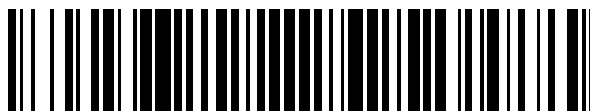


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 274**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2015 E 15184389 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3133166**

54 Título: **Composición y procedimiento de hibridación**

30 Prioridad:

21.08.2015 EP 15002487

03.09.2015 EP 15183642

07.09.2015 EP 15184010

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

07.04.2020

73 Titular/es:

42 LIFE SCIENCES GMBH & CO. KG (100.0%)

Fischkai 1

27572 Bremerhaven, DE

72 Inventor/es:

ROGALLA, PIERE y

HAUKE, SVEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 274 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

Composición y procedimiento de hibridación

La presente invención se refiere al sector técnico de los procedimientos de determinación de ácidos nucleicos, en particular ADN y/o ARN.

- 5 En particular, la presente invención se refiere a una composición para uso en la hibridación, en particular para la determinación y/o para la detección de ácidos nucleicos, así como a su uso de acuerdo con la invención. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos o bien de aberraciones cromosómicas. Finalmente, la presente invención se refiere a un kit para la detección de ácidos nucleicos o bien aberraciones cromosómicas.
- 10 Muchas enfermedades tumorales se fundamentan en mutaciones de cromosomas 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 en el apareamiento de bases complementarias de cadenas sencillas de ácidos nucleicos, en particular cadenas sencillas de ADN, de modo que secuencias de ácidos nucleicos específicas pueden ser detectadas en una muestra, en particular en un tejido o preparado celular. Para ello, sondas preparadas de modo sintético, marcadas de forma directa o indirecta, son hibridadas con cadenas sencillas de ácidos nucleicos y, a continuación, son detectadas.
- 20 Para fines de detección pueden pasar a emplearse, entre otros, fragmentos de ácidos nucleicos marcados por fluorescencia o bien sondas de hibridación marcadas por fluorescencia (ISH fluorescente (FISH)). Además de ello, pueden pasar a emplearse sondas marcadas con antígenos, en particular sondas marcadas con haptenos, las cuales se hacen visibles a continuación con ayuda de anticuerpos mediante reacciones de color, de modo que es posible un análisis por microscopía óptica ((ISH de campo brillante (BrISH), ISH cromogénica (CISH) e ISH con plata (SISH)).
- 25 Para la realización de hibridaciones in-situ se proporciona habitualmente, en principio, una muestra biológica a investigar, en particular un preparado, preferiblemente a base de cortes de tejidos o preparados citológicos. Las muestras son fijadas para la preparación a la hibridación in-situ sobre portaobjetos y son deshidratadas. Con el fin de que las sondas marcadas puedan hibridarse con los ácidos nucleicos, en particular el ARN o ADN, en las células o bien núcleos celulares, tiene lugar primeramente una etapa de desnaturalización, de modo que el ácido nucleico a detectar o bien el segmento de ácido nucleico a detectar y, además de ello, las sondas de hibridación empleadas, se presentan en la muestra en forma de cadena sencilla. En este caso, es posible desnaturalizar tanto la muestra como la sonda de hibridación por separado una de otra, al igual que también conjuntamente en el sentido de una co-desnaturalización. A continuación, tiene lugar la hibridación de las sondas de hibridación empleadas con los ácidos nucleicos contenidos en la muestra. Las sondas de hibridación se presentan habitualmente disueltas o bien estabilizadas en soluciones de hibridación que son aplicadas para la hibridación sobre las muestras a investigar. Las sondas de hibridación hibridadas o bien unidas a los ácidos nucleicos diana pueden detectarse finalmente tal como ya se ha descrito previamente.
- 30 Tal como se expone a continuación en detalle, las condiciones de hibridación que influyen sobre la especificidad de unión de las sondas de hibridación, así como sobre la rigurosidad de la hibridación, son decisivas para la obtención de resultados bien evaluables:
- 35 Para la hibridación o bien el éxito de la hibridación son de una importancia central, en particular, la desnaturalización de la muestra y de las sondas de hibridación y la subsiguiente renaturalización de los ácidos nucleicos, en particular del ADN, es decir, la hibridación de cadenas sencillas de ácidos nucleicos en la muestra con cadenas sencillas de ácidos nucleicos de las sondas de hibridación.
- 40 La separación de moléculas de ácidos nucleicos de doble cadena en ácidos nucleicos de cadena sencilla o bien la desnaturalización puede tener lugar, en particular, a temperaturas elevadas de aproximadamente 90 a 100 °C. Temperaturas elevadas de este tipo son perjudiciales, sin embargo, para la morfología de la muestra biológica, en particular de los segmentos de tejido o bien células preferiblemente empleadas.
- 45 Con el fin de obtener la morfología de las muestras y, además de ello, mejorar la rigurosidad de la hibridación, en el estado de la técnica la hibridación in-situ se lleva a cabo habitualmente bajo el empleo de soluciones con contenido en formamida para la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena en las muestras biológicas. Mediante el empleo de formamida en las soluciones utilizadas para la hibridación se reduce a 65 hasta 80 °C la temperatura de fusión de ácidos nucleicos de doble cadena, en particular dúplex de ADN-ADN y ADN-ARN que, por lo general, se encuentra en el intervalo de 90 a 100 °C.
- 50 Así, por ejemplo, el documento US 2011/0117554 A1 se refiere a composiciones para la determinación de ácidos nucleicos que contienen formamida. Las composiciones del documento US 2011/0117554 A1 han de consistir

esencialmente en formamida y agua – como otras pequeñas adiciones se mencionan SDS, tampón y sales. El documento WO 02/088396 A2 se refiere al uso de una composición con contenido en formalina para la hibridación *in situ* automatizada. Junto a la formalina, la composición contiene diferentes sales y detergentes. El documento US 2002/0102554 A1 da a conocer tampones de hibridación que comprenden, entre otros, sulfato de dextrano y formamida. El documento WO 2013/046033 describe composiciones para uso en hibridaciones que contienen menos de 25 % de formamida y, junto a la formamida, pueden contener agentes de aceleración, tales como sulfato de dextrano, y sales, tal como NaCl.

Steen et al. (2012, *Fast and non-toxic in situ hybridization without blocking of repetitive sequences*, PLOS One, 7(7): e40675-1) describe composiciones de hibridación que contienen 15% a 45% de formamidas o 15% de un disolvente polar, prótico o aprótico. El documento EP 2 636 756 A1 da a conocer diferentes experimentos que utilizan formamida o un disolvente polar prótico o polar aprótico. En el documento WO 2013/057310 A2 se someten a ensayo 15% de formamida – y separado de ello – 15% de otros disolventes en soluciones de hibridación. El documento WO 2010/097655 A1 enseña que formamida debería ser ampliamente reemplazada por los otros disolventes presentados en este documento.

Las soluciones de hibridación conocidas del estado de la técnica están ligadas, sin embargo, en parte, a determinados inconvenientes, tal como se expone en lo que sigue:

Mediante el empleo de soluciones de hibridación con contenido en formamida puede mejorarse ciertamente, en virtud del punto de fusión reducido del ADN, la morfología de las muestras empleadas y, por consiguiente, también el resultado de la hibridación, no obstante, soluciones de hibridación con contenido en formamida están ligadas habitualmente con tiempos de reacción muy largos. Ya que mediante la formamida se produce una ralentización significativa de la renaturalización, es decir, de la adición o bien unión de las sondas de hibridación, por un lado, y los ácidos nucleicos contenidos en las muestras a investigar y a detectar. En el estado de la técnica están previstos habitualmente tiempos de hibridación o bien de renaturalización de 10 a 24 horas. En casos particulares puede ser necesario incluso un tiempo de hibridación o bien renaturalización de hasta 72 horas.

Con el fin de superar el problema de los largos tiempos de hibridación, existen en el estado de la técnica enfoques que prevén un reemplazo de la formamida en las soluciones de hibridación por disolventes, de otro tipo: así, por ejemplo, en el documento WO 91/02088 A1 se emplean disolventes a base de lactamas en soluciones de hibridación. El documento WO 00/69899 A1 describe composiciones para la estabilización de ácidos nucleicos o bien análogos de ácidos nucleicos para aplicaciones biotecnológicas, las cuales contienen disolventes distintos de formamida, para la disolución de los ácidos nucleicos. Con estas soluciones exentas de formamida no se alcanzan sin embargo, a menudo, modelos de señales satisfactorios o bien modelos de señales bien evaluables.

Además de ello, las soluciones de hibridación conocidas hasta ahora en el estado de la técnica, que contienen las sondas de hibridación específicas para el locus, necesarias para las hibridaciones *in-situ*, presentan otros inconvenientes, tal como se expone seguidamente:

Así, con las soluciones de hibridación conocidas en el marco de la realización de hibridaciones *in-situ* como ensayos rápidos, en las cuales ya con cortos tiempos de hibridación se generan modelos de señales bien evaluables, no se obtienen a menudo señales intensas, a pesar de que exista al respecto una demanda, p. ej., para llevar a cabo ensayos rápidos en el diagnóstico pre-natal o bien post-natal o para la citogenética del tumor.

Además de ello, las soluciones de hibridación conocidas del estado de la técnica apenas se adecuan o solo lo hacen en una medida muy limitada para un empleo en procedimientos de hibridación *in-situ* automatizados. En comparación con procedimientos de hibridación *in-situ* llevados a cabo de forma no automática o bien manual, en el caso de procedimientos automatizados tienen que aplicarse sobre las muestras grandes cantidades o bien volúmenes de solución de hibridación. Con las soluciones de hibridación conocidas en el estado de la técnica no es hasta ahora posible resolver o bien estabilizar las cantidades de sondas de hibridación necesarias para la hibridación *in-situ*, tampoco en soluciones de gran volumen o bien en una fuerte dilución, de modo que puedan alcanzarse buenos resultados de hibridación. Las sondas de hibridación son, sin embargo, muy costosas, en el estado de la técnica se desconoce hasta ahora enfoque alguno o bien no se conocen composiciones de hibridación para las hibridaciones automatizadas *in-situ* que pueda o bien puedan llevarse a cabo también teniendo en cuenta aspectos económicos.

Por consiguiente, la presente invención tiene por misión proporcionar composiciones que sean adecuadas para uso en la hibridación *in-situ*, en particular para la detección de ácidos nucleicos en una muestra biológica y que eviten o bien al menos reduzcan, al menos ampliamente, los inconvenientes previamente expuestos del estado de la técnica.

En particular, la presente invención tiene por misión proporcionar composiciones o bien soluciones de hibridación para la hibridación *in-situ* que sean adecuadas también para el empleo en procedimientos de hibridación *in-situ* automatizados o bien permitan una realización rentable de procedimientos de hibridación *in-situ* automatizados. Además, de ello, la presente invención tiene por misión proporcionar composiciones para la hibridación *in-situ* que, tanto en el caso de tiempos de hibridación o bien de renaturalización cortos, al igual que largos, conduzcan a buenos resultados o a modelos de señales bien evaluables.

Para la solución del problema precedentemente expuesto, la presente invención propone una composición de acuerdo con la reivindicación 1; otras ejecuciones ventajosas son objeto de las reivindicaciones dependientes al respecto.

5 Además, es objeto de la presente invención el uso de una composición según la presente invención de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva.

De nuevo, otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos o bien aberraciones cromosómicas de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva.

10 Finalmente, es objeto de la presente invención un kit o bien un kit de partes o sistema para la detección de ácidos nucleicos o bien aberraciones cromosómicas de acuerdo con la reivindicación independiente respectiva; otras propiedades ventajosas son objeto de la reivindicación subordinada respectiva.

Se sobreentiende que en lo que sigue ejecuciones, formas de realización o similares particulares, que solo se describen en relación con el aspecto de la invención, son también válidas de manera correspondiente a los otros aspectos de la invención, sin que esto requiera de una mención expresa.

15 Además, en el caso de todos los datos cuantitativos relativos o bien porcentuales, en particular referidos al peso o al volumen mencionados en lo que sigue, se ha de tener en cuenta que estos se han de elegir en el marco de la presente invención por el experto en la materia de modo que en la suma de las sustancias constitutivas, sustancias activas, sustancias aditivas o bien coadyuvantes o similares respectivos siempre resulte 100 % o bien 100 % en peso. Esto lo sobreentiende sin embargo el experto en la materia.

20 Por lo demás, se cumple que el experto en la materia puede desviarse, en relación con la aplicación o condicionado por el caso particular, de los datos numéricos, de intervalos o de cantidades recogidos en lo que sigue, sin que abandone el marco de la presente invención.

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

25 Por consiguiente, objeto de la presente invención es – de acuerdo con un **primer** aspecto de acuerdo con la invención – una composición, en particular una composición para uso en la hibridación, en particular en la hibridación in-situ, preferiblemente la hibridación in-situ automatizada, en particular para la determinación y/o para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN, en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares,

30 en donde la composición contiene:

(a) al menos una sonda de hibridación preferiblemente específica para el locus (“componente (a)”);

(b) al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico (“componente (b)”) con estructura molecular cíclica en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol. o % en peso; y

35 (c) al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales (“componente (c)”), en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad de más de 15 % en vol., referido a la composición.

40 Con otras palabras, por consiguiente, de acuerdo con la invención está previsto proporcionar composiciones para la hibridación, de manera sinónima denominadas también soluciones de hibridación, en la que o bien en las que se presentan estabilizadas o bien disueltas las sondas de hibridación a base de la combinación de al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular acíclica, elegido de manera preestablecida, en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol. o % en peso, por una parte, y al menos una amida de ácido carboxílico o bien sus sales, preferiblemente formamida, en una cantidad mayor que 15 % en peso, referido a la composición.

45 Ya que en el marco de la presente invención se encontró, de manera totalmente sorprendente, que mediante la combinación preestablecida de al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular cíclica, elegido de manera especial, por un lado, y al menos una amida de ácido carboxílico o bien sus sales, en particular formamida o bien sus sales, por otro lado, en cada caso en las cantidades definidas en las reivindicaciones, también pueden estabilizar pequeñas cantidades de sondas de hibridación, es decir, sondas de hibridación fuertemente diluidas, en soluciones de hibridación de gran volumen. Con estas soluciones de hibridación de gran volumen de acuerdo con la invención con las sondas de hibridación en fuerte dilución se obtuvieron sorprendentemente también en el marco de procedimiento de hibridación in-situ automático, modelos de señales extraordinarios. Esto no se ha conseguido hasta ahora en el estado de la técnica.

50 Además, era totalmente sorprendente que las soluciones de hibridación de acuerdo con la invención no solo fueran adecuadas para el empleo en procedimientos de hibridación automatizados, sino que, además de ello, también tanto en el caso de tiempos de hibridación o bien de renaturalización cortos como largos conduzcan a extraordinarios

resultados o bien modelos de señales. Las soluciones de hibridación de acuerdo con la invención son adecuadas, por consiguiente, también para el empleo en el ensayo rápido, tal como, p. ej., ISH rápida o bien FISH rápida, o las denominadas hibridaciones in-situ "flexibles" con tiempos de hibridación variables.

5 La presente invención está ligada, en conjunto, con numerosas ventajas y particularidades que se comentan en lo que sigue de una manera no limitante y que se han de valorar como un indicio para la patentabilidad de la presente invención.

10 Tal como se ha expuesto precedentemente, en el marco de la presente invención se consiguió de manera sorprendente estabilizar también pequeñas cantidades de sondas de hibridación en soluciones o bien composiciones de hibridación de gran volumen, de modo que ahora ya se pueden llevar a cabo también procedimientos de hibridación in-situ automáticos o bien automatizados, obteniendo buenos modelos de señales evaluables con señales intensas, sin que se tengan que emplear grandes cantidades de sondas en comparación con procedimientos de hibridación manuales o bien establecidos.

15 Por consiguiente, las composiciones o bien soluciones de hibridación de acuerdo con la invención son ventajosas, en particular, también en relación con aspectos económicos de los procedimientos de hibridación, ya que en lo sucesivo ya se pueden llevar a cabo procedimientos de hibridación automatizados como tales de forma rentable. Además de ello, adicionalmente se aumenta en conjunto la eficiencia del procedimiento de hibridaciones in-situ, dado que los procedimientos automatizados están ligados con un mayor rendimiento de las muestras.

20 Además, las soluciones de hibridación de acuerdo con la invención se pueden emplear de múltiples maneras, ya que son adecuadas para diferentes procedimientos de hibridación in-situ. En particular, las composiciones de acuerdo con la invención pueden emplearse de igual manera para hibridaciones in-situ por fluorescencia (FISH), hibridaciones in-situ de campo brillante (BrISH), hibridaciones in-situ cromogénicas (CISH) y/o hibridaciones in-situ con plata (SISH).

25 Además de ello, las composiciones se adecuan también para hibridaciones in-situ con tiempos de hibridación o bien renaturalización tanto largos como cortos. Las composiciones de acuerdo con la invención conducen a resultados extraordinarios, en particular en el marco de ensayos rápidos con breves tiempos de hibridación, tales como procedimientos de ISH rápidas, o hibridaciones in-situ flexibles con tiempos de hibridación variables. Esto es ante todo sorprendente ante los antecedentes de que las composiciones de acuerdo con la invención contienen formamida en cantidades de al menos 15 % en peso, y la formamida requiere habitualmente tiempos de hibridación largos. Los tiempos de hibridación cortos, a pesar del empleo de formamida, se posibilitan solo mediante la combinación preestablecida de acuerdo con la invención de la al menos una amida de ácido carboxílico, en particular de la formamida, con al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, en cada caso en las cantidades definidas en las reivindicaciones.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención se distinguen, en conjunto, por su extraordinaria estabilidad, en particular de las sondas de hibridación contenidas en ellas. La estabilidad de las composiciones puede aumentarse todavía ampliamente cuando las composiciones contienen agentes de estabilización o bien de bloqueo, en particular a base de ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos, dado que estos previenen de una degradación prematura de las sondas de hibridación. Sorprendentemente, la combinación de acuerdo con la invención de al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular cíclica y formamida permite que en las composiciones de acuerdo con la invención se puedan disolver grandes cantidades de agentes de estabilización o bien de bloqueo, en particular a base de ácidos nucleicos.

35 Finalmente, los modelos de señales de las hibridaciones in-situ, obtenidos con las composiciones de acuerdo con la invención, se distinguen, en conjunto, por su extraordinaria calidad. Se generan señales distintas y bien evaluables. Además de ello, también pueden minimizarse al menos esencialmente señales no específicas o bien tinciones de fondo no específicas, es decir, las composiciones de hibridación de acuerdo con la invención se distinguen por su extraordinaria rigurosidad.

40 Para una mejor comprensión de la presente invención se definen en lo que siguen las terminologías y denominaciones centrales de la composición de acuerdo con la invención:

45 La hibridación in-situ empleada de acuerdo con la invención se basa en la hibridación o bien el apareamiento de bases complementarias de cadenas sencillas de ácidos nucleicos, en particular cadenas sencillas de ADN, de modo que se pueden detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos, es decir, las zonas de los cromosomas o bien del ADN a detectar, en una muestra, tal como un tejido o un preparado celular. En el marco de la hibridación in-situ se hibridan y, a continuación, se detectan sondas de hibridación marcadas de forma directa o indirecta, preparadas de modo sintético, en particular de manera específica para el locus, a base de ácidos nucleicos con cadenas sencillas de ácidos nucleicos de la muestra.

55 Básicamente, la hibridación in-situ puede tener lugar en diferentes estadios del ciclo celular de las células o bien núcleos celulares investigados, habiéndose establecido una realización en la metafase cuando los cromosomas están presentes en estado condensado, o en la interfase, cuando los cromosomas están presentes de forma descondensada. En función del objetivo o bien finalidad de la hibridación in-situ, no siempre es posible una

realización de cromosomas condensados en la metafase, en particular, por ejemplo, en el caso de investigar las células de tumores sólidos en cuanto a aberraciones cromosómicas. En estos casos, la hibridación in-situ se lleva a cabo en las células que se encuentran en la interfase.

5 Por sondas de hibridación específicas para el locus se entienden en el marco de la presente invención sondas específicas para una zona del cromosoma o bien zona del ADN a detectar, o bien complementarias a una zona del cromosoma o bien a una zona del ADN a detectar del material del ADN o bien del material genético en una sonda a investigar. También puede estar previsto detectar el ARN preferiblemente de genes individuales o bien emplear sondas de hibridación, específicas para el locus, que son específicas para el ARN, preferiblemente de genes individuales. Habitualmente, las sondas de hibridación utilizadas de acuerdo con la invención se basan en ácidos nucleicos o bien fragmentos de ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos y están en condiciones de unirse o bien de hibridarse específicamente a la zona del cromosoma o bien zona del ADN a detectar. En el caso de los ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos se puede tratar, en particular, de ADN, ARN, *ácidos nucleicos bloqueados* (LNA, por sus siglas en inglés), o *ácidos nucleicos peptídicos* (PNA, por sus siglas en inglés). Para los fines de detección, las sondas de hibridación específicas para el locus están marcadas, además de ello, de manera directa o indirecta con marcadores de detección. La zona del cromosoma o bien zona del ADN a detectar puede presentar una longitud variable. En particular, puede estar previsto que una zona del cromosoma o bien zona del ADN a detectar o bien un ARN a detectar comprenda, en parte o por completo, un único gen o bien un gen individual. De igual manera, también puede estar previsto que una zona del cromosoma o bien zona del ADN a detectar comprenda, en parte o por completo, varios genes, preferiblemente genes contiguos, de preferencia dos genes. Además, en el marco de la presente invención puede estar previsto también que en el caso de las sondas de hibridación se trate de sondas de hibridación de *pintado de todo el cromosoma* (WCP, por sus siglas en inglés) o de sondas de *pintado parcial del cromosoma* (PCP, por sus siglas en inglés) que comprenden una pluralidad de diferentes sondas de hibridación específicas para el locus, que están en cada caso marcadas con al menos una etiqueta de detección y permiten la detección de cromosomas enteros y/o de segmentos de cromosomas. En lo que se refiere a la configuración de las sondas de hibridación como tales, ésta es habitual para el experto en la materia, de modo que al respecto no requiere de informaciones adicionales.

En lo que respecta, además de ello, a la expresión de la muestra biológica, ésta se puede tratar en este caso, en particular, de tejido o bien componentes de tejido, en particular de segmentos de tejido a investigar. Además de ello, también puede estar previsto emplear células individuales o agregaciones de células o núcleos celulares aislados como muestra biológica.

En el marco de la presente invención se entienden por disolventes apróticos polares, en particular, disolventes no acuosos que no contienen un protón ionizable en la molécula. Con otras palabras, los disolventes apróticos se basan, en particular, en moléculas que no disponen de grupos funcionales, a partir de los cuales los átomos de hidrógeno puedan ser entregados o bien disociados en forma de protones. Además de ello, en el marco de la presente invención, disolventes apróticos polares están sustituidos preferiblemente con grupos funcionales fuertemente polarizantes, tales como grupos carbonilo, grupos nitrilo o grupos tiol, de modo que las moléculas en las que se fundamenta el disolvente presentan un momento dipolar. Disolventes apróticos polares pueden presentarse tanto en forma alifática como aromática o cíclica. De acuerdo con la invención, se ha manifestado particularmente ventajoso emplear disolventes polares apróticos con una estructura molecular cíclica. Además de ello, en el marco de la presente invención está previsto que las composiciones de acuerdo con la invención no contengan dimetilsulfóxido (DMSO) o bien estén exentas de DMSO. Para particularidades adicionales a la expresión del disolvente polar aprótico se puede remitir a RÖMPP Chemielexikon, 10ª edición, editorial Thieme, Stuttgart Nueva York, 1996, página 241, Entrada: "Disolventes apróticos", así como a la bibliografía referenciada en el mismo, que se incorpora con ello en todo su contenido.

Por disolventes polares apróticos se entienden, por el contrario, en el marco de la presente invención, en particular disolventes no acuosos que contienen un protón ionizable en la molécula y/o que están en condiciones de liberarlo y/o que están en condiciones de configurar enlaces de puentes de hidrógeno. Con otras palabras, disolventes polares próticos en el marco de la presente invención se basan, en particular, en moléculas que disponen de grupos funcionales a partir de los cuales pueden entregarse o bien disociarse átomos de hidrógeno en forma de protones o bien que están funcionalizadas de manera que pueden entregar o bien pueden disociar átomos de hidrógeno en forma de protones. Disolventes polares próticos pueden designarse, además de ello, también como disolventes polares anfipróticos. Para particularidades adicionales a la expresión del disolvente polar prótico se puede remitir a RÖMPP Chemielexikon, 10ª edición, editorial Thieme, Stuttgart Nueva York, 1996, página 3597, Entrada: "Disolventes próticos", así como a la bibliografía referenciada en el mismo, que se incorpora con ello en todo su contenido.

Por amidas de ácidos carboxílicos se entienden en el marco de la presente invención derivados del amoniaco, así como de aminas primarias y secundarias, en las que uno o varios átomos de hidrógeno del nitrógeno pueden estar reemplazados por restos de ácido carboxílico o bien estar sustituidos con restos de ácido carboxílico. Resultados particularmente buenos en relación con las hibridaciones in-situ se consiguen cuando las composiciones de acuerdo con la invención contengan formamida como amida de ácido carboxílico, la cual se trata de la amida del ácido fórmico y, por consiguiente, de la amida del ácido carboxílico más sencilla. En lo afecta, además de ello, a la cantidad empleada de amida de ácido carboxílico, en particular formamida, ésta asciende, de acuerdo con la

invención, a más de 15 % en vol. Se da a conocer también una cantidad de más de 10 % en vol. es decir, queda excluida una cantidad de exactamente 15 % en vol.

La composición de acuerdo con la invención puede estar configurada de una manera múltiple. Formas de realización preferidas se exponen en detalle en lo que sigue:

5 En el marco de la presente invención, se ha conseguido, sorprendentemente, obtener, también con composiciones de hibridación de gran volumen que contienen las sondas de hibridación solo en pequeñas concentraciones y/o cantidades o bien cantidades de sondas de hibridación pequeñas referidas al volumen empleado, modelos de señales bien evaluables en el marco de hibridaciones in-situ.

10 Resultados particularmente buenos se alcanzan de acuerdo con la invención cuando la composición (a) contiene al menos una sonda de hibridación específica para el locus en una concentración en el intervalo de 0,1 ng/μl a 50 ng/μl, en particular de 0,5 ng/μl a 50 ng/μl, preferiblemente de 0,7 ng/μl a 8 ng/μl, preferiblemente de 1 ng/μl a 5 ng/μl, referida a la composición. En el marco de la presente invención fue totalmente sorprendente que las sondas de hibridación específicas para el locus puedan estabilizarse en las concentraciones antes mencionadas en las soluciones de hibridación de acuerdo con la invención y, de esta forma, conducir a extraordinarios modelos de
15 señales también en el caso de empleo en procedimientos de hibridación automatizados. La provisión de soluciones de hibridación que permiten una realización económica o bien ahorrativa de gastos de procedimientos de hibridación automatizados no se ha conseguido hasta ahora en el estado de la técnica.

20 En lo que se refiere en especial a al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, éste se elige preferiblemente del grupo de disolventes con funcionalidad lactona, sulfona, nitrilo, carbonato y/o amida.

En particular, puede estar previsto que el al menos un disolvente polar aprótico o polar prótico con estructura molecular cíclica se elija del grupo de carbonato de etileno, pirrolidonas, lactamas, sulfito de etileno, γ-butirolactona, tritiocarbonato de etileno, carbonato de propileno y/o sulfolano, en particular carbonato de etileno y/o pirrolidonas, preferiblemente carbonato de etileno.

25 También en el marco de la presente invención puede estar previsto que el al menos un disolvente con estructura molecular cíclica sea un disolvente polar aprótico, en particular elegido de carbonatos cíclicos (ésteres de ácidos carbónicos cíclicos), en particular ésteres de ácidos carbónicos cíclicos de alquilenglicoles, preferiblemente carbonato de etileno (1,3-dioxolan-2-ona) y carbonato de propileno, de manera particularmente preferida carbonato de etileno, así como mono-, di- y tri-tiocarbonatos cíclicos, en particular sulfito de etileno y tritiocarbonato de etileno.

30 Además, se obtienen buenos resultados de acuerdo con la invención, cuando el al menos un disolvente con estructura molecular cíclica es un disolvente polar aprótico, en particular elegido de amidas cíclicas apróticas (lactamas), en particular pirrolidonas N-alquil-sustituidas, preferiblemente N-metil-2-pirrolidona y/o N-etil-2-pirrolidona.

35 También puede estar previsto de acuerdo con la invención que el al menos un disolvente con estructura molecular cíclica sea un disolvente polar prótico, en particular elegido de amidas cíclicas próticas (lactamas), en particular amidas cíclicas próticas (lactamas) con un átomo de hidrógeno en el nitrógeno de la amida (nitrógeno de lactama), preferiblemente del grupo de 2-pirrolidona (γ-butirolactama), 3-pirrolidona, caprolactamas y/o 2-piperidona (valerolactama), de manera particularmente preferida, pirrolidonas, de manera muy particularmente preferida 2-pirrolidona (γ-butirolactama).

40 Además de ello en el marco de la presente invención puede estar previsto que el al menos un disolvente sea un disolvente polar prótico con una estructura molecular cíclica, en donde la estructura molecular cíclica comprende un N-heterociclo con átomo de hidrógeno libre en el átomo de nitrógeno.

45 De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, puede estar previsto que el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico se elija del grupo de carbonato de etileno, 2-piperidona (valerolactama), 2-pirrolidona (γ-butirolactama), 3-sulfoleno ("butadieno sulfona") y/o γ-butirolactona. Los mejores resultados se alcanzan, de acuerdo con la invención, cuando el disolvente polar prótico o polar aprótico sea γ-butirolactona, 2-pirrolidona (γ-butirolactama) y/o carbonato de etileno. A este respecto, se remite también a los ejemplos de realización llevados a cabo por parte de la solicitante y expuestos más adelante, que confirman las propiedades superiores de los disolventes polares próticos o polares apróticos precedentemente mencionados, en
50 las composiciones de acuerdo con la invención.

Mediante el empleo de al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico en la composición de acuerdo con la invención – en particular en combinación con al menos una amida de ácido carboxílico, preferiblemente formamida – pueden compensarse, por una parte, los inconvenientes que van acompañados del empleo de formamida en soluciones de hibridación, tales como largos tiempos de hibridación. Además de ello – sin desear limitarse con ello a esta teoría – mediante el empleo de disolventes polares próticos o apróticos en las composiciones de acuerdo con la invención se aumenta en conjunto la solubilidad para ácidos nucleicos, lo cual mejora de nuevo la estabilidad de las composiciones de hibridación de acuerdo con la invención. Ya que mediante la buena capacidad de disolución para
55

5 ácidos nucleicos pueden incorporarse en las composiciones grandes cantidades de ácidos nucleicos no hibridantes, no específicos, en particular ADN de estabilización, como los denominados agentes de bloqueo o bien de estabilización, los cuales, por una parte, previenen una degradación de las sondas de hibridación específicas para el locus y, además de ello, mejoran en conjunto el modelo de señales y previenen señales mediante enlaces o bien hibridaciones no específicos, es decir, también conducen a un aumento de la rigurosidad.

10 En lo que se refiere a la cantidad empleada del al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, ésta puede variar dentro de amplios intervalos. De acuerdo con la invención, puede estar previsto particularmente que la composición (b) contenga el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica en una cantidad que no conduzca a la desnaturalización de ácidos nucleicos. En el marco de la presente invención está previsto, en particular, mediante el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico disolver y estabilizar los ácidos nucleicos en la composición de acuerdo con la invención, en donde el disolvente se emplea, sin embargo, en una cantidad que por sí sola, es decir, sin el empleo adicional de al menos una amida de ácido carboxílico, no conduciría a la desnaturalización de los ácidos nucleicos.

15 En particular, la composición según la presente invención puede contener al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico, con una estructura molecular cíclica en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol. o % en peso, preferiblemente de 5 a 20 % en vol. o % en peso, de manera particularmente preferida de 7 a 15 % en vol. o % en peso, referido a la composición. Se da a conocer también una cantidad de 0,5 a 40 % en vol. o % en peso, en particular de 1 a 35 % en vol. o % en peso, 2 a 30 % en vol. o % en peso.

20 Además de ello en el marco de la presente invención se prefiere que la composición (b) contenga a al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica en una cantidad de al menos 5 % en vol. o % en peso, preferiblemente de al menos 7 % en vol. o % en peso, de manera muy particularmente preferida de al menos 10 % en vol. o % en peso. Se dan a conocer también cantidades de al menos 0,5 % en vol. o % en peso, de al menos 1 % en vol. o % en peso, de al menos 2 % en vol. o % en peso, de al menos 5 % en vol. o % en peso. De igual manera, puede estar previsto que la composición (b) contenga a el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica en una cantidad de a lo sumo 50 % en vol. o % en peso, en particular de a lo sumo 40% en vol. o % en peso, preferiblemente de a lo sumo 30 % en vol. o % en peso, preferiblemente de a lo sumo 20 % en vol. o % en peso, de manera particularmente preferida de a lo sumo 15 % en vol. o % en peso, de manera muy particularmente preferida de a lo sumo 13 % en vol. o % en peso, referido a la composición.

30 En el marco de la presente invención se ha demostrado, en conjunto, que el mantenimiento de los intervalos de cantidades antes mencionados mejora significativamente el modelo de señales obtenido. También la cantidad de la al menos una amida de ácido carboxílico o bien de sus sales, en particular de la formamida o bien de sus sales, se ha manifestado como un factor crítico en relación con las intensidades de señales o bien los modelos de señales. En relación con las cantidades del al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico, por una parte, y la al menos una amida de ácido carboxílico. en particular de la formamida, por otra parte, se remite también a los ejemplos de realización llevados a cabo por parte de la solicitante y expuestos en detalle en lo que sigue, los cuales confirman que solo el empleo de cantidades especialmente elegidas de disolvente y amida de ácido carboxílico conduce a los extraordinarios modelos de señales en la realización de hibridaciones in-situ, en particular en un dispositivo automático o bien como ensayo rápido con tiempos de hibridación cortos o bien flexibles.

40 En el marco de la presente invención puede estar previsto, en particular, que la composición (c) contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o a sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad que conduzca a la desnaturalización de ácidos nucleicos. Con otras palabras, por consiguiente, en el marco de la presente invención puede estar previsto que la composición contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico, en particular formamida, en una cantidad que, por sí sola, es decir, sin disolvente polar prótico o polar aprótico, conduciría ya a la desnaturalización de los ácidos nucleicos.

45 En lo que se refiere además a las cantidades empleadas de la al menos una amida de ácido carboxílico, se ha manifestado ventajoso que la composición (c) contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o a sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad en el intervalo de 15 a 50 % en vol., preferiblemente de 17 a 40 % en vol., preferiblemente de 20 a 30 % en vol., referido a la composición. Se da a conocer también una cantidad de 10 a 60 % en vol. referido a la composición.

50 Además de ello, puede estar previsto que la composición (c) contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o a sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad de al menos 15 % en vol., preferiblemente de al menos 17 % en vol., de preferencia de al menos 20 % en vol., referido a la composición. Se da a conocer también una cantidad de 10 % en vol., referida a la composición. De igual manera, puede estar previsto que la composición (c) contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o a sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad de a lo sumo 50 % en vol., preferiblemente a lo sumo 40 % en vol., de preferencia a lo sumo 30 % en vol., referido a la composición. Se da a conocer también una cantidad de a lo sumo 60 % en vol. referido a la composición.

55 Además de ello, puede estar previsto que la composición (c) contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o a sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad de al menos 15 % en vol., preferiblemente de

al menos 17 % en vol., de preferencia de al menos 20 % en vol., referido a la composición. Se da conocer también una cantidad de 10 % en vol., referida a la composición. De igual manera, puede estar previsto que la composición (c) contenga a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o a sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad de a lo sumo 50 % en vol., preferiblemente de a lo sumo 40 % en vol., de preferencia de a lo sumo 30 % en vol., referido a la composición. Se da a conocer también una cantidad de a lo sumo 60 % en vol. referido a la composición.

Junto a las cantidades absolutas empleadas se ha manifestado ventajoso en relación con los modelos de señales obtenidos con la composición de acuerdo con la invención que el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico, por una parte, y la al menos una amida de ácido carboxílico, en particular formamida, se empleen una relación cuantitativa definida entre sí:

Resultados particularmente buenos se consiguen en el marco de las hibridaciones in-situ cuando la composición contiene el componente (b) y el componente (c) o bien el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, y la al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una relación referida al volumen en el intervalo de 1:100 a 50:1, en particular de 1:50 a 20:1, preferiblemente de 1:25 a 10:1, preferiblemente de 1:10 a 5:1, de manera particularmente preferida de 1:5 a 1:1, de manera muy particularmente preferida de 1:3 a 1:2.

Además de ello, se ha manifestado ventajoso que la composición contenga al menos un polisacárido ("componente (d)"), en particular un biopolisacárido, preferiblemente un biopolisacárido neutro, preferiblemente dextrano y/o sus derivados o sales, de manera particularmente preferida sulfato de dextrano. En el marco de la presente invención se ha manifestado sorprendente que los resultados de hibridación con las composiciones de acuerdo con la invención puedan continuar mejorándose todavía cuando las composiciones de acuerdo con la invención contienen al menos un polisacárido, en particular para la estabilización. A este respecto, también se remite a los ejemplos de realización de acuerdo con la invención que confirman el efecto del polisacárido en las composiciones. Resultados particularmente buenos se alcanzan cuando como polisacáridos se emplea sulfato de dextrano.

En lo que se refiere a la cantidad del al menos un polisacárido en las composiciones, se ha manifestado particularmente ventajoso que la composición contenga el componente (d) en una cantidad en el intervalo de 0,1 a 50 % en peso, en particular de 1 a 40 % en peso, preferiblemente de 5 a 30 % en peso, preferiblemente de 10 a 20 % en peso, referido a la composición.

Además de ello, en el marco de la presente invención puede estar previsto que la composición contenga al menos un sistema tampón químico, en particular en forma de sal o sales tampón ("componente (e)"). En particular, el sistema tampón químico sirve para el ajuste o bien el mantenimiento constante del valor del pH de la composición.

Las cantidades empleadas del sistema tampón químico pueden variar dentro de amplios intervalos. En el marco de la presente invención se ha manifestado ventajoso que la composición (e) contenga al sistema tampón químico, referido a la composición y calculado como suma de todos los componentes del sistema tampón químico, en una cantidad en el intervalo de 0,001 a 5 % en peso, en particular de 0,01 a 4 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 3 % en peso, preferiblemente de 0,5 a 2 % en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 1,5 % en peso.

En lo que se refiere a la elección del sistema tampón, ésta se encuentra en el conocimiento habitual del experto en la materia. Resultados particularmente buenos se alcanzan en el marco de la presente invención, cuando el sistema tampón químico contiene al menos una sal, en particular al menos una sal de ácido carboxílico, preferiblemente un citrato y/o al menos una sal inorgánica, en particular al menos una sal de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, preferiblemente al menos un cloruro de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, de manera particularmente preferida cloruro de sodio. De manera particularmente preferida, el sistema tampón químico es un sistema tampón basado en citrato o bien un sistema tampón basado en citrato sobre la base de citrato trisódico/cloruro sódico.

De acuerdo con una forma de realización preferida, se emplea el sistema tampón SSC conocido por el experto en la materia a base de citrato trisódico (0,3 M en el caso de SSC 20 veces concentrado) y cloruro sódico (3 M en el caso de SSC 20 veces concentrado). Además de ello, también es posible emplear otros sistemas tampón bien conocidos como tales por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, HEPES [ácido 2-(4-(2-hidroxi-etil)1-piperazinil)-etano-sulfónico], SSPE [cloruro sódico/fosfato sódico / EDTA], PIPES [piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)], TMAC [cloruro de tetrametilamonio], TRIS [tris(hidroximetil)-aminometano] o tampón SET.

Resultados particularmente buenos en el marco de la presente invención se alcanzan, además cuando la composición presenta un valor del pH en el intervalo de 5,0 a 9,0, en particular en el intervalo de 5,5 a 8,5, preferiblemente en el intervalo de 6,0 a 8,0, de preferencia en el intervalo de 6,5 a 7,5.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, puede estar previsto, además, que la composición contenga al menos un agente de bloqueo y/o de estabilización ("componente (f)"), en particular en donde el agente de bloqueo y/o de estabilización se basa en ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos, preferiblemente en ADN y/o ARN. En el caso de los ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos como agente de bloqueo y/o de estabilización puede tratarse, en particular, también de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). El empleo de al menos un agente de bloqueo o bien de estabilización es

ventajoso desde un punto de vista múltiple ya que, por un lado, se pueden estabilizar las sondas de hibridación empleadas y se puede prevenir una descomposición prematura o bien una degradación prematura de las sondas. Por otra parte, se pueden minimizar señales de fondo no específicas en el modelo de señales de la hibridación in-situ.

- 5 En virtud de los componentes empleados de acuerdo con la invención, en particular en virtud de la combinación de acuerdo con la invención del al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico, por una parte, y de la al menos una amida de ácido carboxílico, en particular de la formamida, por otra parte, en cantidades en cada caso definidas, es posible disolver grandes cantidades de agente o agentes de bloqueo y/o de estabilización en la composición de acuerdo con la invención. Por consiguiente, de acuerdo con la invención puede estar previsto que la composición (f)
- 10 contenga a el al menos un agente de bloqueo y/o de estabilización en una concentración en el intervalo de 0,001 µg/µl a 100 µg/µl, en particular de 0,005 µg/µl a 80 µg/µl, preferiblemente de 0,01 µg/µl a 40 µg/µl, preferiblemente de 0,05 µg/µl a 20 µg/µl, de manera particularmente preferida de 0,1 µg/µl a 10 µg/µl, referido a la composición.

- Además de ello, en relación con las composiciones de acuerdo con la invención es ventajoso que la composición contenga al menos una sal inorgánica ("componente (g)"), en particular una sal de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, preferiblemente un cloruro de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, de manera particularmente
- 15 preferida cloruro sódico.

- Las cantidades empleadas de la al menos una sal inorgánica pueden variar dentro de amplios intervalos. Resultados particularmente buenos se alcanzan con la composición de acuerdo con la invención cuando la composición (g) contiene a la al menos una sal inorgánica en una cantidad en el intervalo de 0,01 a 15 % en peso, en particular de
- 20 0,05 a 10 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 10 % en peso, de preferencia de 0,5 a 5 % en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 3 % en peso, referido a la composición.

- Además de ello, se ha demostrado sorprendentemente que los modelos de señales obtenidos en el marco de las hibridaciones in-situ pueden ser mejoradas adicionalmente cuando las composiciones o bien soluciones de hibridación de acuerdo con la invención contengan al menos un detergente y/o un tensioactivo ("componente (h)").
- 25 Por un detergente o bien tensioactivo se entiende en el marco de la presente invención sustancias que están en condiciones de reducir la tensión superficial de líquidos o bien la tensión superficial entre dos fases. Sobre esta base se fomenta o bien mejora la formación de dispersiones o bien soluciones.

- Mediante el empleo de al menos un detergente o bien tensioactivo en las composiciones o bien soluciones de hibridación de acuerdo con la invención se mejora o bien refuerza – sin desear limitarse en este caso a esta teoría - , por una parte, la hibridación específica de ácidos nucleicos en la muestra y sondas de hibridación. Por otra parte –
- 30 asimismo sin desear con ello limitarse a esta teoría – se debilita en el marco de la evaluación o bien del análisis de muestras o bien preparados de hibridación in-situ la coloración del núcleo llevada a cabo habitualmente o bien la coloración del núcleo, lo cual conduce de nuevo a un contraste mejorado de señales con el fondo y, en conjunto, con intensidades de señales más fuertes.

- Resultados particularmente buenos se alcanzan en el marco de la presente invención cuando el detergente y/o tensioactivo se elige de tensioactivos no iónicos, preferiblemente polialquilenglicoléteres, de manera particularmente
- 35 preferida polialquilenglicoléteres del alcohol laurílico y/o del alcohol cetílico y/o del alcohol cetilestearílico y/o del alcohol oleílico, en particular del alcohol laurílico. A este respecto, se prefiere particularmente que el detergente y/o el tensioactivo se elija de polioxietilen(4)lauriléter, polioxietilen(9)lauriléter y/o polioxietilen(23)lauriléter, en particular
- 40 polioxietilen(23)lauriléter.

- Las cantidades del detergente o bien tensioactivo empleadas son variables. Se ha manifestado particularmente ventajoso que la composición contenga a el al menos un detergente y/o tensioactivo en una cantidad en el intervalo de 0,001 a 5 % en peso, en particular de 0,01 a 3 % en peso, preferiblemente de 0,05 a 2 % en peso, de manera
- 45 preferida de 0,1 a 1,5 % en peso, de manera particularmente preferida de 0,12 a 1 % en peso, referido a la composición.

Con relación a las propiedades ventajosas de detergentes o bien tensioactivos se remite también a los ejemplos de realización de acuerdo con la invención, los cuales confirman sus efectos positivos sobre los resultados de hibridación o bien intensidades de señales.

- En lo que a la ejecución de la composición de acuerdo con la invención además se refiere, puede estar particularmente previsto que se trate de una solución acuosa. A este respecto, es ventajoso que la composición contenga agua, en particular agua purificada, en una cantidad en el intervalo de 10 a 99 % en peso, en particular en
- 50 el intervalo de 20 a 95 % en peso, de preferencia en el intervalo de 30 a 90 % en peso, de manera particularmente preferida en el intervalo de 40 a 85 % en peso, referido a la composición.

- Además, en el marco de la presente invención puede estar previsto que la composición contenga agua en una cantidad que en la suma, incluyendo todos los componentes, resulte siempre de 100 % o bien 100 % en peso,
- 55 referido a la composición.

Además, también puede estar previsto que la composición contenga agua como soporte o bien excipiente. De igual manera, puede estar previsto que la composición esté configurada de forma acuosa.

Objeto de la presente invención – de acuerdo con una forma de realización particularmente preferida – es, por consiguiente, una composición para uso en la hibridación, en particular en la hibridación in-situ, preferiblemente la hibridación in-situ automatizada, en particular para la determinación y/o para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN, en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, en particular, una composición tal como se describió precedentemente, conteniendo la composición:

- 5
- 10 (a) al menos una sonda de hibridación, preferiblemente específica para el locus (“componente (a)”), en particular en una concentración en el intervalo de 0,1 ng/μl a 50 ng/μl, en particular de 0,5 ng/μl a 50 ng/μl, preferiblemente de 0,7 ng/μl a 8 ng/μl, preferiblemente de 1 ng/μl a 5 ng/μl, referida a la composición;
- (b) al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico (“componente (b)”) con estructura molecular cíclica, en particular en una cantidad en el intervalo de 5 a 40% en vol, preferiblemente de 5 a 20 % en vol., de manera particularmente preferida de 7 a 15 % en vol., referido a la composición;
- 15 (c) al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales (“componente (c)”), en particular formamida y/o sus sales, en particular en una cantidad en el intervalo de 15 a 50 % en vol., preferiblemente de 17 a 40 % en vol., preferiblemente de 20 a 30 % en vol., referido a la composición;
- 20 (d) eventualmente, al menos un polisacárido (“componente (d)”), preferiblemente un biopolisacárido neutro, preferiblemente dextrano y/o sus derivados o sales, en particular en una cantidad en el intervalo de 0,1 a 50 % en peso, en particular de 1 a 40 % en peso, preferiblemente de 5 a 30 % en peso, preferiblemente de 10 a 20 % en peso, de manera particularmente preferida de 13 a 18 % en peso, referido a la composición;
- 25 (e) eventualmente, al menos un sistema tampón químico (“componente (e)”), en particular en forma de sal o sales tampón, en particular en una cantidad en el intervalo de 0,001 a 5 % en peso, en particular de 0,01 a 4 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 3 % en peso, preferiblemente de 0,5 a 2 % en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 1,5 % en peso, referido a la composición y calculado como suma de todos los componentes del sistema tampón químico;
- 30 (f) eventualmente, al menos un agente de bloqueo y/o de estabilización (“componente (f)”), en particular en una concentración en el intervalo de 0,001 μg/μl a 100 μg/μl, en particular de 0,005 μg/μl a 80 μg/μl, preferiblemente de 0,01 μg/μl a 40 μg/μl, preferiblemente de 0,05 μg/μl a 20 μg/μl, de manera particularmente preferida de 0,1 μg/μl a 10 μg/μl, referido a la composición;
- 35 (g) eventualmente, al menos una sal inorgánica (“componente (g)”), en particular sal de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, de manera particularmente preferida cloruro sódico, en particular en una cantidad en el intervalo de 0,01 a 15 % en peso, en particular de 0,05 a 10 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 10 % en peso, de preferencia de 0,5 a 5 % en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 3 % en peso, referido a la composición;
- 40 (h) eventualmente, al menos un detergente y/o tensioactivo (“componente (h)”), en particular en una cantidad en el intervalo de 0,001 a 5 % en peso, en particular de 0,01 a 3 % en peso, preferiblemente de 0,05 a 2 % en peso, de manera preferida de 0,1 a 1,5 % en peso, de manera particularmente preferida de 0,12 a 1 % en peso, referido a la composición.
- 45 De nuevo, otro objeto de la presente invención de acuerdo con otra forma de realización particularmente preferida es, además, una composición para uso en la que la hibridación, en particular la hibridación in-situ, preferiblemente la hibridación in-situ automatizada, en particular para la determinación y/o para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN, en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares, preferiblemente una composición tal como se describió precedentemente, conteniendo la composición:
- 50 (a) al menos una sonda de hibridación, preferiblemente específica para el locus (“componente (a)”), en particular en una concentración en el intervalo de 0,1 ng/μl a 50 ng/μl, en particular de 0,5 ng/μl a 50 ng/μl, preferiblemente de 0,7 ng/μl a 8 ng/μl, preferiblemente de 1 ng/μl a 5 ng/μl, referida a la composición;
- (b) al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico (“componente (b)”) con estructura molecular cíclica, de manera particularmente preferida γ-butirolactona, 2-pirrolidona (γ-butirolactama) y/o carbonato de etileno, de manera particularmente preferida carbonato de etileno en particular en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol., preferiblemente de 5 a 20 % en vol., de manera particularmente preferida de 7 a 15 % en vol., referido a la composición;
- 55 (c) formamida y/o sus sales (“componente (c)”), en particular en una cantidad en el intervalo de 15 a 50 % en vol., preferiblemente de 17 a 40 % en vol., preferiblemente de 20 a 30 % en vol., referido a la composición;

- (d) eventualmente, dextrano y/o sus derivados o sales ("componente (d)"), en particular en una cantidad en el intervalo de 0,1 a 50 % en peso, en particular de 1 a 40 % en peso, preferiblemente de 5 a 30 % en peso, preferiblemente de 10 a 20 % en peso, de manera particularmente preferida de 13 a 18 % en peso, referido a la composición;
- 5 (e) eventualmente, al menos un sistema tampón químico, en particular en forma de sal o sales tampón, preferiblemente citrato y/o cloruro sódico ("componente (e)"), en particular en una cantidad en el intervalo de 0,001 a 5 % en peso, en particular de 0,01 a 4 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 3 % en peso, preferiblemente de 0,5 a 2 % en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 1,5 % en peso, referido a la composición y calculado como suma de todos los componentes del sistema tampón químico;
- 10 (f) eventualmente, al menos un agente de bloqueo y/o de estabilización ("componente (f)"), en particular en una concentración en el intervalo de 0,001 µg/µl a 100 µg/µl, en particular de 0,005 µg/µl a 80 µg/µl, preferiblemente de 0,01 µg/µl a 40 µg/µl, preferiblemente de 0,05 µg/µl a 20 µg/µl, de manera particularmente preferida de 0,1 µg/µl a 10 µg/µl, referido a la composición;
- 15 (g) eventualmente, al menos una sal inorgánica ("componente (g)"), en particular sal de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, preferiblemente cloruro de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, de manera particularmente preferida cloruro sódico, en particular en una cantidad en el intervalo de 0,01 a 15 % en peso, en particular de 0,05 a 10 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 10 % en peso, de preferencia de 0,5 a 5 % en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 3 % en peso, referido a la composición;
- 20 (h) eventualmente, al menos un polialquilenglicoléter ("componente (h)"), en particular en una cantidad en el intervalo de 0,001 a 5 % en peso, en particular de 0,01 a 3 % en peso, preferiblemente de 0,05 a 2 % en peso, de manera preferida de 0,1 a 1,5 % en peso, de manera particularmente preferida de 0,12 a 1 % en peso, referido a la composición.

Como se desprende de las realizaciones anteriores, sobre la base de la combinación preestablecida de acuerdo con la invención se pueden estabilizar por vez primera también pequeñas cantidades de sondas de hibridación o bien sondas de hibridación en una baja concentración en composiciones para uso en la hibridación in-situ. Las composiciones de acuerdo con la invención son adecuadas tanto para el empleo en procedimientos de hibridación in-situ automatizados como en procedimientos de hibridación in-situ con tiempos de hibridación breves o bien flexibles, tales como, p. ej., ISH rápida, y conducen a modelos de señales bien evaluables con intensas señales. Composiciones de este tipo no se conocen hasta ahora del estado de la técnica.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden emplearse, en particular, para hibridaciones in-situ en relación con el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, en particular tumores malignos, preferiblemente carcinomas, sarcomas y/o leucemias.

Los genes a investigar a este respecto se eligen preferiblemente del grupo de ALK, 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.

40 Resultados particularmente buenos se alcanzan en el marco de la presente invención cuando las composiciones de acuerdo con la invención se emplean para la detección de aberraciones cromosómicas a base de inversiones y/o translocaciones.

A este respecto, las composiciones de acuerdo con la invención pueden emplearse, en particular, para la detección de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular en tumores de pulmón, estando particularmente afectados los genes ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B y/o TGF.

45 Además, puede estar previsto emplear la composición de acuerdo con la invención para la determinación de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular, en linfomas y leucemias, estando afectados, en particular, los genes BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1 y/o RUNX1T1.

50 De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, la composición de acuerdo con la invención puede emplearse para la determinación de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular en sarcomas, estando afectados, en particular, los genes EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6 y/o WT1.

También puede estar previsto, de acuerdo con la invención, emplear la composición para la determinación de inversiones y/o translocaciones, estando afectados, en particular, los genes AKL y ROS1.

En el marco de una forma de realización preferida de la presente invención, la composición de acuerdo con la invención puede emplearse para la determinación de diferentes translocaciones y/o inversiones, en particular en tumores de pulmón, estando afectados, en particular, los genes ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B y/o TGF.

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

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

15 También, puede estar previsto de acuerdo con la invención que la composición de acuerdo con la invención se emplee para la detección de inversiones y/o translocaciones, estando afectados, en particular, los genes ALK y ROS1.

Otro objeto de la presente invención es, además, - de acuerdo con un **segundo** aspecto de la presente invención - el uso de una composición tal como se describió precedentemente, en la hibridación, en particular la hibridación in-situ, preferiblemente la hibridación in-situ automatizada, en particular para la determinación y/o para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN, en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares.

Para particularidades adicionales del uso de acuerdo con la invención puede remitirse a las realizaciones precedentes con respecto al primer aspecto de la invención que afectan a la composición de acuerdo con la invención, que son correspondientemente válidas en relación con el uso de acuerdo con la invención.

25 Otro objeto de la presente invención - de acuerdo con un **tercer** aspecto de la presente invención - es un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN y/o de aberraciones cromosómicas en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares mediante hibridación, en particular hibridación in-situ, preferiblemente hibridación in-situ automatizada, utilizando una composición tal como se describió precedentemente.

30 En el marco de la presente invención se ha encontrado, sorprendentemente, que el empleo de las composiciones de acuerdo con la invención en los procedimientos de hibridación, en particular automatizados, de acuerdo con la invención, en particular en procedimientos de hibridación in-situ, conduce a buenos modelos de señales y a señales intensas y bien evaluables. Además de ello, el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de ácidos nucleicos bajo el empleo de las composiciones de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede llevarse a cabo sorprendentemente también con cortos tiempos de hibridación, sin que se produzca un retroceso de la intensidad o bien fuerza de las señales.

40 En particular, objeto de la presente invención de acuerdo con este aspecto de la invención es un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN, y/o de aberraciones cromosómicas en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares mediante hibridación, en particular hibridación in-situ, preferiblemente hibridación in-situ automatizada, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas de procedimiento:

(a) provisión de una muestra biológica, en particular a base de una o varias células y/o uno o varios núcleos celulares, preferiblemente en forma de tejido para la hibridación in-situ;

45 (b) provisión de una composición para uso en la hibridación, en donde la composición contiene al menos una sonda de hibridación preferiblemente específica para el locus ("componente (a)"), al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular cíclica en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol. o % en peso ("componente (b)") y al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales, en particular formamida y/o sus sales, en una cantidad de más de 15 % en vol., referida a la composición ("componente (c)"), en particular de una composición tal como se describió precedentemente;

50 (c) puesta en contacto de la muestra biológica de la etapa (a) del procedimiento con la composición de la etapa (b) del procedimiento;

(d) desnaturalización de la muestra biológica de la etapa (a) del procedimiento y de la composición de la etapa (b) del procedimiento, en donde la muestra biológica y la composición son desnaturalizadas por separado entre sí, en particular antes de llevar a cabo la etapa (c) del procedimiento, o conjuntamente, en particular después de llevar a cabo la etapa (c) del procedimiento;

(e) subsiguiente hibridación de la al menos una sonda de hibridación específica para el locus contenida en la composición y los ácidos nucleicos contenidos en las muestras biológicas;

(f) subsiguiente detección de las sondas de hibridación hibridadas, preferiblemente específicas para el locus y/o de los ácidos nucleicos a detectar en la muestra biológica.

5 De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, puede estar previsto que éste se lleve a cabo en o bien dentro de un dispositivo automático y/o de forma automática. Sobre esta base, puede aumentarse significativamente la eficiencia o bien el rendimiento de las muestras de procedimientos de hibridación, en particular hibridaciones in-situ.

10 En lo que se refiere en especial a la etapa (a) del procedimiento o bien a la provisión de una muestra biológica para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en particular de la hibridación in-situ, ésta tiene lugar de una manera en sí conocida por el experto en la materia, es decir, las muestras biológicas se preparan de manera en sí conocida para la hibridación in-situ. En particular, la etapa (a) del procedimiento comprende la fijación y la embutición de las muestras sobre la base de células o bien tejidos, la aplicación de las muestras sobre soportes adecuados, el tratamiento previo de las muestras y el secado de las muestras. El experto en la materia conoce básicamente la provisión o bien la preparación de muestras para procedimientos de hibridación in-situ, de modo que
15 en este punto no se requieren explicaciones adicionales.

En relación con la etapa (b) del procedimiento o bien con la provisión de la composición se remite, con el fin de evitar repeticiones innecesarias, a los aspectos de la invención anteriores, en particular a las explicaciones en relación con la composición de acuerdo con la invención.

20 En lo que se refiere, además de ello, a la etapa (c) del procedimiento se ha manifestado ventajoso que la composición se emplee en una cantidad en el intervalo de 0,1 a 5.000 µl, en particular de 1 a 2.500 µl, preferiblemente de 2 a 1.500 µl, de preferencia de 5 a 1.000 µl, de manera particularmente preferida de 10 a 500 µl, de manera muy particularmente preferida de 20 a 250 µl, todavía más preferiblemente de 40 a 150 µl. Las cantidades de la composición antes mencionadas conducen, tanto en el caso de hibridaciones in-situ automatizadas o bien automáticas como en el caso de hibridaciones in-situ con breves tiempos de hibridación, a modelos de
25 señales cualitativamente muy valiosos y bien evaluables.

La etapa (d) del procedimiento para la desnaturalización de los ácidos nucleicos en la muestra biológica y en la composición tiene lugar básicamente de manera conocida por el experto en la materia. En el marco del procedimiento de acuerdo con la invención, la muestra biológica por una parte, y la composición, por otra parte, se pueden someter a la desnaturalización por separado una de otra antes de la puesta en contacto conforme a la etapa (e) del procedimiento. De igual manera, puede estar previsto someter la muestra biológica y la composición conjuntamente después de llevar a cabo la etapa (c) del procedimiento a una co-desnaturalización. El ajuste de las condiciones de la desnaturalización, en particular de la temperatura necesaria para ello, es en sí conocido por el experto en la materia y no requiere de explicaciones adicionales. En particular, la temperatura en la etapa (d) del
30 procedimiento puede encontrarse en el intervalo de 60 a 90 °C, preferiblemente en el intervalo de 70 a 85 °C.

También la etapa (e) del procedimiento, que sirve para la hibridación de las sondas de hibridación específicas para el locus contenidas en las composiciones de hibridación, por una parte, así como de las aberraciones de ADN o bien cromosómicas a detectar contenidas en las muestras biológicas, por otra parte, tiene lugar de manera básicamente conocida por el experto en la materia. En particular, en lo que se refiere al ajuste de una temperatura de hibridación adecuada, no son necesarias explicaciones en este punto.
40

En relación con la etapa (e) del procedimiento, se ha demostrado, además, sorprendentemente en el marco de la presente invención que la hibridación, es decir, la adición de las sondas de hibridación específicas para el locus al segmento de ADN o bien de cromosoma a detectar, se puede continuar mejorando todavía cuando la etapa (e) del procedimiento se lleva a cabo bajo movimiento, en particular movimiento ondulado y/o continuo.

45 En el marco de la presente invención se ha demostrado, además, sorprendentemente que el procedimiento de acuerdo con la invención, con el empleo de las composiciones de acuerdo con la invención, tanto con tiempos de hibridación cortos ("ISH rápida") como con los largos tiempos de hibridación habitualmente empleados conduce a resultados extraordinarios.

Así, en el marco de la presente invención puede estar previsto que en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención la hibridación o bien la etapa (e) del procedimiento se lleve a cabo a lo largo de un tiempo en el intervalo de 10 min a 240 min, en particular en el intervalo de 30 min a 180 min, preferiblemente en el intervalo de 60 min a 150 min, de preferencia en el intervalo de 90 min a 130 min. Además de ello, puede estar previsto también que la hibridación o bien la etapa (e) del procedimiento se lleve a cabo a lo largo de un tiempo en el intervalo de 1 h a 100 h, en particular de 2 h a 80 h, preferiblemente de 3 h a 50 h, de preferencia de 4 h a 30 h, de manera particularmente preferida de 5 h a 25 h, todavía más preferiblemente de 8 h a 20 h.
55

La detección de las sondas de hibridación específicas para el locus, unidas o bien hibridadas, en la muestra biológica tiene lugar asimismo con métodos en sí conocidos por el experto en la materia en función del marcaje de

las sondas de hibridación. A este respecto, no se requiere de tipo alguno de explicaciones adicionales. En el marco del procedimiento de acuerdo con la invención se detectan preferiblemente sondas de hibridación marcadas por fluorescencia (ISH fluorescente (FISH)), que son detectadas por microscopía de fluorescencia, o sondas marcadas con antígenos, en particular, sondas marcadas con haptenos, que se vuelven visibles con ayuda de anticuerpos mediante reacciones de color y que son detectadas por microscopía óptica ((ISH de campo brillante (BrISH), ISH cromogénica (CISH), ISH con plata (SISH)). Con qué precisión ha de tener lugar la detección de las sondas de hibridación marcadas empleadas en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención lo entiende por sí mismo el experto en la materia.

Para particularidades adicionales al procedimiento de acuerdo con la invención puede remitirse a las explicaciones precedentes con respecto a los aspectos de la invención anteriores que son correspondientemente válidas en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención.

Finalmente, objeto de la presente invención – de acuerdo con un **cuarto** aspecto de la presente invención – es un kit o bien kit de partes o bien sistema para la detección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARN y/o ADN y/o de aberraciones cromosómicas en una muestra biológica, preferiblemente en una o varias células y/o en uno o varios núcleos celulares mediante hibridación, en particular hibridación in-situ, preferiblemente hibridación in-situ automatizada, conteniendo el kit una composición tal como se describió precedentemente y/o en donde el kit está previsto y/o se emplea para llevar a cabo el procedimiento precedentemente expuesto.

De acuerdo con una forma de realización preferida, puede estar previsto, de acuerdo con la invención, que el kit de acuerdo con la invención contenga los componentes de la composición, tal como se describió precedentemente, en un recipiente de alojamiento o dispositivo de aplicación común o en recipientes de alojamiento y/o dispositivos de aplicación separados en el espacio, distintos entre sí.

Para particularidades adicionales con respecto al kit de acuerdo con la invención puede remitirse a las explicaciones precedentes con respecto a los restantes aspectos de la invención que son correspondientemente válidas en relación con el kit de acuerdo con la invención.

Otras características, ventajas y particularidades de la presente invención resultan de la siguiente descripción de formas de realización preferidas con ayuda de las Figuras 1 a 4.

Muestran:

La Fig. 1, una representación esquemática de resultados de hibridaciones in-situ referentes a los modelos de señales, en particular la intensidad de las señales.

La Fig. 2, una representación esquemática de los modelos de señales y, en particular, de las intensidades de señales en el caso de utilizar una sonda FISH "Auto ALK Break Apart Probe" en el marco de hibridaciones in-situ con el empleo de dispositivos automáticos de tinción.

La Fig. 3, una representación esquemática de los modelos de señales y, en particular, de las intensidades de señales en el caso de utilizar una sonda FISH flexible "Flexible ROS1 Break Apart Probe" en el marco de hibridaciones in-situ.

La Fig. 4, una representación esquemática de los modelos de señales y, en particular, de las intensidades de señales en el caso de utilizar una sonda FISH flexible "Flexible HER2/CEN17 Probe" en el marco de hibridaciones in-situ.

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de resultados de hibridación in-situ (a modo de ejemplo tanto para FISH como para BrISH y CISH), que permite sacar conclusiones sobre el modelo de señales obtenido y, en particular, las intensidades de señales. Como sondas de hibridación específicas para el locus pueden emplearse, en particular, sondas que son específicas para zonas genómicas de los genes humanos HER2, ALK o ROS1.

Básicamente, en el marco de la presente invención se parte de células diploides, es decir, por cada región genómica detectada se obtienen dos señales o bien una señal doble en células sin aberraciones. Las intensidades de señales obtenidas se subdividen en las siguientes cinco gradaciones: a) señales muy intensas, b) señales intensas, c) señales de intensidad media, d) señales débiles, e) ninguna señal, véase la Fig. 1). En lo que sigue se muestran ejemplos de modelos de señales, en particular intensidades de señales, de hibridaciones in-situ con soluciones de hibridación estándares por una parte, y soluciones de hibridación de acuerdo con la invención por otra parte, o bien de hibridaciones in-situ según el procedimiento de acuerdo con la invención y según procedimientos estándares.

Los procedimientos de acuerdo con la invención y las composiciones a base de concentraciones específicas de formamida y disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica conducen a señales muy intensas o intensas (Fig. 1 a) y b)). Estos extraordinarios modelos de señales se observan tanto en el caso de hibridaciones in-situ flexibles, es decir, en el caso de hibridaciones in-situ con un tiempo de hibridación de dos horas ("ISH rápida") o bien con un tiempo de hibridación de 16 horas, al igual que también en el caso de procedimientos automatizados para llevar a cabo la hibridación in-situ. En este caso, la intensidad de las señales se ha de

considerar como resultado tanto del brillo como del contraste con respecto al fondo (por ejemplo, un fondo demasiado intenso conduce a un contraste más débil y, por consiguiente, a señales menos intensas).

- Composiciones o bien soluciones de hibridación que contienen un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, pero que no contienen formamida, no conducen a señales de hibridación (Fig. 1 e)).
- 5 Composiciones o bien soluciones de hibridación que contienen formamida, pero ningún disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, tampoco conducen a señales de hibridación o, en todo caso, a señales de hibridación muy débiles o bien apenas detectables (Fig. 1 e) y f)).

La Fig. 2 muestra una representación esquemática del modelo de señales y de las intensidades de señales de hibridaciones in-situ que se llevan a cabo utilizando una sonda FISH "Auto ALK Break Apart Probe" en un dispositivo automático de tinción. Esta sonda de hibridación específica para el locus se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que están dirigidos en 2p23 contra secuencias situadas de manera proximal a la región del punto de ruptura de ALK, y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están dirigidos en 2p23 contra secuencias situadas distalmente con respecto a la región del punto de ruptura de ALK. La solución o bien composición de hibridación se basa en los componentes seguidamente recogidos: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 22 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,5 % en peso de carbonato de etileno, ADN de bloqueo y estabilización en una concentración de 0,1 µg/µl y sondas de hibridación específicas para el locus en una concentración de 2 ng/µl, en cada caso referido a la solución o bien composición de hibridación.

La sonda de hibridación se hibrida después de la desnaturalización (20 minutos a 75 °C) a lo largo de un tiempo de hibridación o bien renaturalización de 120 minutos a 45 °C en un dispositivo automático (Wave RPD System de Celerus) bajo constante movimiento ondular del portaobjetos con muestras de células y tejidos.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ALK no reorganizado aparecen como señales de fusión por fluorescencia verde-naranjas. En la interfase de una célula normal (sin aberración de ALK) aparecen dos señales dobles o bien de fusión verde-naranjas en el caso de utilizar un conjunto de filtro pasa banda dual verde-naranja adecuado (Fig. 2 la). Un locus 2p23 afectado por una translocación de ALK se caracteriza por una señal verde separada y una señal naranja separada (Fig. 2 lb).

Las intensidades de señal obtenidas y, por consiguiente, la capacidad de evaluación de los resultados dependen de manera decisiva de las concentraciones específicas de los disolventes polares próticos o polares apróticos con estructura molecular cíclica (CPAL) y de la formamida en las soluciones de hibridación en las que se fundamentan de las sondas de hibridación. En el caso de bajas concentraciones de los disolventes polares próticos o polares apróticos con estructura molecular cíclica (CPAL), p. ej., tal como aquí carbonato de etileno, entre 5 % en peso y 13 % en peso y concentraciones de formamida mayores que 10 % en vol., aparecen señales de fluorescencia muy intensas en el caso de un fondo muy bajo (Fig. 2 I). Composiciones comparativas, que no contienen formamida, no conducen a resultados evaluables, es decir, no se pueden generar señales específicas para los genes (Fig. 2 II).

35 Composiciones comparativas que no contienen disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, p. ej., carbonato de etileno, conducen a señales muy débiles y, por consiguiente malamente evaluables (Fig. 2 III).

La Fig. 3 muestra una representación esquemática de los modelos de señales y de las intensidades de señales de hibridaciones in-situ que se llevan a cabo utilizando una sonda FISH "Flexible ROS1 Break Apart Probe". Esta sonda de hibridación específica para el locus se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que en 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas de manera proximal a la región del punto de ruptura de ROS1 y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas distalmente con respecto a la región del punto de ruptura de ROS1. La solución o bien composición de hibridación se basa en los siguientes componentes: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 9,75 % en peso de carbonato de etileno, ADN de bloqueo y estabilización en una concentración de 2 µg/µl y sondas de hibridación específicas para el locus en una concentración de 5 ng/µl, en cada caso referido a la solución o bien composición de hibridación. Las sondas de hibridación son hibridadas después de la desnaturalización (10 minutos a 75 °C) a lo largo de un tiempo de hibridación o bien de renaturalización de 10 minutos, ya sea durante 2 horas a 37 °C o bien durante 16 horas a 37 °C con muestras de células y tejidos.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen ROS1 no reorganizado aparecen como señales de fluorescencia verde-naranjas. En la interfase de una célula normal (sin aberración de ROS1) aparecen dos señales de fusión o dobles verde-naranjas en el caso de utilizar un conjunto de filtro pasa banda dual verde-naranja adecuado (Fig. 3 la). Un locus 6q22 afectado por una translocación de ROS1 se caracteriza por una señal verde separada y una señal naranja separada (Fig. 3 lb).

Las intensidades de señal obtenidas y, por consiguiente, la capacidad de evaluación de los resultados dependen de manera decisiva de las concentraciones específicas de los disolventes polares próticos o polares apróticos con estructura molecular cíclica (CPAL) y de la formamida en las soluciones de hibridación en las que se fundamentan de la sonda de hibridación específica para el locus. En el caso de bajas concentraciones de los disolventes polares

próticos o polares apróticos con estructura molecular cíclica (CPAL), p. ej., tal como aquí carbonato de etileno, en el intervalo de 5 % en peso y 13 % en peso, así como concentraciones de formamida mayores que 10 % en peso, aparecen señales de fluorescencia muy intensas en el caso de un fondo muy bajo, tanto después de un tiempo de hibridación de dos horas como de 16 horas (Fig. 3 I). En relación con la intensidad de señales, con las soluciones de hibridación de acuerdo con la invención se alcanzan resultados extraordinarios tanto en el caso de un breve tiempo como también de un largo tiempo de hibridación.

Composiciones comparativas que contienen un disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular cíclica, pero que no contienen formamida, no conducen, tanto después de un tiempo de hibridación de dos como de 16 horas a resultados evaluables algunos, es decir, no se pueden generar señales específicas para genes (Fig. 3 II). Composiciones que contienen formamida, pero que no contienen disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular cíclica (CPAL), conducen a señales muy débiles (Fig.3 III).

La Fig. 4 muestra una representación esquemática de los modelos de señales y de las intensidades de señales de hibridaciones in-situ que se llevan a cabo utilizando una sonda FISH "Flexible HER2/CEN17 Probe". Esta sonda 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 HER2 y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están dirigidos contra la región del centrómero satélite alfa del cromosoma 17 (D17Z1). La solución de hibridación contiene los componentes expuestos en lo que sigue: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno, ADN de bloqueo y estabilización en una concentración de 2 µg/µl y sondas de hibridación específicas para el locus en una concentración de 5 ng/µl, en cada caso referido a la composición. Las sondas de hibridación son hibridadas después de la desnaturalización (10 minutos a 75 °C) a lo largo de dos horas a 37 °C o bien de 16 horas a 37 °C con muestras de células y tejidos.

En el caso de utilizar conjuntos de filtro adecuados, las señales de hibridación para el gen HER2 no reorganizado aparecen en el modelo de señales como dos señales de fluorescencia verdes y las señales de hibridación para la región del centrómero no reorganizada del cromosoma 17 aparecen como dos señales de fluorescencia naranjas. En la interfase de una célula normal sin aberración de HER2 y sin aberraciones del cromosoma 17 aparecen dos señales verdes y dos señales naranjas en el caso de utilizar un conjunto de filtro pasa banda dual verde-naranja adecuado (Fig. 4 Ia y IIa). Un locus 17q11.2-q12 afectado por una amplificación de HER2 se caracteriza por otras señales verdes adicionales (Fig. 4 Ib y IIb).

Las intensidades de señal obtenidas y, por consiguiente, la capacidad de evaluación de los resultados dependen de manera decisiva de la presencia de sulfato de dextrano en las soluciones o bien composiciones de hibridación en las que se fundamentan. Con soluciones de hibridación que contienen un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica, p. ej., carbonato de etileno, en una cantidad en el intervalo de 5 % en peso a 13 % en peso, formamida en una cantidad de al menos 10 % en peso y sulfato de dextrano en una cantidad de 15 % en peso se alcanzan en el marco de las hibridaciones in-situ de igual manera, tanto en el caso de tiempos de hibridación cortos como largos de dos a 16 horas, señales de fluorescencia muy intensas en el caso de un fondo muy bajo (Fig. 4 I y II). Soluciones de hibridación que no contienen sulfato de dextrano, conducen a resultados no evaluables, es decir, no se pueden generar señales específicas para los genes (Fig. 4 III).

Ejemplos de realización:

A) Antes de describir formas de realización individuales, en particular especialmente preferidas, de la presente invención, se describen primeramente los procedimientos de hibridación in-situ en los que se fundamentan como tales.

1. Proceso ISH I (FISH flexible con tiempos de hibridación de dos horas o 16 horas):

Los reactivos utilizados para la realización de la FISH rápida "flexible" proceden del kit de implementación de Tejido FISH Flexible de ZytoLight (Z-2182-20, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemania). El kit contiene los reactivos necesarios (solución de pretratamiento térmico cítrico, solución de pepsina, tampón de lavado FISH flexible 5 veces concentrado y solución DAPI/DuraTect™) para la realización de la FISH en cortes de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina.

La realización de la FISH tiene lugar en cortes de 3 a 5 µm de grosor de tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE) de carcinomas de mama, tejido de pulmón, tejido de nódulos linfáticos, tejido renal, tejido de próstata o bien tejido de placenta. Los cortes de tejidos se disponen sobre portaobjetos revestidos y se hornean durante la noche a 58 °C.

Para la separación de la parafina, los preparados se incuban dos veces en cada caso durante cinco minutos a temperatura ambiente (TA) en 100 % de xileno. Después, se lleva a cabo una serie en etanol decreciente durante en cada caso dos minutos a la temperatura ambiente (dos veces, en cada caso etanol desnaturalizado al 96 %, 90 %, 70 %). Después de dos etapas de incubación durante en cada caso dos minutos en agua purísima a la temperatura ambiente se une el pretratamiento con calor a lo largo de un tiempo de 20 minutos a 98 °C en solución de pretratamiento térmico cítrico, seguida de dos etapas de incubación adicionales durante en cada caso dos minutos

en agua purísima a TA. El pretratamiento proteolítico tiene lugar mediante goteo de solución de pepsina (RTU) sobre los preparados, y subsiguiente incubación en una cámara húmeda a 37 °C durante un tiempo de 5 a 30 minutos. A la digestión le siguen dos incubaciones en cada caso durante dos minutos a TA en agua purísima y una serie en etanol creciente (al 70 %, 90 %, 96 %), en cada caso durante un minuto a TA.

- 5 Después del secado al aire de los preparados, se aplican directamente sobre los cortes, mediante pipeta, 10 µl de una solución de hibridación que contiene las sondas de hibridación marcadas por fluorescencia. Después de colocar un portaobjetos adecuado, los preparados se sellan con Fixogum y se almacenan para la co-desnaturalización durante diez minutos a 75 °C en una placa calefactora. Para la hibridación, los preparados se transfieren a una cámara húmeda precalentada y se incuban a 37 °C durante dos horas o a lo largo de la noche (aprox. 16 horas).
- 10 Antes del lavado de rigurosidad, se retira el Fixogum y los preparados se incuban durante aprox. dos minutos a TA en tampón de lavado flexible 1 vez concentrado. Después, se retira el portaobjetos y el lavado propiamente dicho tiene lugar mediante incubación en tampón de lavado flexible 1 vez concentrado a lo largo de un tiempo de diez minutos a 72 °C y una incubación adicional a lo largo de tres minutos a TA. Se une una serie en etanol creciente (al 70 %, 90 %, 96 %), en cada caso durante un minuto a TA, antes de secar al aire los preparados, teniendo lugar el secado bajo la exclusión de la luz. Finalmente, se aplica solución DAPI DuraTect y el preparado se provee de un portaobjetos.
- 15

La evaluación tiene lugar utilizando un microscopio de fluorescencia (AxioScope.A1 con unidad de iluminación HXP 120V, Carl Zeiss Microscopy GmbH) y correspondientes conjuntos de filtro para los intervalos de absorción y emisión en los que se fundamentan en cada caso.

- 20 2. Proceso ISH II (FISH automatizada en el dispositivo automático Wave RPD System de Celerus):

Los reactivos utilizados para la realización de la FISH automatizada (en el dispositivo automático Wave RPD System de Celerus de la razón social Celerus Diagnostics, California, EE.UU.) están contenidos en el recipiente LRM (Celerus Diagnostics, California, EE.UU.). El LRM (siglas inglesas de cargador de reactivo lineal) contiene todos los reactivos necesarios para el pretratamiento térmico, la proteólisis, así como el tampón de lavado para las etapas de lavado necesarias. Para cubrir los preparados y la tinción de los núcleos celulares se utiliza DAPI/DuraTect™ (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemania). La sonda del dispositivo automático se encuentra en el recipiente PAC que se emplea en el recipiente de LRM.

25

La realización de la FISH automatizada tiene lugar en cortes de 3 a 5 µm de grosor de tejidos humanos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE) de carcinomas de mama, pulmón, nódulos linfáticos, riñón, próstata o placenta, los cuales se disponen sobre portaobjetos revestidos y se hornean durante la noche a 58 °C. Para la separación de la parafina, los preparados se tratan según el programa predeterminado de Wave® RPD System de Celerus. A continuación, le sigue el pretratamiento térmico durante 15 minutos a 95 °C, seguido de dos etapas de incubación en tampón de lavado durante seis minutos a 40 °C. Después de un secado durante 10 minutos a 45 °C se une el pretratamiento proteolítico. Éste tiene lugar con pepsina mediante incubación de los preparados a lo largo de un tiempo en el intervalo de 5 a 40 minutos a 60 °C. A la digestión le siguen dos incubaciones en agua purísima de en cada caso cuatro minutos a 37 °C y posteriormente una etapa de secado de siete minutos a 50 °C.

30

35

Después del secado tiene lugar la aplicación de la sonda de hibridación específica para el locus, marcada por fluorescencia, que se encuentra en la solución de hibridación. Para ello se aplican sobre los preparados 130 µl de la solución de hibridación por cada uno de los portaobjetos. La co-desnaturalización tienen lugar a lo largo de un tiempo de diez minutos a 80 °C y la subsiguiente hibridación tiene lugar durante 120 minutos a 42 °C. La hibridación va acompañada de movimientos permanentes de los portaobjetos y, por consiguiente, de movimientos ondulares de la solución de hibridación. Después de la hibridación tiene lugar el lavado con tampón de lavado durante cuatro minutos a 37 °C.

40

El lavado de rigurosidad tiene lugar a lo largo de un tiempo de 15 minutos a 45 °C. Un lavado subsiguiente tiene lugar de nuevo durante cuatro minutos a 37 °C. Finalmente, tiene lugar un secado durante cinco minutos a 45 °C en el dispositivo automático. Tras la realización automática de estas etapas tiene lugar la retirada del dispositivo automático de los preparados. Se une una serie en etanol creciente (al 70 %, 90 %, 96 %), en cada caso durante un minuto a TA, antes de secar al aire los preparados bajo la exclusión de la luz. Finalmente, se realiza una tinción de los núcleos celulares con ayuda del colorante 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) mediante la aplicación de solución DAPI DuraTect (ZytoVision GmbH, Bremerhaven) y el preparado se provee de un portaobjetos.

45

50

La evaluación tiene lugar utilizando un microscopio de fluorescencia (AxioScope.A1 con unidad de iluminación HXP 120V, Carl Zeiss Microscopy GmbH) y correspondientes conjuntos de filtro para los intervalos de absorción y emisión en los que se fundamentan en cada caso.

3. Proceso ISH III (FISH automatizada en el dispositivo automático Pathcom Stainer):

55 Los reactivos utilizados para la realización de la FISH automatizada (en el dispositivo automático Pathcom Stainer de la razón social PathCom Systems Corporation, California, EE.UU.) proceden del kit de detección de ISH (PathCom Systems Corporation, Sierra Ct, Dublin, EE.UU.). El kit contiene todos los reactivos necesarios

(soluciones de desparafinado, soluciones de recuperación, pepsina, diH₂O) para la realización de la FISH automatizada. Además, se requiere el tampón de lavado de PathCom Systems para la IHC y la ISH. Para cubrir los preparados y la tinción de los núcleos celulares se utiliza solución DAPI/DuraTect™ (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemania).

- 5 La realización de la FISH automatizada tiene lugar en cortes de 3 a 5 µm de grosor de tejidos humanos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE), p. ej., de carcinomas de mama, pulmón, nódulos linfáticos, riñón, próstata y/o placenta, los cuales se disponen sobre portaobjetos revestidos y se hornean durante la noche a 58 °C.

10 Para la separación de la parafina, los preparados se tratan primeramente a lo largo de un tiempo de seis minutos a 65 °C con una primera solución de desparafinado. Después tiene lugar el tratamiento con cuatro soluciones de desparafinado en cada caso durante seis minutos a 62 °C y, a continuación, con una solución de desparafinado final a 50 °C. Le sigue el pretratamiento térmico con la solución de recuperación, primero durante 15 minutos a 98 °C y, a continuación, durante ocho minutos a 65 °C, de modo que todo el pretratamiento térmico dura aproximadamente 23 minutos. Después de dos etapas de incubación con un tampón de lavado ("Wash Buffer") en cada caso durante seis minutos a 40 °C, tiene lugar un secado durante diez minutos a 45 °C. Al secado se le une un pretratamiento proteolítico. Éste tiene lugar mediante incubación de los preparados en pepsina a lo largo de un tiempo en el intervalo de 5 a 40 minutos a 37 °C. A la digestión le siguen tres incubaciones en agua purísima de en cada caso tres minutos a 37 °C y posteriormente una etapa de secado de diez minutos a 50 °C.

20 Después del secado tiene lugar la aplicación sobre los preparados de 110 µl de solución de hibridación que contiene las sondas de hibridación específica para el locus, marcadas por fluorescencia. La co-desnaturalización de la muestra y la solución de hibridación tienen lugar a lo largo de un tiempo de 20 minutos a 75 °C. La hibridación o bien renaturalización que sigue a la desnaturalización tiene lugar a lo largo de un tiempo de 120 minutos a 45 °C bajo movimiento continuo de la solución de hibridación mediante movimiento inducido de la cámara de reacción en el dispositivo automático.

25 Después de la hibridación tienen lugar el lavado con tampón de lavado ("Wash Buffer") durante cuatro minutos a 37 °C. El lavado de rigurosidad se lleva a cabo a lo largo de un tiempo de 15 minutos a 45 °C. Un lavado subsiguiente tiene lugar de nuevo durante cuatro minutos a 37 °C. Finalmente, tiene lugar un secado durante cinco minutos a 45 °C en el dispositivo automático. Tras la realización automática de estas etapas tiene lugar la retirada del dispositivo automático de los preparados. Le sigue una serie en etanol creciente (al 70 %, 90 %, 96 %), en cada caso durante un minuto a TA, antes de secar al aire los preparados bajo la exclusión de la luz. Finalmente, se realiza una tinción de los núcleos celulares con ayuda del colorante 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) mediante la aplicación de "solución DAPI DuraTect™" (ZytoVision GmbH, Bremerhaven) y el preparado se provee de un portaobjetos.

30 La evaluación tiene lugar utilizando un microscopio de fluorescencia (AxioScope.A1 con unidad de iluminación HXP 120V, Carl Zeiss Microscopy GmbH) y correspondientes conjuntos de filtro para los intervalos de absorción y emisión en los que se fundamentan en cada caso.

- 35 B) En lo que sigue se describen formas de realización de acuerdo con la invención, en particular especialmente preferidas de la presente invención, así como hibridaciones in situ comparativas:

1. FISH para la detección de señales HER2 específicas para genes en un procedimiento FISH rápida "flexible"

40 Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus "Flexible HER2/CEN17 Probe" se generan o bien detectan señales HER2 específicas para genes con ayuda de un procedimiento de FISH rápida "flexible" que puede llevarse a cabo tanto con tiempos de hibridación cortos de dos horas como con una hibridación a lo largo de la noche de 16 horas. La hibridación como tal se lleva a cabo de acuerdo con el proceso ISH I (FISH flexible con tiempos de hibridación de dos horas o 16 horas) arriba descrito.

45 La sonda de hibridación 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 HER2, y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están dirigidos contra la región del centrómero satélite alfa del cromosoma 17 (D17Z1).

Solución de hibridación I: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12 % en peso de carbonato de etileno, 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de sonda de hibridación específica para el locus, en cada caso referido a la composición.

50 Solución de hibridación II: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno, 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de sonda de hibridación específica para el locus, en cada caso referido a la composición.

55 Ambas soluciones de hibridación I y II conducen de igual manera a extraordinarios resultados, es decir, a señales muy intensas. Se manifiestan señales HER2 específicas para el gen muy intensas junto a igualmente señales específicas para CEN17 muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de las células y tejidos, tanto en el caso de los tiempos de hibridación cortos de dos horas como en el caso de tiempos de

hibridación largos de 16 horas. Esto puede observarse tanto en el caso de células/tejidos o bien células/tejidos sin aberraciones en el cromosoma 17, como en el caso de células/tejidos, en particular de carcinoma de mama, con amplificaciones de HER2. Por consiguiente, las amplificaciones de HER2 se identifican con la sonda de hibridación, que son identificadas en el modelo de señales con ayuda de la aparición de varias señales específicas para HER2 o racimos de señales para HER2 (véase la Fig. 4), son detectadas de manera inequívoca.

5

2. Influencia de la concentración de formamida sobre el procedimiento FISH rápida flexible

Bajo el empleo de la sonda de hibridación "Flexible HER2/CEN17 Probe" específica para el locus para el proceso ISH I arriba descrito, se examina la influencia de la concentración de formamida en las soluciones de hibridación sobre la intensidad de las señales.

10 La sonda de hibridación 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 HER2, y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están dirigidos contra la región del centrómero satélite alfa del cromosoma 17 (D17Z1).

15 Solución de hibridación I: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno, 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de sonda de hibridación específica para el locus, en cada caso referido a la composición.

Las soluciones de hibridación II a V presentan, en comparación con la solución de hibridación I, diferentes concentraciones de formamida de 14 % en vol. de (II), 11 % en vol. de (III), 7 % en peso de (IV) y 0 % en vol. de (V).

20 Las soluciones de hibridación I a V se emplean en cada caso en el marco del proceso ISH I arriba descrito, tanto con tiempos de hibridación cortos de dos horas como con tiempos de hibridación largos de 16 horas, pasando a emplearse la sonda de hibridación "Flexible HER2/CEN17 Probe". Los modelos de señales obtenidos al respecto se comparan entre sí, en particular con relación con la intensidad de las señales en cada caso alcanzada.

25 Con la solución de hibridación I (27 % en vol. de formamida) se obtienen señales HER2 específicas para genes muy intensas, junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de células y tejido, tanto en el caso de los tiempos de hibridación cortos como largos.

30 Concentraciones de formamida bajas en las soluciones de hibridación conducen, después de los tiempos de hibridación de dos horas, a señales específicas para HER2 más débiles o a ninguna señal. Con 14 % en vol. de formamida (solución II) se generan señales intensas, que siguen siendo todavía muy bien evaluables. Con 11 % en vol. de formamida (solución III) se generan, por el contrario, ya solo señales de intensidad media en los modelos de señales. Las soluciones de hibridación con 7 % en vol. de formamida (soluciones IV) conducen únicamente a señales débiles, las cuales ya no permiten evaluación alguna. Con señales de hibridación sin formamida (solución V) no se obtienen señales.

35 También en el caso de largos tiempos de hibridación de 16 horas, concentraciones decrecientes de formamida en las soluciones de hibridación conducen a intensidades de señales decrecientes en relación con las señales específicas para HER2. Con 14 % en vol. de formamida (solución II) se generan señales muy intensas, que siguen siendo todavía muy bien evaluables. Con 11 % en vol. de formamida (solución III) se generan asimismo todavía señales intensas bien evaluables en los modelos de señales. Las soluciones de hibridación con 7 % en vol. de formamida (soluciones IV) conducen únicamente a señales débiles, las cuales ya no permiten evaluación alguna. Con soluciones de hibridación sin formamida (solución V) no se obtienen señales.

40 3. Influencia de la concentración de carbonato de etileno sobre el procedimiento FISH rápida flexible

Bajo el empleo de la sonda de hibridación "Flexible HER2/CEN17 Probe" específica para el locus para el proceso ISH I arriba descrito, se examina la influencia de la concentración de carbonato de etileno en las soluciones de hibridación sobre la intensidad de las señales.

45 La sonda de hibridación 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 HER2, y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están dirigidos contra la región del centrómero satélite alfa del cromosoma 17 (D17Z1).

50 Solución de hibridación I: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno, 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de ADN de sonda, en cada caso referido a la composición.

Las soluciones de hibridación II a V presentan, en comparación con la solución de hibridación I, diferentes concentraciones de carbonato de etileno de 7 % en peso de (II), 5 % en peso de (III) y 0 % en peso de (IV).

Las soluciones de hibridación I a V se emplean en cada caso en el marco del proceso ISH I arriba descrito, tanto con tiempos de hibridación cortos de dos horas como con tiempos de hibridación largos de 16 horas, pasando a

emplearse la sonda de hibridación "Flexible HER2/CEN17 Probe". Los modelos de señales obtenidos al respecto se comparan entre sí, en particular con relación con la intensidad de las señales en cada caso alcanzada.

5 Con la solución de hibridación I (10,5 % en vol. de carbonato de etileno) se obtienen señales HER2 específicas para genes muy intensas, junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de células y tejido, tanto en el caso de los tiempos de hibridación cortos como largos.

10 Concentraciones de carbonato de etileno bajas en las soluciones de hibridación conducen, después de los tiempos de hibridación de dos horas, a señales específicas para HER2 más débiles o a ninguna señal. Con 7 % en vol. de carbonato de etileno (solución II) se generan señales intensas, que siguen siendo todavía muy bien evaluables. Con 5 % en vol. de carbonato de etileno (solución III) se generan, por el contrario, ya solo señales de intensidad media en los modelos de señales. Con soluciones de hibridación sin carbonato de etileno (solución IV) se obtienen ya solo señales muy débiles y señales ya no evaluables.

15 También en el caso de largos tiempos de hibridación de 16 horas, concentraciones decrecientes de carbonato de etileno en las soluciones de hibridación conducen a intensidades de señales decrecientes en relación con las señales específicas para HER2. Con 7 % en vol. de carbonato de etileno (solución II) se generan señales muy intensas. Con 5 % en vol. de carbonato de etileno (solución III) se generan asimismo señales muy intensas en los modelos de señales. Con soluciones de hibridación sin carbonato de etileno (solución IV) se obtienen ya solo señales de intensidad media.

4. Influencia de sulfato de dextrano sobre procedimiento FISH rápida flexibles

20 Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus "Flexible HER2/CEN17 Probe" para el proceso ISH I arriba descrito, se examina la influencia de sulfato de dextrano en las soluciones de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales. En relación con la realización de la hibridación, así como la especificidad de las sondas, se remite a las explicaciones anteriores.

25 Solución de hibridación I: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno, 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de ADN de sonda, en cada caso referido a la composición.

Solución de hibridación II: NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno, 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de ADN de sonda, en cada caso referido a la composición.

30 Los modelos de señales obtenidos con las soluciones de hibridación I o bien II se comparan entre sí, en particular en relación con la intensidad de las señales alcanzadas en cada caso.

35 En los modelos de señales obtenidos con la solución de hibridación I se muestran señales HER2 específicas para genes muy intensas junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de las células y tejido tanto con tiempos de hibridación cortos como largos. La solución de hibridación II sin sulfato de dextrano no conduce, en el caso de tiempos de hibridación cortos, a señales visibles o bien detectables. En el caso de tiempos de hibridación largos se obtienen con la solución de hibridación II únicamente señales muy débiles o bien ninguna señal visible o bien detectable.

5. Influencia de diferentes disolventes polares próticos o bien polares apróticos con estructura molecular cíclica sobre procedimientos FISH rápida flexibles

40 Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus "Flexible HER2/CEN17 Probe" para el proceso ISH I arriba descrito, se investiga la influencia de diferentes disolventes polares próticos o bien polares apróticos con estructura molecular cíclica en las soluciones de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales. En relación con la realización de la hibridación, así como la especificidad de las sondas se remite a las exposiciones anteriores.

45 Solución de hibridación I: 15 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 500 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 10,5 % en peso de carbonato de etileno (I), 2 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 5 ng/µl de ADN de sonda, en cada caso referido a la composición.

Solución de hibridación II: en lugar de carbonato de etileno, 10,5 % en peso de 2-piperidona (valerolactama)

Solución de hibridación III: en lugar de carbonato de etileno, 10,5 % en vol. de 2-pirrolidona (γ-butirolactama)

Solución de hibridación IV: en lugar de carbonato de etileno, 10,5 % en peso de 3-sulfoleno (butadieno-sulfona)

50 Solución de hibridación V: en lugar de carbonato de etileno, 10,5 % en peso de γ-butirolactona

Los modelos de señales obtenidos con las soluciones de hibridación I a V se comparan entre sí, en particular en relación con la intensidad de señales alcanzada en cada caso.

Con todas las soluciones de hibridación I a V, es decir, con todos los disolventes polares próticos o bien polares apróticos sometidos a ensayo con estructura molecular cíclica se obtienen señales HER2 específicas para genes muy intensas junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de células y tejido, tanto con tiempos de hibridación cortos como largos. Los mejores resultados se alcanzan con 2-pirrolidona (γ -butirolactama), γ -butirolactona y carbonato de etileno, obteniéndose sin embargo también muy buenos resultados con 2-piperidona (valerolactama) y 3-sulfoleno (“butadieno sulfona”).

Estos resultados se observan tanto en el caso de células/tejidos normales o bien células/tejidos sin aberraciones en el cromosoma 17, como en el caso de células/tejidos, en particular de carcinomas de mama, con amplificaciones de HER2. Por consiguiente, también con todos los disolventes polares próticos o bien polares apróticos con estructura molecular cíclica, utilizados en cada caso individualmente, se identifican de manera inequívoca las amplificaciones de HER2 a identificar.

6. FISH para la detección de señales ALK específicas para genes en procedimientos FISH automatizados

Para la detección de señales específicas para ALK en procedimientos FISH automatizados se emplean soluciones de hibridación a base de formamida y carbonato de etileno que contienen como sonda de hibridación específica para el locus “Auto ALK Break Apart Probe”. La FISH como tal se lleva a cabo de acuerdo con el proceso ISH II arriba descrito (FISH automatizado en el dispositivo automático Wave RPD System de Celerus).

La sonda de hibridación específica para el locus se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm), que están dirigidos en 2p23 contra secuencias situadas de forma proximal a la región del punto de ruptura de ALK, y de nucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que están dirigidos en 2p23 frente a secuencias situadas en posición distal con respecto a la región del punto de ruptura de ALK.

Solución de hibridación: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 22 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,75 % en peso de carbonato de etileno, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN de bloqueo y estabilización y 2 ng/ μl de sonda de hibridación específica para el locus, en cada caso referido a la composición.

En el modelo de señales obtenido se manifiestan señales específicas para ALK muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de las células y del tejido. Esto puede observarse tanto en el caso de células/tejidos normales o bien células/tejidos sin aberraciones en el cromosoma 2 como en el caso de células/tejidos con aberraciones en ALK. Por consiguiente, las aberraciones en ALK a identificar con la sonda de hibridación (es decir, eventos de separación de señales de fusión verde-naranja) son identificadas de manera inequívoca.

7. Influencia de la concentración de formamida sobre procedimientos FISH automatizados

Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus “Auto HER2/CEN17 Probe” para el proceso ISH III arriba descrito se investiga la influencia de la concentración de formamida en las soluciones de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales.

La sonda de hibridación específica para el locus se compone de polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm), que están dirigidos contra la región 17q11.2-q12 del gen HER2, y polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm) que están dirigidos contra la región del centrómero satélite alfa del cromosoma 17 (D17Z1).

Solución de hibridación I: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 27 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,75 % en peso de carbonato de etileno, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN de bloqueo y estabilización y 2 ng/ μl de sonda de hibridación, en cada caso referido a la composición.

Las soluciones de hibridación II a V presentan, en comparación con la solución de hibridación I, diferentes concentraciones de formamida de 17 % en vol. de (II), 13 % en vol. de (III), 9 % en vol. de (IV) y 0 % en vol. de (V).

Con la solución de hibridación I se detectan señales HER2 específicas para genes muy intensas (junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas) en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de las células y tejido. También con la solución de hibridación II (17 % en vol. de formamida) se obtienen señales muy intensas. La solución de hibridación III con 13 % en vol. de formamida conduce todavía a señales intensas, mientras que, por el contrario, con 9 % en vol. (solución de hibridación IV) se obtienen ya solo señales de intensidad media. Si las soluciones de hibridación (solución de hibridación V) no contienen formamida, no se obtienen señales.

8. Influencia de la concentración de carbonato de etileno sobre procedimientos FISH automatizados

Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus “Flexible HER2/CEN17 Probe” para el proceso ISH III arriba descrito, se investiga la influencia de la concentración de carbonato de etileno en las soluciones de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales. En relación con la realización de la hibridación y de la

especificidad de las sondas se remite a las exposiciones anteriores en relación con la sonda de hibridación "Auto HER2/CEN17 Probe".

5 Solución de hibridación I: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 21 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,75 % en peso de carbonato de etileno, 0,1 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 2 ng/µl de sonda de hibridación, en cada caso referido a la composición.

Las soluciones de hibridación II a V presentan, en comparación con la solución de hibridación I, diferentes concentraciones de carbonato de etileno de 9 % en vol. de (II), 6 % en vol. de (III) y 0 % en vol. de (IV).

10 Con la solución de hibridación I se detectan señales HER2 específicas para genes muy intensas (junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas) en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de las células y tejido. Con la solución de hibridación II (9 % en vol. de carbonato de etileno) ya solo se obtienen señales de intensidad media. Las soluciones de hibridación III y IV con 6 % en vol. de carbonato de etileno o bien sin carbonato de etileno conducen ya solo a señales débiles y ya no evaluables.

9. Influencia de sulfato de dextrano sobre procedimientos FISH automatizados

15 Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus "Auto ROS1 Break Apart Probe" para el proceso ISH II (FISH automatizada en el dispositivo automático Wave RPD System de Celerus) arriba descrito, se investiga la influencia de sulfato de dextrano en las soluciones de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales. En relación con la realización de la hibridación se remite a las explicaciones anteriores en relación con el proceso II.

20 La sonda de hibridación se compone de polinucleótidos marcados en verde (absorción a 503 nm y emisión a 528 nm), que en 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas de manera proximal a la región del punto de ruptura de ROS1, y polinucleótidos marcados en naranja (absorción a 547 nm y emisión a 572 nm) que en 6q22 están dirigidos contra secuencias situadas distalmente con respecto a la región del punto de ruptura de ROS1.

Solución de hibridación I: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 22 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,75 % en peso de carbonato de etileno, 0,1 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 2 ng/µl de sonda de hibridación específicas para el locus, en cada caso referido a la composición.

25 La solución de hibridación II no contiene, en comparación con la solución de hibridación I, sulfato de dextrano.

Con la solución de hibridación I se alcanzan señales ROS1 específicas para genes muy intensas en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de células y tejido. Con la solución de hibridación II, que contiene la sonda de hibridación en una composición sin sulfato de dextrano, no se alcanzan señales visibles o bien detectables.

30 10. Influencia de diferentes disolventes polares próticos o bien polares apróticos con estructura molecular cíclica elegidos sobre procedimientos FISH automatizados

35 Bajo el empleo de la sonda de hibridación "Auto HER2/CEN17 Probe" específica para el locus para el proceso ISH III arriba descrito (FISH automatizada sobre el dispositivo automático Pathcom Stainer) se investiga la influencia de diferentes disolventes polares próticos o bien polares apróticos con estructura cíclica en las soluciones de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales. Se lleva a cabo el proceso ISH III (véanse las explicaciones anteriores con respecto al proceso ISH III) bajo el empleo del dispositivo automático Pathcom Stainer. En relación con la especificidad y el marcaje de la sonda de hibridación "Auto HER2/CEN17 Probe" se remite, para evitar repeticiones innecesarias, a las explicaciones anteriores.

40 Soluciones de hibridación I a V: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 22 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,75 % en peso o bien % en vol. (en función de la sustancia empleada) de un disolvente polar prótico o bien polar aprótico con estructura cíclica, 0,1 µg/ µl de ADN de bloqueo y de estabilización y 2 ng/µl de sonda de hibridación, en cada caso referido a la composición, empleándose como disolvente polar prótico o bien polar aprótico con estructura cíclica carbonato de etileno (I, % en peso), 2-piperidona (valerolactama) (II, % en peso), 2-pirrolidona (γ-butirolactama) (III, % en vol.), 3-sulfoleno ("butadieno sulfona") (IV, % en peso) y γ-butirolactona (V, % en vol.).

45 Con todos los disolventes polares próticos o bien polares apróticos con estructura cíclica investigados se obtienen señales HER2 específicas para genes de intensas a muy intensas (junto a señales específicas para CEN17 asimismo de intensas a muy intensas) en el caso de un fondo muy bajo y una estructura bien conservada de las células y tejido en el marco de las hibridaciones in situ. Solo se manifiestan ligeras diferencias en relación con la intensidad de las señales en la gradación siguiente de muy intensa a en cada caso ligeramente más débil: γ-butirolactona, 2-pirrolidona (γ-butirolactama), carbonato de etileno, 2-piperidona (valerolactama) y 3-sulfoleno ("butadieno sulfona"). Estos resultados pueden observarse tanto en el caso de células/tejidos normales o bien células/tejidos sin aberraciones en el cromosoma 17 como en el caso de células/tejidos, en particular carcinomas de mama, con amplificaciones HER2. Por consiguiente, también con todos los disolventes polares próticos o bien
50 polares apróticos con estructura cíclica utilizados en cada caso individualmente pueden identificarse
55

inequívocamente las amplificaciones HER2 a detectar (es decir, varias señales específicas para HER2 o racimos de señales HER2).

11. Influencia del movimiento sobre la hibridación en procedimientos FISH automatizados

5 Bajo el empleo de la sonda de hibridación específica para el locus "Auto HER2/CEN17 Probe" para el proceso ISH III arriba descrito se investiga la influencia, en particular de movimientos de forma ondulada durante la etapa de hibridación, de hibridaciones in situ automatizadas sobre los modelos de señales resultantes. Para ello, se lleva a cabo el proceso ISH III arriba descrito en el dispositivo automático "Pathcom Stainer" utilizando la sonda de hibridación "Auto HER2/CEN17 Probe".

10 En relación con la especificidad de las sondas se remite a las explicaciones anteriores en relación con la sonda de hibridación "Auto HER2/CEN17 Probe".

Las soluciones de hibridación contienen 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 21 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 12,75 % en peso de carbonato de etileno, 0,1 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 2 ng/µl de sonda de hibridación específica para el locus.

15 Para fines comparativos, el proceso ISH III se lleva a cabo bajo movimiento, en particular movimiento de forma ondulante, de muestras y composición o bien solución de hibridación y sin movimiento de muestras y composición o bien solución de hibridación durante la hibridación. La hibridación tiene lugar en cada caso durante 120 minutos a 45 °C.

20 El movimiento de las muestras o bien soluciones de hibridación tiene lugar de forma continua mediante el movimiento de la cámara de reacción del dispositivo automático. El movimiento de la cámara de reacción es inducido a intervalos de 15 segundos, dos minutos o bien 10 minutos con un tiempo de apertura de la cubierta de la cámara de hibridación de en cada caso un segundo. Para fines comparativos, la hibridación de las muestras se lleva a cabo sin movimientos o bien sin apertura de la cámara de hibridación.

25 Con todas las tandas que se llevan a cabo bajo movimiento o bien bajo apertura de la cámara de hibridación se obtienen señales HER2 específicas para genes muy intensas (junto a señales específicas para CEN17 asimismo muy intensas) en el caso de un fondo muy bajo y una morfología bien conservada de células y tejidos. Los extraordinarios resultados se obtienen igualmente para intervalos de movimiento de 15 segundos, dos minutos y 10 minutos. Sin el movimiento de soluciones de hibridación o bien de muestras se obtienen asimismo señales o bien modelos de señales bien evaluables, no obstante, las señales resultan más débiles que en el caso de las hibridaciones que se llevan a cabo bajo el movimiento de soluciones de hibridación o bien muestras.

12. Influencia de detergentes sobre la hibridación en procedimientos FISH automatizados

30 Bajo el empleo de la sonda de hibridación "Auto ROS1 Break Apart Probe" específica para el locus para el proceso ISH III arriba descrito (FISH automatizada en el dispositivo automático Pathcom Stainer) se investiga la influencia del polialquilenglicoléter Brij[®]-35 (denominado de manera sinónima también Brij[®]-L23 o polioxietilen(23)lauriléter) en las sondas de hibridación en cuanto a la intensidad de las señales. En relación con la realización de la hibridación conforme al proceso ISH III, así como a la especificidad de la sonda de hibridación "Auto ROS1 Break Apart Probe" se remite a las explicaciones anteriores.

Solución de hibridación I: 18 % en peso de sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 22 % en vol. de formamida, tampón SSC 1 vez concentrado, 9,95 % en peso de carbonato de etileno, 0,1 µg/µl de ADN de bloqueo y estabilización y 2 ng/µl de sondas de hibridación específicas para el locus, en cada caso referido a la composición.

40 Las soluciones de hibridación II a VI muestran, en comparación con la solución de hibridación I otras concentraciones de Brij[®]-35 de 0,125 % en peso de (II), 0,2 % en peso de (III), 0,4 % en peso de (IV), 0,9 % en peso de (V) y 1,8 % en peso de (VI), en cada caso referido a la composición.

45 Con la solución de hibridación I (sin Brij[®]-35) se alcanzan señales ROS1 específicas para genes intensas en el caso de un fondo bajo y una estructura bien conservada de células y tejido. Con las soluciones de hibridación II a V (concentraciones de Brij[®]-35 de 0,125 % en peso a 0,9 % en peso se obtienen señales muy intensas. Estas señales, más intensas en comparación con la solución de hibridación I (sin Brij[®]-35), podrían atribuirse – sin desear limitarse en este caso a esta teoría – a una tinción del núcleo más débil acompañada con el empleo del detergente y, por consiguiente, un mejor contraste (señal con el fondo).

Si las soluciones de hibridación contienen el detergente Brij[®]-35 en una concentración 1,8 % en peso (solución de hibridación VI), referido a la composición, se obtienen ya solo señales de intensidad media.

50

REIVINDICACIONES

1. Composición para uso en la hibridación, en donde la composición comprende:
 - (a) al menos una sonda de hibridación (“componente (a)”);
 - (b) al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico (“componente (b)”) con estructura molecular cíclica en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol. o % en peso; y
 - (c) al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales (“componente (c)”), en una cantidad de más de 15 % en vol., referido a la composición.
2. Composición según la reivindicación 1, en donde la amida de ácido carboxílico es formamida.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, en donde el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico se elige del grupo de disolventes con función lactona, sulfona, nitrilo, carbonato y/o amida.
4. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene a el al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con estructura molecular cíclica en una cantidad que no conduce a la desnaturalización de ácidos nucleicos.
5. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene a la al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales en una cantidad en el intervalo de 15 a 50 % en vol., referido a la composición.
6. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene al menos un polisacárido (“componente (d)”).
7. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene al menos un sistema tampón químico (“componente (e)”).
8. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene al menos una sal inorgánica (“componente (g)”).
9. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene al menos un detergente y/o tensioactivo (“componente (h)”).
10. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene:
 - (a) al menos una sonda de hibridación (“componente (a)”);
 - (b) al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico (“componente (b)”) con estructura molecular cíclica, en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol., referido a la composición;
 - (c) al menos una amida de ácido carboxílico y/o sus sales (“componente (c)”), en una cantidad en el intervalo de 15 a 50 % en vol., referido a la composición;
 - (d) al menos un polisacárido (“componente (d)”);
 - (e) al menos un sistema tampón químico (“componente (e)”);
 - (f) eventualmente, al menos un agente de bloqueo y/o de estabilización (“componente (f)”);
 - (g) al menos una sal inorgánica (“componente (g)”);
 - (h) al menos un detergente y/o tensioactivo (“componente (h)”).
11. Uso de una composición según una de las reivindicaciones precedentes en la hibridación para la determinación de ácidos nucleicos en una muestra biológica.
12. Procedimiento para la detección de ácidos nucleicos y/o de aberraciones cromosómicas en una muestra biológica utilizando una composición según una de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Procedimiento para la detección de ácidos nucleicos y/o de aberraciones cromosómicas en una muestra biológica, en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas de procedimiento:
 - (a) proporcionar una muestra biológica para la hibridación in-situ;
 - (b) proporcionar una composición para uso en la hibridación, en donde la composición contiene al menos una sonda de hibridación (“componente (a)”), al menos un disolvente polar prótico o polar aprótico con una estructura molecular cíclica en una cantidad en el intervalo de 5 a 40 % en vol. o % en peso (“componente (b)”) y al menos

una amida de ácido carboxílico y/o sus sales, en una cantidad de más de 15 % en vol., referida a la composición ("componente (c)");

(c) poner en contacto de la muestra biológica de la etapa (a) del procedimiento con la composición de la etapa (b) del procedimiento;

5 (d) desnaturalizar la muestra biológica de la etapa (a) del procedimiento y de la composición de la etapa (b) del procedimiento, en donde la muestra biológica y la composición son desnaturalizadas por separado entre sí, en particular antes de llevar a cabo la etapa (c) del procedimiento, o conjuntamente, en particular después de llevar a cabo la etapa (c) del procedimiento;

10 (e) hibridar subsiguiente de la al menos una sonda de hibridación específica contenida en la composición y los ácidos nucleicos contenidos en las muestras biológicas;

(f) detectar subsiguiente de las sondas de hibridación hibridadas y/o de los ácidos nucleicos a detectar en la muestra biológica.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un dispositivo automático y/o de forma automática.

15 15. Kit para la detección de ácidos nucleicos y/o de aberraciones cromosómicas en una muestra biológica, en donde el kit contiene una composición según una de las reivindicaciones 1 a 10.

Fig. 1

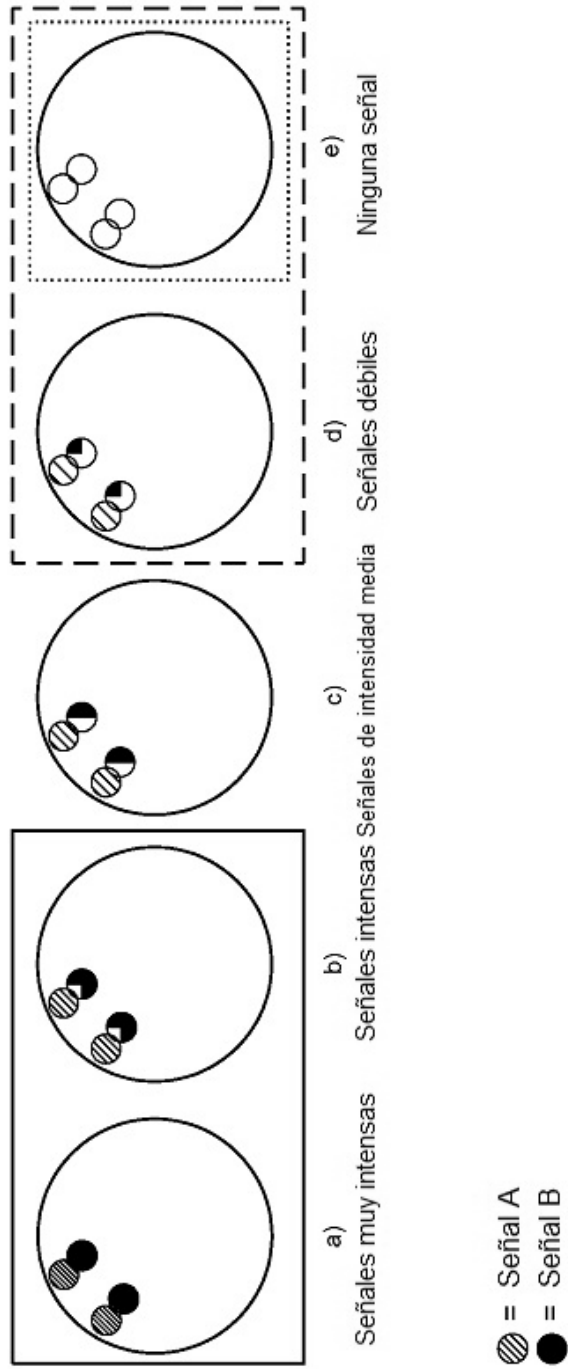


Fig. 2

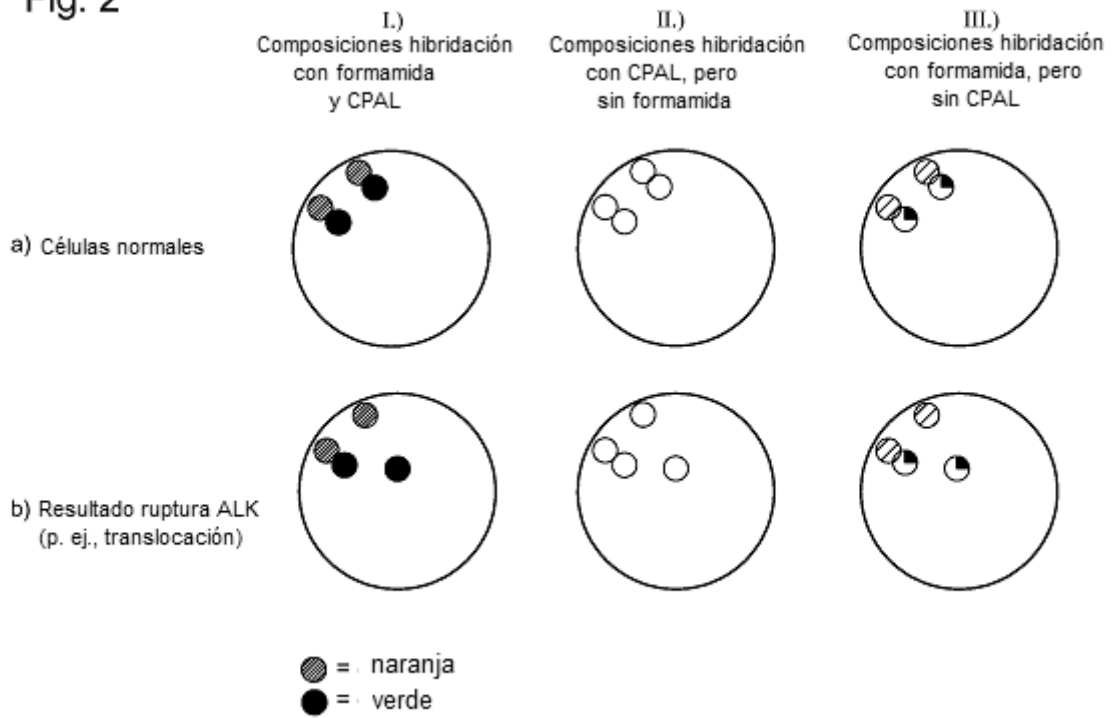


Fig. 3

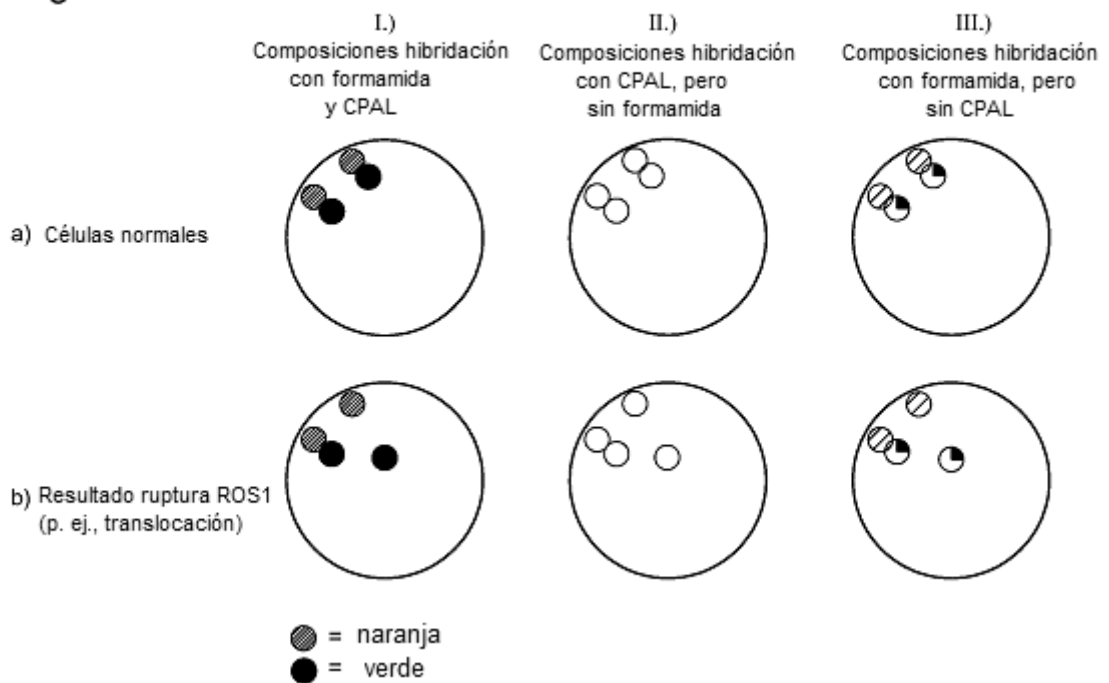


Fig. 4

