcadores y/o III) segmentos alternantes son marcados con diferentes marcadores, de modo que también aquí finalmente solo se puede visualizar o bien detectar una señal mixta. En este caso, todos o también solo segmentos individuales según I) a III) pueden transponerse o bien solaparse (no representado) y pueden formarse también marcadores mixtos cuando segmentos individuales o grupos de segmentos según I) a III) presenten una distancia de hasta 2 Mpb, p. ej., en el "hueco" representado.

La Fig. 3 muestra un esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH cuádruple correspondiente "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH Probe" de la razón social ZytoVision. La sonda se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que en la región 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales y contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ALK no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas, que se componen de señales mixtas de fluorescencia verde/azules y naranja/azules. Las señales de hibridación para el gen ROS1 no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas.

En la interfase de una célula normal (sin aberraciones ALK o ROS1) aparecen cuatro señales de fusión verde-naranjas en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda dual verde-naranja adecuado, dos señales azules en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda sencilla adecuado, así como en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda triple adecuado, dos señales de fusión verde-naranjas y dos señales de fusión y mixtas verde-naranja/azules (véase la Fig. 3a).

Un locus 2p23 afectado por una translocación ALK está caracterizado por una señal mixta verde/azul separada y una señal mixta naranja/azul separada (véase la Fig. 3b).

Un locus 6q22 afectado por una translocación ROS1 está caracterizado por una señal verde separada y por una señal naranja separada (véase la Fig. 3c).

En el caso de utilizar conjuntos de filtro pasabanda duales adecuados para señales verdes y naranjas, señales verdes y naranjas separadas de las mismas permiten, por consiguiente, solo afirmar en principio que básicamente está presente una translocación ALK o ROS1. Una diferenciación posiblemente relevante desde un punto de vista diagnóstico entre una translocación ALK o ROS1 solo puede tener lugar incorporando las señales de fluorescencia azules. Si las señales verdes separadas solapan a señales azules (señales mixtas verde/azules) o bien las señales naranjas separadas solapan a señales azules (señales mixtas naranja/azules), esto indica una translocación ALK. Si las señales verdes y naranjas separadas no se solapan con señales azules, esto indica una translocación ROS1.

La Fig. 4 muestra un esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH cuádruple correspondiente "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH Probe" de la razón social ZytoVision. La sonda se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que en la región 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ALK no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas, que se componen de señales mixtas de fluorescencia verdes y naranja/azules. Las señales de hibridación para el gen ROS1 no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas.

En la interfase de una célula normal (sin aberraciones ALK o ROS1) aparecen cuatro señales de fusión verde-naranjas en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda dual verde-naranja adecuado, dos señales azules en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda sencilla adecuado, así como en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda triple adecuado, dos señales de fusión verde-naranjas y dos señales de fusión y mixtas verde-naranja/azules (véase la Fig. 4a).

Un locus 2p23 afectado por una translocación ALK está caracterizado por una señal verde separada y una señal mixta naranja/azul separada (véase la Fig. 4b).

Un locus 6q22 afectado por una translocación ROS1 está caracterizado por una señal verde separada y por una señal naranja separada (véase la Fig. 4c).

En el caso de utilizar conjuntos de filtro pasabanda duales adecuados para señales verdes y naranjas, señales verdes y naranjas separadas de las mismas permiten, por consiguiente, solo afirmar en principio que básicamente está presente una translocación ALK o ROS1. Una diferenciación posiblemente relevante desde un punto de vista diagnóstico entre una translocación ALK o ROS1 solo puede tener lugar entonces incorporando las señales de fluorescencia azules. Si las señales naranjas separadas solapan a señales azules (señales mixtas naranja/azules), esto indica una translocación ALK. Si las señales naranjas separadas no se solapan con señales azules, esto indica una translocación ROS1.

La Fig. 5 muestra un esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH séxtuple correspondiente “ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH Probe” de la razón social ZytoVision. La sonda se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK, en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1 y en 10q11 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de RET, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK, en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1 y en 10q11 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de RET, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que están dirigidos en la región 2p23 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 10q11 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de RET.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ALK no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas, que se componen de señales mixtas de fluorescencia verdes y naranja/azules. Las señales de hibridación para el gen RET no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas, que se componen de señales mixtas verde/azules y señales naranjas. Las señales de hibridación para el gen ROS1 no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas,

En la interfase de una célula normal (sin aberraciones ALK, ROS1 o RET) aparecen seis señales de fusión verde-naranjas en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda dual verde-naranja adecuado, cuatro señales azules en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda sencilla adecuado, así como en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda triple adecuado, dos señales de fusión verde-naranjas, dos señales de fusión y mixtas verde-naranja/azules y dos señales de fusión y mixtas verde/azul-naranjas (véase la Fig. 5a).

Un locus 2p23 afectado por una translocación ALK está caracterizado por una señal verde separada y una señal mixta naranja/azul separada (véase la Fig. 5b).

Un locus 6q22 afectado por una translocación ROS1 está caracterizado por una señal verde separada y por una señal naranja separada (véase la Fig. 5c).

Un locus 10q11 afectado por una translocación RET está caracterizado por una señal naranja separada y por una señal mixta verde/azul separada (véase la Fig. 5d).

En el caso de utilizar conjuntos de filtro pasabanda duales adecuados para señales verdes y naranjas, señales verdes y naranjas separadas de las mismas permiten, por consiguiente, solo afirmar en principio que básicamente está presente una translocación ALK, ROS1 o RET. Una diferenciación posiblemente relevante desde un punto de vista diagnóstico entre una translocación ALK, ROS1 o RET solo puede tener lugar entonces incorporando las señales de fluorescencia azules. Si las señales naranjas separadas solapan a señales azules (señales mixtas naranja/azules), esto indica una translocación ALK. Si las señales verdes separadas solapan a señales azules (señales mixtas verde/azules), esto indica una translocación RET. Si las señales naranjas separadas ni las señales verdes separadas no se solapan con señales azules, esto indica una translocación ROS1.

La Fig. 6 muestra un esquema de modelos de señales en el caso de utilizar una sonda FISH séxtuple correspondiente “ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix II NG-FISH Probe” de la razón social ZytoVision. La sonda se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK, en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1 y en 10q11 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de RET, polinucleótidos marcados en rojo (absorción a 580 nm y emisión a 599 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK, en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1 y en 10q11 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de RET, polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que en la región 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK, así como polinucleótidos marcados en amarillo oro (absorción a 532 nm y emisión a 553 nm) que en la región 10q11 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de

RET.

5 En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ALK no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-rojas, que se componen de señales mixtas de fluorescencia verdes y rojas/azules. Las señales de hibridación para el gen RET no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-rojas, que se componen de señales mixtas verde/amarillo oro y señales rojas. Las señales de hibridación para el gen ROS1 no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-rojas.

10 En la interfase de una célula normal (sin aberraciones ALK, ROS1 o RET) aparecen seis señales de fusión verde-rojas en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda dual verde-rojos adecuado, dos señales azules en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda sencilla adecuado, así como dos señales amarillo oro en el caso de utilizar un conjunto de filtros de pasabanda sencilla adecuado (véase la Fig. 6a).

Un locus 2p23 afectado por una translocación ALK está caracterizado por una señal verde separada y una señal mixta roja/azul separada (véase la Fig. 6b).

15 Un locus 6q22 afectado por una translocación ROS1 está caracterizado por una señal verde separada y por una señal roja separada (véase la Fig. 6c).

Un locus 10q11 afectado por una translocación RET está caracterizado por una señal roja separada y por una señal mixta verde/amarillo oro separada (véase la Fig. 6d).

20 En el caso de utilizar conjuntos de filtro pasabanda duales adecuados para señales verdes y rojas, señales verdes y rojas separadas de las mismas permiten, por consiguiente, solo afirmar en principio que básicamente está presente una translocación ALK, ROS1 o RET. Una diferenciación posiblemente relevante desde un punto de vista diagnóstico entre una translocación ALK, ROS1 o RET solo puede tener lugar entonces incorporando las señales de fluorescencia azules o bien amarillo oro. Si las señales rojas separadas solapan a señales azules (señales mixtas rojo/azules), esto indica una translocación ALK. Si las señales verdes separadas solapan a señales amarillo oro (señales mixtas verde/amarillo oro), esto indica una translocación RET. Si las señales rojas separadas ni las señales verdes separadas no se solapan con señales azules o bien amarillo oro, esto indica una translocación ROS1.

30 La Fig. 7 muestra una representación esquemática de un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de cuatro aberraciones numéricas utilizando cuatro sondas y cuatro marcadores, estando tres sondas marcadas al mismo tiempo con en cada caso dos marcadores, diferenciándose entre sí los marcadores utilizados para la combinación en el caso de estas tres sondas. Se muestra el modelo de señales en el caso de células normales, así como en el caso de células con la amplificación del gen MET en 7q31. La región 17q11.2-q12 del gen ERBB2 es cubierta con el marcador A, la región 7p12 del gen EGFR es cubierta con el marcador A y, además de ello, con el marcador D, de modo que se produce un marcador mixto A/D, la región 8p11.23-p11.22 del gen FGFR1 es cubierta con el marcador A y, además de ello, con el marcador C, de modo que se produce un marcador mixto A/C, así como la región 7q31 del gen MET es cubierta con el marcador A y, además de ello, con el marcador B, de modo que se produce un marcador mixto A/B.

35 En la interfase de una célula normal (sin aberración ERBB2, EGFR, FGFR1 o MET numérica), todos los loci son marcados por señales del marcador A. Una co-localización de una señal del marcador A con una señal del marcador B conduce a un marcador mixto A/B y marca el locus del gen MET. Según ello, el marcador mixto A/C marca el locus del gen FGRF1 y el marcador mixto A/D marca el locus del gen EGFR. El locus del gen ERBB2 se caracteriza debido a que no se produce una co-localización con otro marcador. En la interfase de una célula con una amplificación del gen MET se produce un aumento de señales del marcador A que se co-localizan con señales del marcador B, por consiguiente, un aumento de señales del marcador mixto A/B.

#### Ejemplos de realización:

45 Con el fin de confirmar adicionalmente las propiedades del procedimiento de acuerdo con la invención se llevaron a cabo, además, las hibridaciones *in situ* descritas en lo que sigue:

Análisis FISH para la detección de aberraciones numéricas múltiples en diferentes tipos de células utilizando la sonda FISH quintuple "SPEC ERBB2, EGFR, EGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH Probe" de la razón social Zytovision GmbH

50 La realización del FISH tiene lugar en cortes de 3 a 5 µm de grosor de preparados de carcinoma de pulmón y de mama embebidos en parafina fijada con formalina (FFPE) sin o bien con una amplificación del gen ERBB2 previamente diagnosticada que se cultivan en portaobjetos de vidrio revestidos y se mantienen en el horno a 58°C durante la noche.

55 Para la separación de la parafina, los preparados se calientan primeramente durante 10 minutos a 70 °C en una placa calefactora y, a continuación, se incuban dos veces en cada caso durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) en 100% de xileno. Después, los preparados se re-hidratán mediante una serie en etanol decreciente (en cada

caso 5 minutos a TA en etanol desnaturalizado al 96%, 96%, 90%, 70%) e incubación en agua purísima (dos veces en cada caso durante dos minutos a TA). A la permeabilización de las células se une un tratamiento previo con calor durante 15 minutos a 98 °C en solución cítrica de pre-tratamiento térmico (ZytoVision GmbH), seguido de dos etapas de incubación adicionales durante dos minutos en agua purísima a TA. El tratamiento previo proteolítico tiene lugar mediante goteo de una solución de pepsina (solución de pepsina, ZytoVision GmbH) sobre los preparados, y subsiguiente incubación en una cámara húmeda a 37 °C durante 25 minutos. Tras la subsiguiente incubación durante 5 min en tampón de lavado SSC (ZytoVision GmbH), los preparados se deshidratan (en cada caso un minuto a TA en agua purísima, etanol al 70%, 90%, 96%). Después del secado al aire de los preparados se aplican directamente sobre los cortes, mediante pipeta, en cada caso 10 µl de la sonda FISH ZytoLight SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveChexk™ NG-FISH Probe (ZytoVision GmbH).

En el caso de la sonda se trata de una mezcla a base de cinco sondas de hibridación específicas de locus, componiéndose la mezcla a base de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que están dirigidos contra la región 17q11.2-q12 del gen ERBB2, la región 7p12 del gen EGFR, la región 8p11.23-p11.22 del gen FGFR1, la región 7q31 del gen MET y la región 3q26.3-q27 del gen SOX2, así como de polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que están dirigidos contra la región del gen EGFR y del gen SOX2, polinucleótidos marcados en amarillo oro (absorción a 532 nm y emisión a 553 nm) que están dirigidos contra la región del gen FGFR1 y polinucleótidos marcados en rojo (absorción a 580 nm y emisión a 599 nm) que están dirigidos contra la región del gen MET y del gen SOX2. A continuación, los portaobjetos se colocan libres de burbujas de aire y los cantos se sellan con Fixogum (Marabu). Después de la desnaturalización de los preparados durante diez minutos a 75 °C sobre una placa calefactora, la hibridación se lleva a cabo en un horno calentador en una cámara húmeda precalentada a 37 °C durante la noche (aproximadamente 16 horas).

Después de la hibridación, se retira el Fixogum y los preparados se incuban durante tres minutos a 37 °C en tampón de lavado (1 x Wash Buffer A, ZytoVision GmbH) en una cubeta de vidrio. Después de separar los cubreobjetos tiene lugar un lavado de rigurosidad en cada caso dos veces durante cinco minutos a 37 °C en tampón de lavado (1 x Wash Buffer A, ZytoVision GmbH). A continuación, los preparados se deshidratan y secan en una serie en etanol creciente (en cada caso un minuto a TA en 70%, 90%, 96%), siendo protegidos los preparados de la luz directa. Tras la aplicación de la contra-tinción (20 µl de solución DAPI DuraTect (ZytoVision GmbH)) se colocan los cubreobjetos exentos de burbujas de aire y los preparados se incuban protegidos frente a la luz durante al menos 30 minutos a TA.

A continuación tiene lugar la evaluación en el microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A1 con unidad de iluminación HXP 120V, Carl Zeiss Microscopy GmbH) utilizando conjuntos de filtro adecuados (conjunto de filtro Sp. Green HC mFISH; conjunto de filtro Sp. Red HC mFISH; conjunto de filtro Sp. Aqua HC mFISH; conjunto de filtro ZyGold HC mFISH (todos de AHF Analysentechnik AG)).

En este caso, en los preparados sin amplificación ERBB2, en el caso de utilizar el filtro verde, se manifiestan en los núcleos celulares en cada caso diez señales verdes. Utilizando el filtro ZyGold se observan por cada núcleo celular en cada caso dos señales amarillo oro, cuya posición en el espacio es idéntica a la de las dos señales verdes. Utilizando el filtro rojo se observan por cada núcleo celular en cada caso cuatro señales rojas, cuya posición en el espacio es idéntica a las de las cuatro señales verdes. Utilizando el filtro aqua se observan por cada núcleo celular en cada caso cuatro señales aqua, cuya posición en el espacio es idéntica a la de las cuatro señales verdes, así como en cada caso dos señales son también idénticas con dos señales rojas. El modelo de señales se interpreta de la siguiente forma: dos señales verdes sin localización idéntica en el espacio de señales de otro color identifican a las dos copias de gen ERBB2 de una célula diploide. Dos señales verdes con una localización idéntica en el espacio de dos señales aqua identifican a las dos copias de gen EGFR, dos señales verdes con una localización idéntica en el espacio de dos señales amarillo oro identifican a las dos copias de gen FGFR1, dos señales verdes con localización idéntica en el espacio de dos señales rojas identifican a las dos copias de gen MET y dos señales verdes con una localización idéntica en el espacio de dos señales rojas y dos señales aqua identifican a las dos copias de gen SOX2.

En los núcleos celulares de los preparados con amplificación ERBB2 se manifiesta un modelo de señales equiparable al ejemplo previamente descrito, con la excepción de que junto a nueve señales verdes se puede observar un racimo de señales verde o bien un modelo de señales consistente en aproximadamente quince señales situadas estrechamente una junto a otra de manera inseparable. Este modelo de señales verdes no se co-localiza con señales de otro color e identificó, por consiguiente, una amplificación del gen ERBB2.

Análisis FISH para la detección de translocaciones de las regiones ALK o bien ROS1 en diferentes tipos de células utilizando la sonda FISH cuádruple "Zytolight ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH Probe" de la razón social ZytoVision GmbH

La realización del FISH tiene lugar en cortes de 3 a 5 µm de grosor de células embebidas en parafina fijada con formalina (FFPE) de las líneas celulares HeLa (ATCC® CCL-2™), HCC78 (proporcionada por el Prof. Schildhaus, Göttingen) y H3122 (proporcionada por el Prof. Schildhaus, Göttingen) que se cultivan en portaobjetos de vidrio revestidos y se mantienen en el horno a 58°C durante la noche.

Para la separación de la parafina, los preparados se calientan primeramente durante 10 min a 70 °C en una placa calefactora y, a continuación, se incuban dos veces en cada caso durante 10 min a temperatura ambiente (TA) en 100% de xileno. Después, los preparados se re-hidratán mediante una serie en etanol decreciente (en cada caso cinco min a TA en etanol desnaturalizado al 96%, 96%, 90%, 70%) e incubación en agua purísima (dos veces en cada caso durante dos minutos a TA). A la permeabilización de las células se une un tratamiento previo con calor durante 15 minutos a 98 °C en solución cítrica de pre-tratamiento térmico (ZytoVision GmbH), seguido de dos etapas de incubación adicionales durante dos minutos en agua purísima a TA. El tratamiento previo proteolítico tiene lugar mediante goteo de una solución de pepsina (solución de pepsina, ZytoVision GmbH) sobre los preparados, y subsiguiente incubación en una cámara húmeda a 37 °C durante 15 minutos. Tras la subsiguiente incubación durante cinco minutos en tampón de lavado SSC (tampón de lavado SSC, ZytoVision GmbH), los preparados se deshidratan (en cada caso un minuto a TA en agua purísima, etanol al 70%, 90%, 96%). Después del secado al aire de los preparados se aplican directamente sobre los cortes, mediante pipeta, en cada caso 10 µl de la sonda FISH ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH Probe (ZytoVision GmbH).

En el caso de la sonda se trata de una mezcla a base de cuatro sondas de hibridación específicas de locus, componiéndose la mezcla a base de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que en la región 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1. A continuación, los portaobjetos se colocan libres de burbujas de aire y los cantos se sellan con Fixogum (Marabu). Después de la desnaturalización de los preparados a lo largo de un tiempo de diez minutos a 75 °C sobre una placa calefactora, la hibridación se lleva a cabo en un horno calentador en una cámara húmeda precalentada a 37 °C durante la noche (aproximadamente 16 horas).

Después de la hibridación, se retira el Fixogum y los preparados se incuban durante tres minutos a 37 °C en tampón de lavado (1x Wash Buffer A, ZytoVision GmbH) en una cubeta de vidrio. Después de separar los cubreobjetos tiene lugar un lavado de rigurosidad en cada caso dos veces durante cinco minutos a 37 °C en tampón de lavado (1 x Wash Buffer A, ZytoVision GmbH). A continuación, los preparados se deshidratan y secan al aire en una serie en etanol creciente (en cada caso un minuto a TA en etanol al 70%, 90%, 96%), siendo protegidas las muestras de la incidencia de luz directa. Tras la aplicación de la contra-tinción (20 µl de solución DAPI DuraTect (ZytoVision GmbH)) se colocan los cubreobjetos exentos de burbujas de aire y los preparados se incuban protegidos frente a la luz durante al menos 30 minutos a TA.

A continuación tiene lugar la evaluación en el microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A1 con unidad de iluminación HXP 120V, Carl Zeiss Microscopy GmbH) utilizando conjuntos de filtro adecuados (conjunto de filtro verde / naranja-rojo de banda dual, AHF Analysentechnik; conjunto de filtro Sp. Aqua HC mFISH, AHF Analysentechnik). En este caso, en el caso de utilizar el doble filtro naranja/verde se manifiestan en los núcleos celulares de la línea celular HeLa en la mayoría de los núcleos analizados, en cada caso seis señales de fusión naranja/verdes, no se observan señales verdes y/o naranjas individuales. Utilizando el filtro aqua se observan por cada núcleo celular en cada caso tres señales aqua, cuya posición en el espacio es idéntica a la de tres señales de fusión. El modelo de señales se interpreta, en coincidencia con la bibliografía, como tres copias del gen ALK y tres copias del gen ROS1. No se presentan translocaciones ALK o ROS1.

En los núcleos celulares de la línea celular H3122, para los cuales se describe en la bibliografía una translocación del gen ALK, en el caso de utilizar el filtro doble naranja/verde se muestran en la mayoría de los núcleos analizados en cada caso siete señales de fusión naranja/verdes y una señal naranja individual. Utilizando el filtro aqua, se observa por cada núcleo celular en cada caso dos señales aqua, cuya posición en el espacio es idéntica a la de dos de las señales de fusión. El modelo de señales es interpretado, en coincidencia con la bibliografía, como seis copias del gen ALK, una de las cuales es afectada por una translocación, y dos copias del gen ROS1.

En los núcleos celulares de la línea celular HCC78, para los cuales en la bibliografía se describe una translocación del gen ROS1, en el caso de utilizar el filtro doble naranja/verde se manifiestan en la mayoría de los núcleos analizados en cada caso cuatro señales de fusión naranja/verdes, dos señales naranja individuales y dos señales verdes individuales, es decir, separadas de las anteriores. Utilizando el filtro aqua, por cada núcleo celular se observan en cada caso cuatro señales aqua, cuya posición en el espacio es idéntica a la de dos de las señales de fusión y las dos señales verdes separadas. El modelo de señales es interpretado, en coincidencia con la bibliografía, como cuatro copias del gen ROS1, en donde dos de las mismas están afectadas por una translocación, y dos copias del gen ALK.

Análisis FISH para la detección de una translocación de la región ROS1 en 6q22 utilizando la sonda FISH cuádruple "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH Probe" de la razón social ZytoVision GmbH

Se lleva a cabo un análisis FISH para la detección de una translocación de la región ROS1 en 6q22 utilizando la sonda FISH cuádruple "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH Probe" de la razón social

Zytovision GmbH. En el caso de la sonda se trata de una mezcla a base de cuatro sondas de hibridación específicas de locus, estando formada la mezcla por polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1, polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1, así como polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que en la región 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para genes ROS1 y/o ALK no redispuestos aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas y para un gen ROS1 y/o ALK redispuesto como una señal verde separada y una señal naranja separada. Señales verdes específicas para ROS1 se co-localizan en este caso con señales de fluorescencia azules, de modo que el gen ROS1 no redispuesto se compone de señales mixtas de fluorescencia naranjas y verde/azules. Las señales de hibridación para el gen ALK no redispuesto aparecen en forma de señales de fusión de fluorescencia verde-naranjas sin señales mixtas con señales de fluorescencia azules. El locus 6q22 afectado por una translocación ROS1 está caracterizado por una señal verde separada y una señal naranja separada. En este caso, la señal verde separada se solapa con una señal azul. Esta señal mixta verde/azul indica ROS1, pero no ALK como el gen afectado por la translocación. Con conjuntos de filtro adecuados, el modelo de señales puede ser visualizado bien.

Análisis CISH para la detección de una translocación de la región ALK en 2p23 utilizando la sonda CISH cuádruple "ZytoDot SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH Probe" de la razón social Zytovision GmbH

Además, se llevó a cabo un análisis CISH para la detección de una translocación de la región ALK en 2p23 utilizando la sonda CISH cuádruple "ZytoDot SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH Probe" de la razón social Zytovision GmbH. En el caso de la sonda se trata de una mezcla a base de cuatro sondas de hibridación específicas de locus, en donde la mezcla se compone de polinucleótidos marcados con digoxigenina, que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas próximas a la región del punto de ruptura de ROS1, polinucleótidos marcados con DNP que en 2p23 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22 contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1, así como de polinucleótidos marcados con biotina que en la región 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas distales a la región del punto de ruptura de ROS1. La detección de las marcas tiene lugar a través de anticuerpos primarios (anti-DIG/anti-DNP/anti-BIO) (no marcados), que son detectados por anticuerpos conjugados con enzima polimerizados secundarios (polímero HRP/polímero AP/beta-GAL), así como la reacción enzimática de los sustratos (AP-RED/HRP-GREEN/beta-GAL-BLUE) que conduce a la formación de fuertes señales permanentes rojas, verdes y azules que pueden ser representadas al microscopio óptico, p. ej., con una lente seca de 40x.

Núcleos celulares diploides o bien disómicos sin redistribuciones o bien translocaciones de los genes ALK o bien ROS1 muestran dos señales, en cada caso consistentes en una señal roja y una señal verde que se encuentran situadas próximas una junto a otra de manera inseparable o bien se solapan en parte o se mezclan y son específicas para las dos copias del gen ALK. Además de ello, se manifiestan 2 señales que se componen en cada caso de una señal roja, una señal verde y una señal azul y se encuentran situadas próximas una junto a otra de manera inseparable o bien se solapan en parte o bien se mezclan y que son específicas para las dos copias del gen ROS1.

Núcleos celulares diploides o bien disómicos con readaptaciones o bien translocaciones de un gen ALK, pero no de los alelos ROS1, muestran una señal roja-verde que es específica para el alelo ALK no redispuesto. Además de ello, muestran una señal verde individual y una señal roja individual, separada de la anterior, que es específica para un alelo ALK redispuesto. Además de ello, se muestran dos señales rojas-verdes-azules, que son específicas para las dos copias del gen ROS1.

Núcleos celulares diploides o bien disómicos con readaptaciones o bien translocaciones de un gen ROS1, pero no de los alelos ALK, muestran una señal roja-verde-azul, que es específica para el alelo ROS1 no redispuesto. Además de ello, muestran una señal verde individual y una señal roja-azul individual, separada de la anterior, que es específica para un alelo ROS1 redispuesto, así como dos señales rojas-verdes-azules, que son específicas para las dos copias del gen ALK.

Análisis FISH para la detección de la amplificación de la región ERBB2 utilizando la sonda FISH quintuple "ZytoLight SPEC ERBB2, EGFR, EGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH Probe" de la razón social Zytovision GmbH

Finalmente, se llevó a cabo un análisis FISH para la detección de la amplificación de la región ERBB2 utilizando la sonda FISH quintuple "ZytoLight SPEC ERBB2, EGFR, EGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH Probe" de la razón social Zytovision. En el caso de la sonda se trata de una mezcla a base de cinco sondas de hibridación específicas de locus, en donde la mezcla se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm), que están dirigidos contra la región 17q11.2-q12 del gen ERBB2, la región 7p12 del gen EGFR, la región 8p11.23-p11.22 del gen FGFR1, la región 7q31 del gen MET y la región 3q26.3-q27 del gen SOX2, así

como de polinucleótidos marcados en azul (absorción a 426 nm y emisión a 480 nm) que están dirigidos contra la región del gen EGFR y del gen SOX2, polinucleótidos marcados en amarillo oro (absorción a 532 nm y emisión a 553 nm), que están dirigidos contra la región del gen FGFR1 y polinucleótidos marcados en rojo (absorción a 580 nm y emisión a 599 nm) que están dirigidos contra la región del gen MET y del gen SOX2.

- 5 En el caso de utilizar conjuntos de filtros de pasabanda sencillos adecuados, se manifiestan nueve señales verdes individuales y un racimo de señales verdes que ocupa la superficie de varias señales verdes individuales, cuatro señales azules, dos señales amarillo oro y cuatro señales rojas.

- 10 Mediante la superposición de las imágenes se manifiesta que una señal verde individual, así como el racimo de señales verdes no se co-localizan con señales de otro color. En el caso de la señal verde individual se trata de un gen ERBB2 no amplificado, el racimo de señales verdes identifica una amplificación del gen ERBB2. Señales mixtas verdes/azules co-localizantes identifican dos copias del gen EGFR, señales mixtas verdes/amarillo oro co-localizantes identifican dos copias del gen FGFR1, señales mixtas verdes/rojas co-localizantes identifican dos copias del gen MET y señales mixtas verdes/azules/rojas co-localizantes identifican dos copias del gen SOX2.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí mediante hibridación *in situ* por detección de regiones de cromosomas y/o del ADN en una muestra biológica, caracterizado por que la hibridación *in situ* se lleva a cabo como hibridación *in situ* en interfase, por que la hibridación *in situ* se lleva a cabo con al menos tres sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en el que, en particular, para generar al menos una señal mixta, al menos una de las sondas de hibridación específica de locus se marca con al menos otro marcador de detección distinto del primer marcador de detección, referida a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, de modo que se genera un modelo de señales, y por que aberraciones cromosómicas presentes son identificadas con ayuda del modelo de señales y/o son asociadas a una región del cromosoma y/o del ADN, en donde las sondas de hibridación son marcadas directamente con marcadores de detección.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las aberraciones cromosómicas son aberraciones cromosómicas independientes entre sí y/o en el que las aberraciones cromosómicas no son recíprocas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus adicionales tiene lugar con el al menos un marcador de detección adicional, en donde las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con marcadores de detección adicionales generan en el modelo de señales en cada caso señales mixtas diferentes entre sí, y/o en el que el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus adicionales tiene lugar con el al menos un marcador de detección adicional, en donde a través de cada una de las sondas de hibridación específica de locus marcada con el al menos un marcador de detección adicional se genera en el modelo de señales una señal mixta específica para una región del cromosoma y/o del ADN; y en el que al menos dos sondas de hibridación específicas de locus adicionales están marcadas con un marcador de detección adicional, distinto del primero, y/o en el que mediante al menos dos sondas de hibridación específicas de locus adicionales se generan en el modelo de señales en cada caso señales mixtas específicas para una región del cromosoma y/o del ADN.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que en cada caso dos sondas de hibridación específicas de locus flanquean un segmento del cromosoma, en donde las sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso un segmento del cromosoma están marcadas con marcadores de detección diferentes entre sí, de modo que mediante las sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso un segmento del cromosoma se genera en el modelo de señales una señal de fusión.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se emplean al menos seis sondas de hibridación específicas de locus diferentes, en donde en cada caso dos sondas de hibridación específicas de locus flanquean en cada caso a un segmento del cromosoma, y en el que el marcaje de sondas de hibridación específicas de locus adicionales tiene lugar con al menos otro marcador de detección diferente del primero, de modo que en el modelo de señales, con ayuda de señales de fusión y mixtas, puede identificarse y/o asociarse cada uno de los segmentos del cromosoma flanqueados y/o cada una de las regiones del cromosoma y/o del ADN a detectar.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, en el que
  - (a) una primera sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección A y una segunda sonda de hibridación específica de locus marcada con un marcador de detección B flanquean un segmento del cromosoma y generan en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* una señal de fusión A-B,
  - (b) 2 a 12 sondas de hibridación específicas de locus adicionales flanquean hasta seis segmentos del cromosoma adicionales, en donde asimismo en cada caso una de las dos sondas de hibridación específicas de locus que flanquean un segmento del cromosoma está marcada con un marcador de detección A, y en cada caso una de las dos sondas de hibridación específicas de locus que flanquean un segmento del cromosoma está marcada con un marcador de detección B, de modo que las sondas de hibridación específicas de locus que flanquean en cada caso un segmento del cromosoma generan en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* una señal de fusión A-B, y
  - (c) al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos un marcador de detección X adicional, de modo que las sondas de hibridación específicas de locus marcadas con al menos un marcador de detección adicional generan en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* señales de fusión y mixtas A-B/X,

en el que en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* las señales de fusión y mixtas A-B/X se modifican, en el caso de aberraciones cromosómicas, a señales mixtas A/X y/o B/X, y/o

en el que en el modelo de señales generado mediante hibridación *in situ* las señales de fusión A-B se modifican, en el caso de aberraciones cromosómicas, a señales individuales A y/o B,

de modo que aberraciones cromosómicas, con ayuda del modelo de señales generado mediante la hibridación *in situ*, son asociadas a una región del cromosoma y/o del ADN y/o a un segmento del cromosoma flanqueado por dos

sondas de hibridación específicas de locus;

en el que en una primera etapa se detectan y/o analizan las señales de fusión generadas por parte de los primeros marcadores de detección, y en una etapa subsiguiente, en el caso de la aparición de señales individuales, tiene lugar una detección y/o un análisis de las señales mixtas y su asociación a las regiones del cromosoma y/o del ADN detectadas, y/o en el que la detección del modelo de señales tiene lugar mediante análisis sustentado por ordenador.

5

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las sondas de hibridación específicas de locus se forman en cada caso mediante una pluralidad de fragmentos de ácidos nucleicos ("fragmentos de sondas"), que en cada caso cubren la región del cromosoma y/o del ADN a detectar.

10 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

(i) en el que fragmentos de ácidos nucleicos individuales de una sonda específica para la hibridación se marcan con solo un marcador de detección, y

(ii) en el que fragmentos de ácidos nucleicos individuales de una sonda específica para la hibridación se marcan con varios marcadores de detección diferentes entre sí,

15 conduciendo también combinaciones de las posibilidades (i) e (ii) a señales mixtas.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la hibridación *in-situ* tiene lugar bajo el marcaje directo de las sondas de hibridación y en el que la hibridación *in-situ* tiene lugar bajo el marcaje de las sondas de hibridación con colorantes de fluorescencia.

20 10. Composición para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí mediante hibridación *in situ*, en donde la composición comprende al menos tres sondas de hibridación específicas de locus, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, y en donde al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos un marcador de detección adicional, distinto del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, siendo las sondas de hibridación marcadas directamente con los marcadores de detección.

25 11. Composición para uso en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con aberraciones cromosómicas, en donde las enfermedades se eligen del grupo consistente en tumores malignos, preferiblemente carcinomas, sarcomas y/o leucemias, en donde la composición comprende al menos tres sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, y en donde al menos una de las sondas de hibridación específica de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, siendo las sondas de hibridación marcadas directamente con los marcadores de detección.

30

12. Uso de una composición según la reivindicación 10, para la detección de aberraciones cromosómicas mediante hibridación *in-situ*, en particular mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9.

35 13. Uso de al menos tres sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en donde al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, preferiblemente en el marco de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con aberraciones cromosómicas, en particular tumores malignos, preferiblemente carcinomas, sarcomas y/o leucemias, de manera particularmente preferida tumores de pulmón, linfomas, leucemias, sarcomas, carcinomas de mama y/o cáncer de intestino.

40

14. Kit para la detección de al menos dos aberraciones cromosómicas diferentes entre sí mediante hibridación *in-situ*, que comprende al menos tres sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí, marcadas en cada caso con un primer marcador de detección, en donde al menos una de las sondas de hibridación específicas de locus está marcada con al menos otro marcador de detección, diferente del primero, referido a la sonda de hibridación específica de locus respectiva, siendo las sondas de hibridación marcadas directamente con los marcadores de detección.

45

15. Kit según la reivindicación 14, en donde las al menos tres sondas de hibridación específicas de locus diferentes entre sí se presentan en una composición común.

Fig. 1

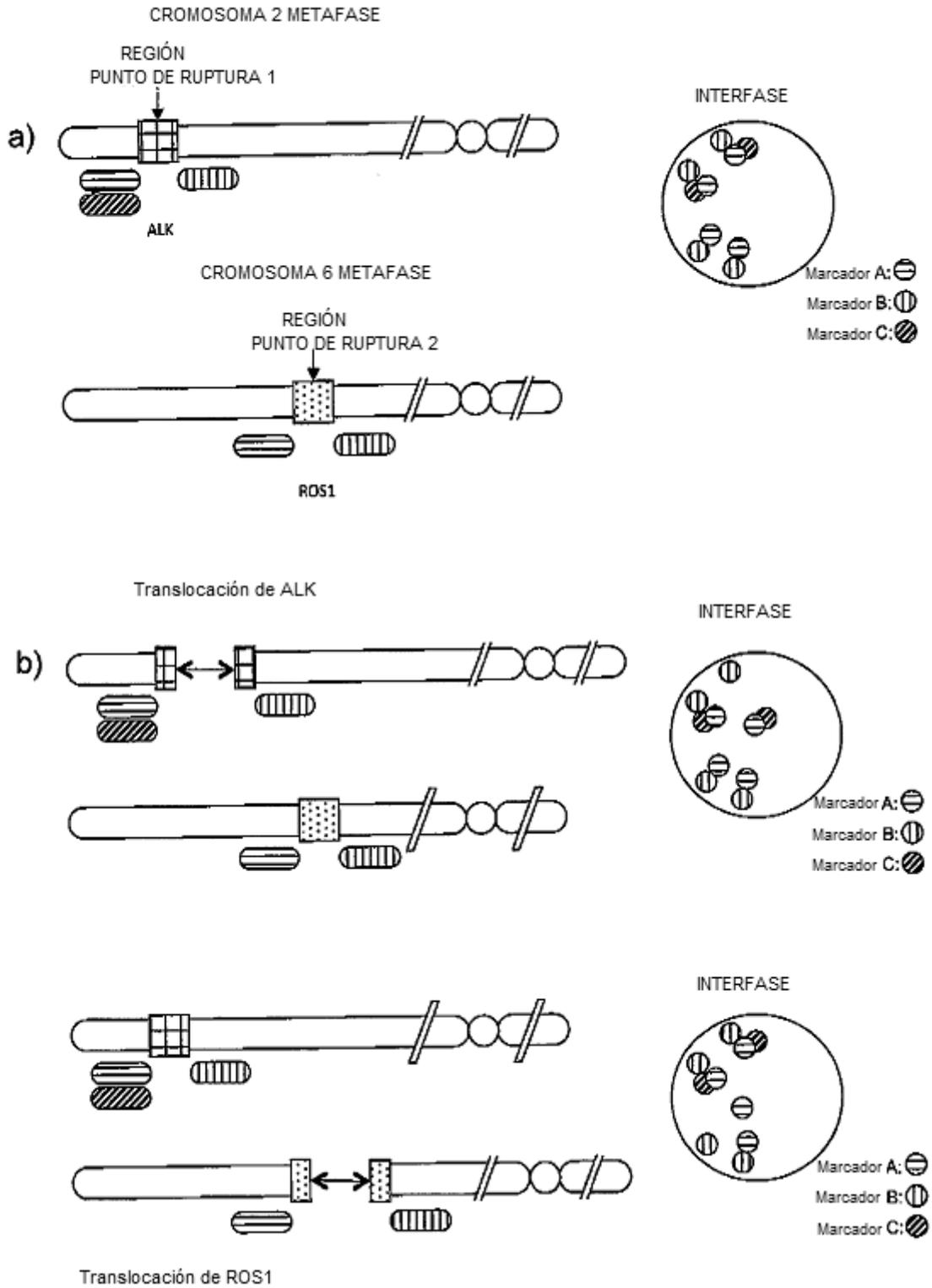


Fig. 2

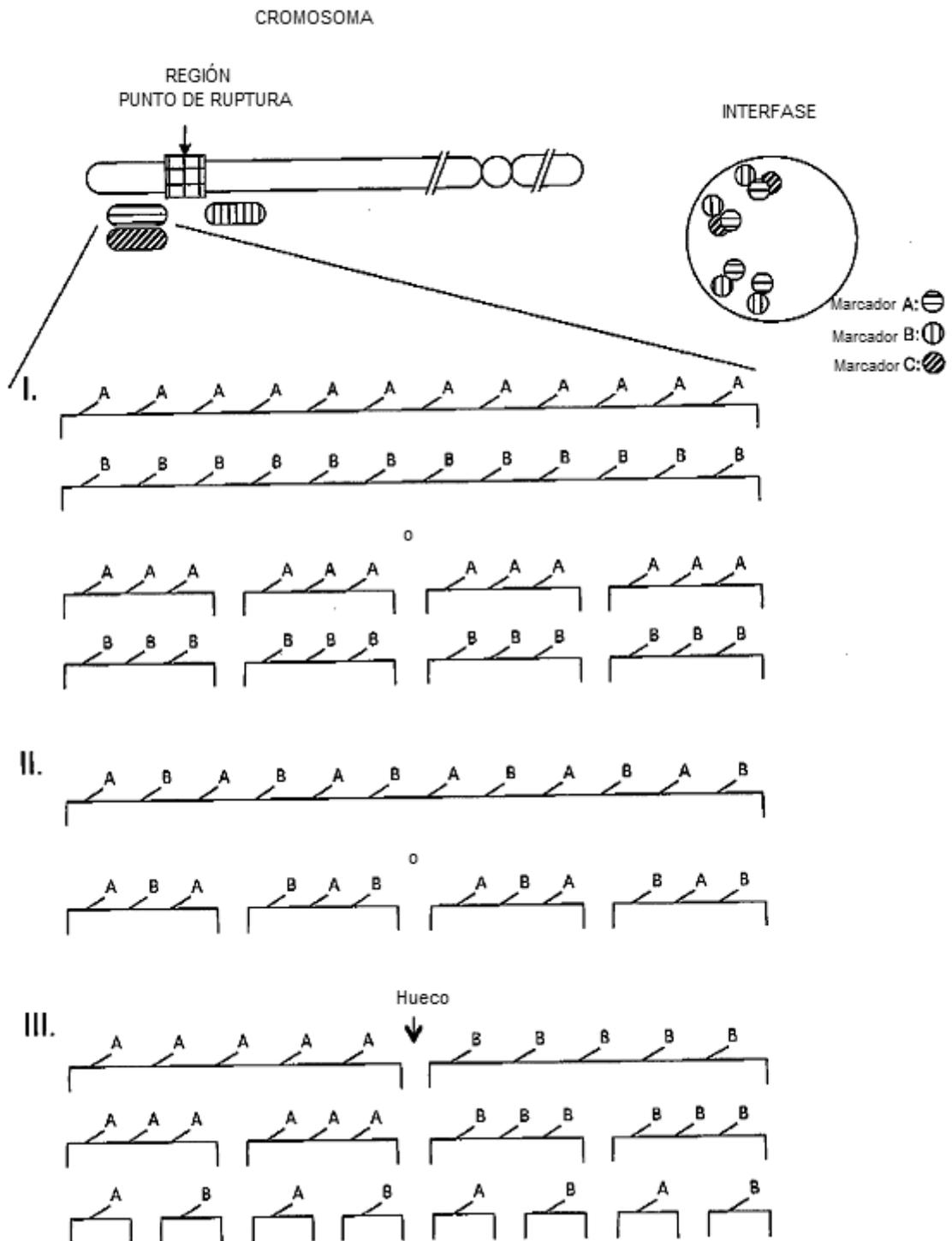
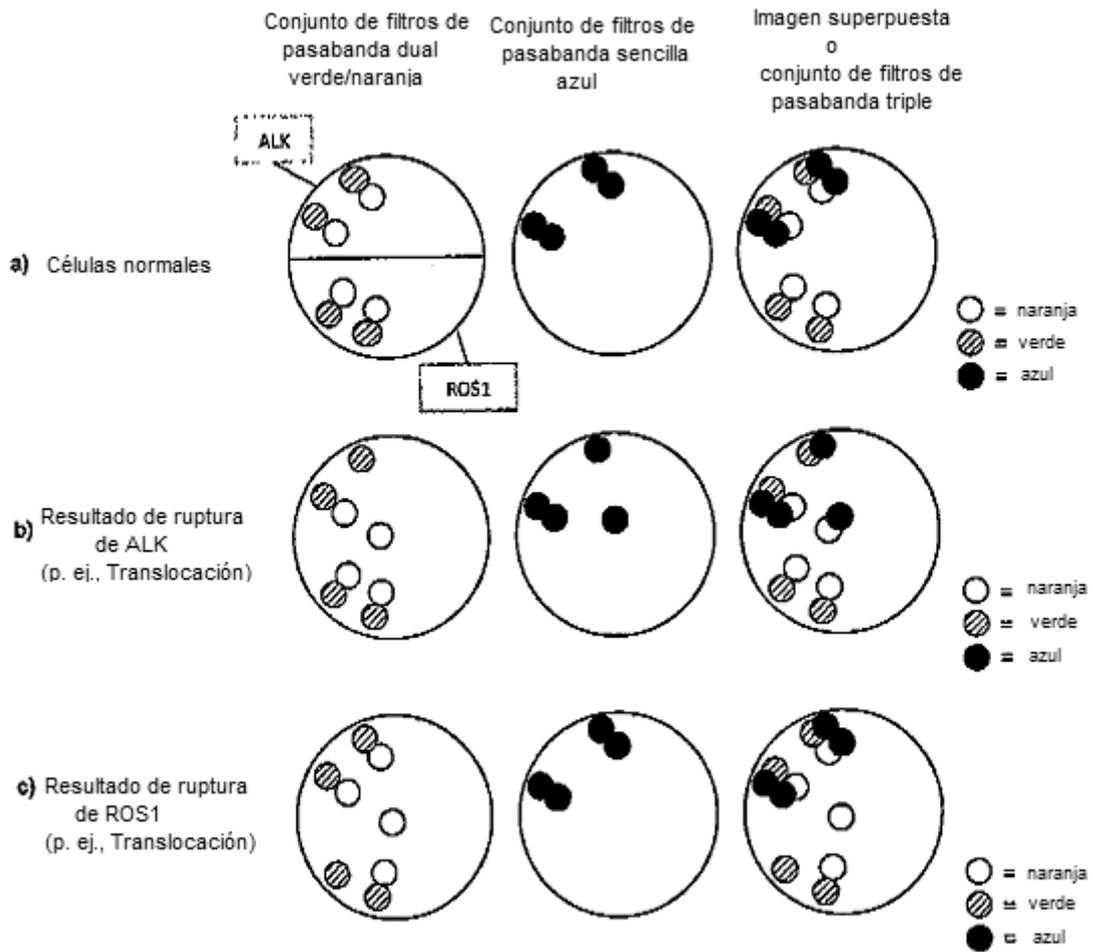


Fig. 3



**Fig. 4**

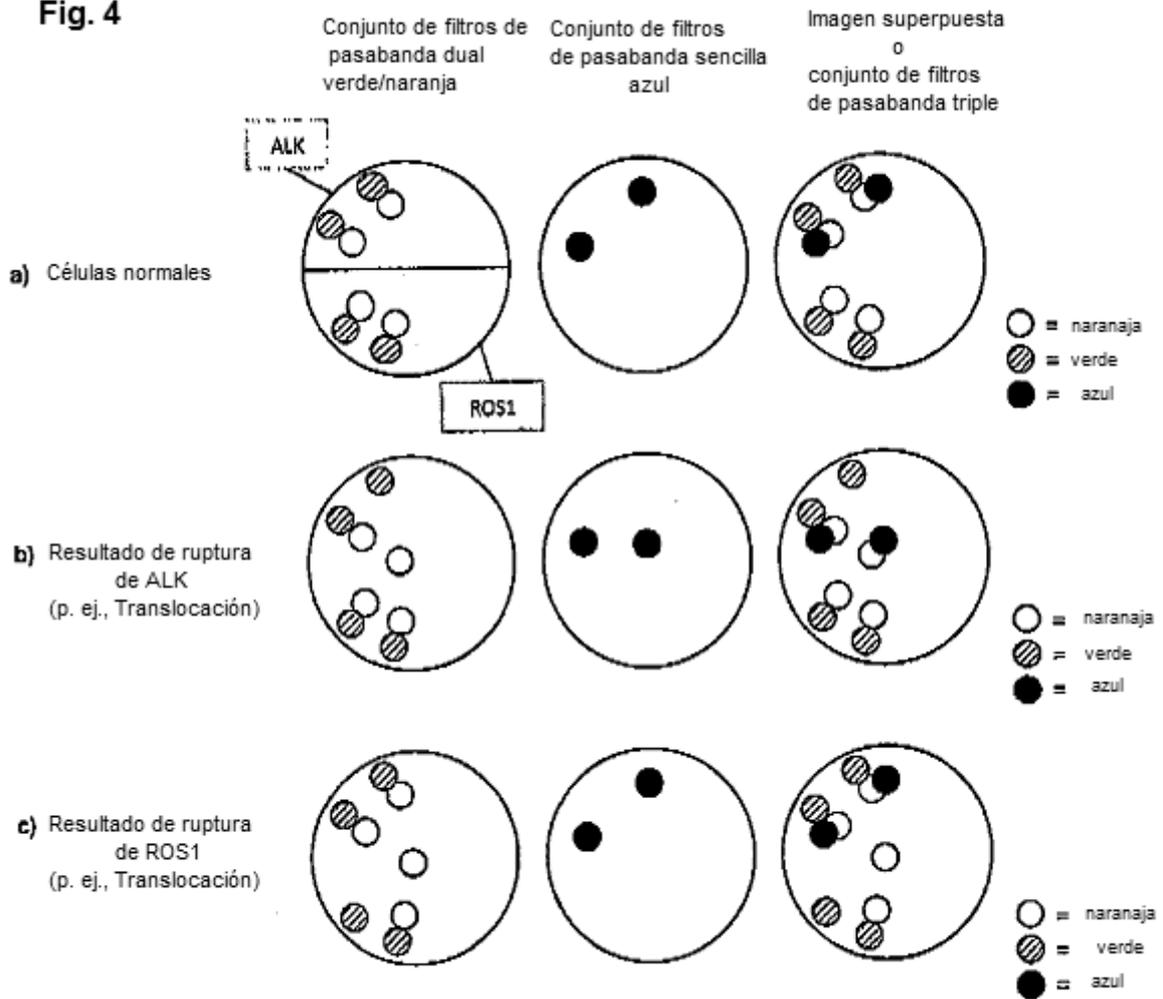


Fig. 5

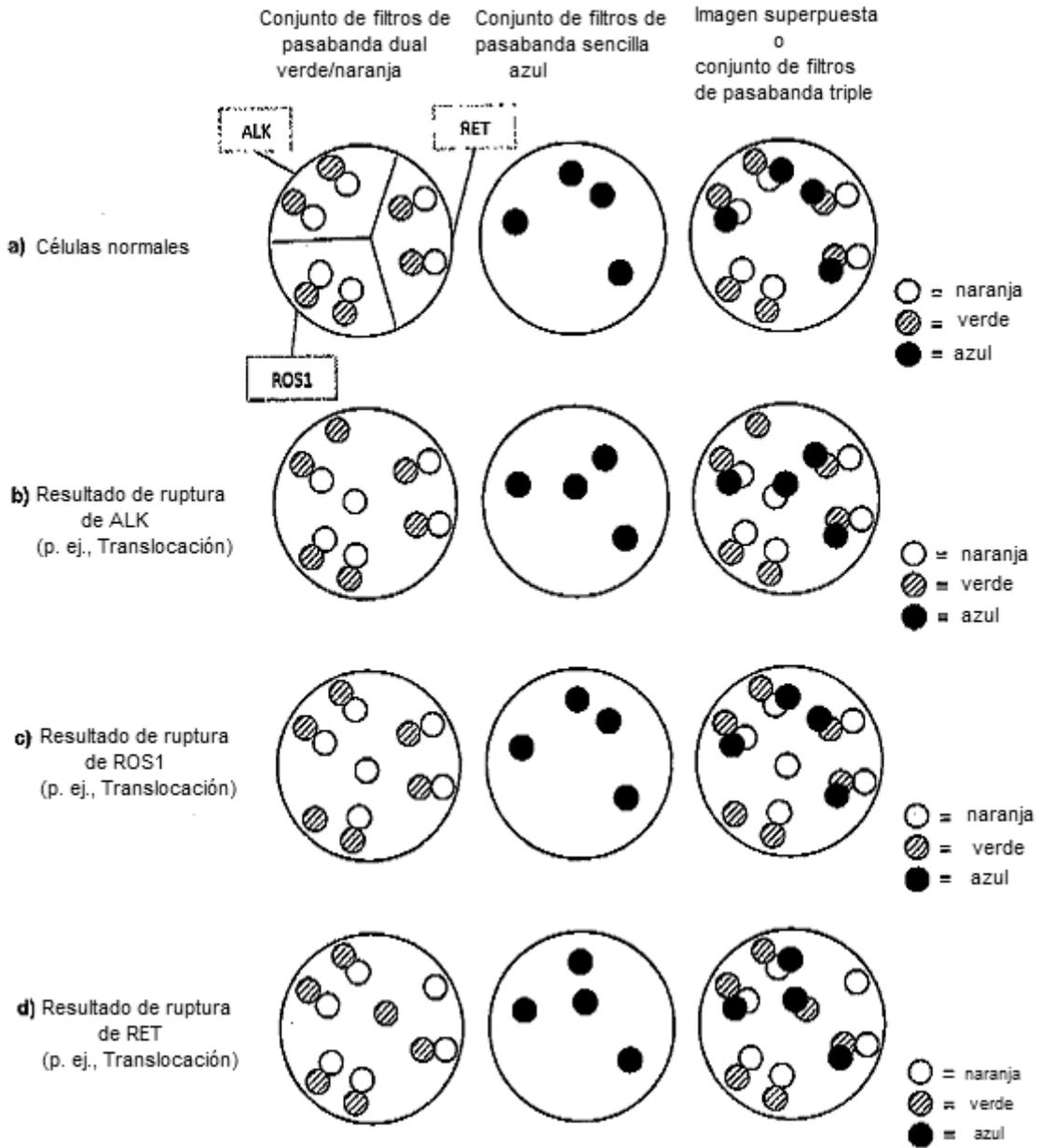


Fig. 6

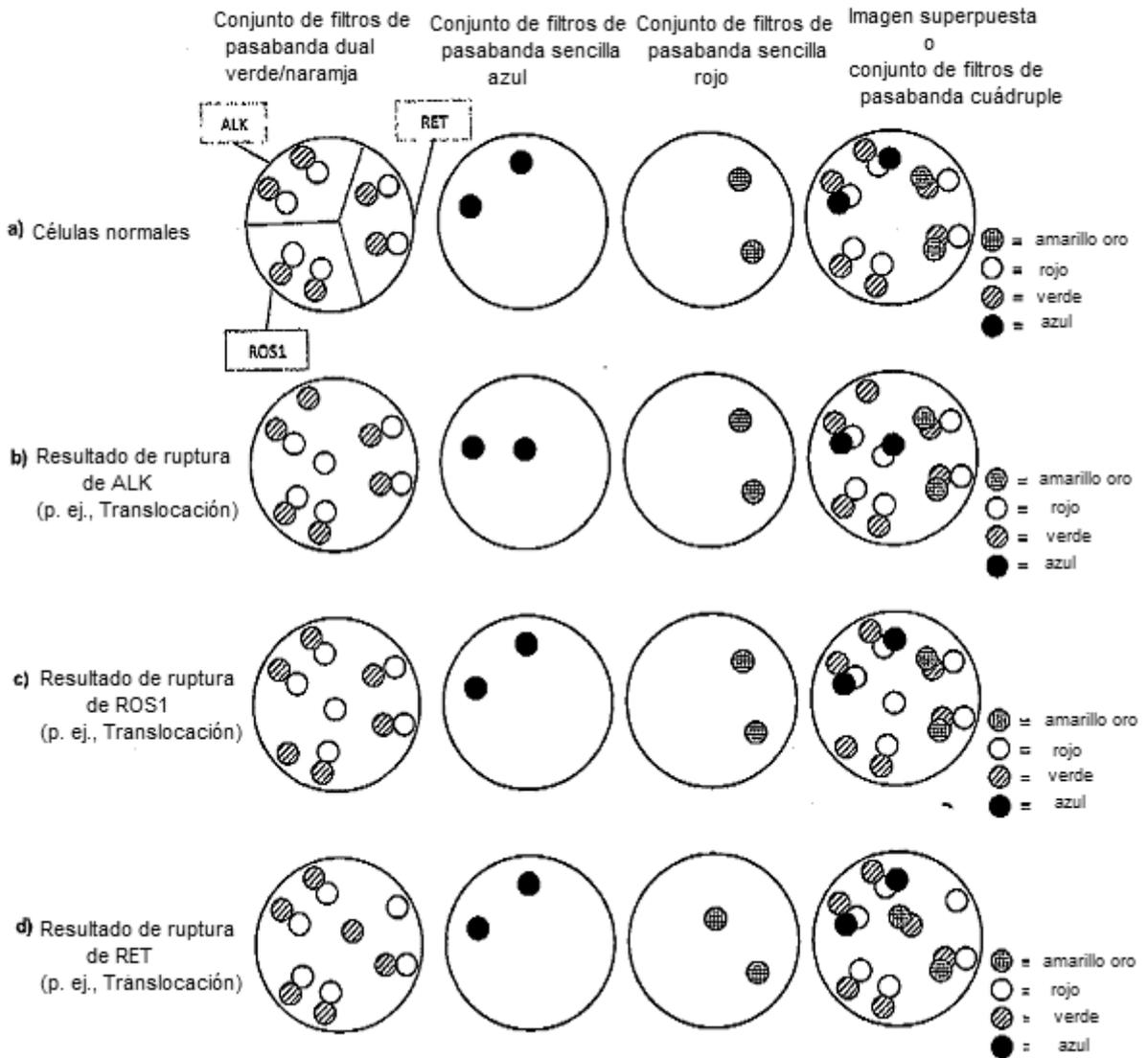
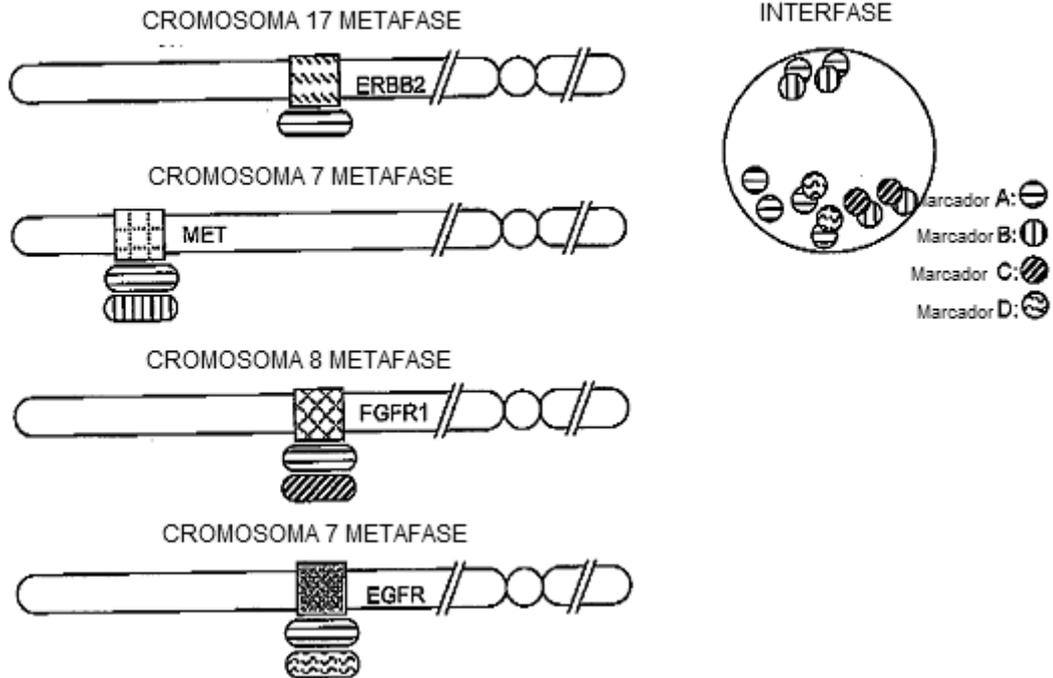


Fig. 7

a) Ninguna aberración:



b) Amplificación MET:

