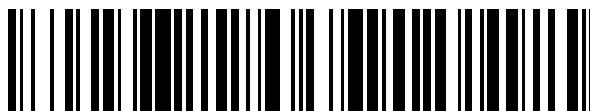


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 701**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2016 PCT/IB2016/050548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16125091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2016 E 16712475 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3253887**

54 Título: **Aditivo para acelerar la hibridación**

30 Prioridad:

**04.02.2015 IT RM20150048**

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

**30.11.2020**

73 Titular/es:

**ALMA MATER STUDIORUM -UNIVERSITA' DI BOLOGNA (100.0%)**

**Via Zamboni, 33  
40126 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**DI OTO, ENRICO;  
MONTI, VALENTINA y  
ASIOLI, SOFIA**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 796 701 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**

Aditivo para acelerar la hibridación

5 Esta invención se refiere a compuestos y procedimientos para la hibridación de sondas moleculares en el sector de la biotecnología y de diagnóstico que comprende el uso de soluciones acuosas, como un aditivo adyuvante de aceleración en la reacción de desnaturalización y la reacción de hibridación de una o más sondas moleculares (por ejemplo, Sondas de ADN, ARN y ANP), incluso simultáneamente, con ácidos nucleicos específicos (ADN y/o ARN) en muestras histológicas y/o citológicas.

Esta invención se refiere al campo del análisis molecular de las alteraciones por ADN y/o ARN por medio de técnicas de hibridación in situ (ISH), tanto en el campo de la investigación y el diagnóstico.

10 Esta invención también se refiere a un procedimiento de hibridación entre los ácidos nucleicos de la muestra en cuestión y las sondas moleculares.

**Antecedentes de la invención**

15 Dentro del campo de las técnicas de análisis molecular que actualmente se utilizan en oncología, se aplica ampliamente hibridación in situ (ISH) de fluorescencia (FISH) y No fluorescencia (SISH, CISH) para definir la estructura de los marcadores de diagnóstico/pronóstico/predicción.

20 Entre los diversos procedimientos, FISH representa el "estándar de oro" para la sensibilidad y especificidad, pero por lo general requiere un tiempo de trabajo promedio de alrededor de 2-3 días. Esto es una carga para la gestión de un laboratorio de análisis, pero también un inconveniente para un paciente que espera el resultado del análisis. Además, el tiempo de respuesta puede ser crítico para comenzar el tratamiento apropiado, particularmente en el caso de un tratamiento personalizado. Para una descripción de la técnica de hibridación in situ, consulte el documento WO2009020932 y las referencias mencionadas en el mismo. Ver también Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D'Emidio S, Catalano V, Sisti V, Ligorio C, Andreoni F, Rulli E, Di Oto E, Fiorentini G, Zingaretti C, De Nicolis M, Cappuzzo F, Magnani M, "Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer". J. Clin. Oncol vol 29, no. 36, págs. 4789 - 95, 2011.

25 Con el tiempo, se han propuesto otros procedimientos y kits comerciales como alternativa al procedimiento estándar. Sin embargo, todavía existen límites impuestos por el alto coste de los reactivos o por el número limitado de sondas moleculares compatibles con el sistema, así como por el tipo de señal emitida por la sonda molecular, necesaria para verla, no siempre compatible con los sistemas de microscopios existentes en los laboratorios.

30 Los tampones utilizados más comúnmente en hibridación in situ son, por ejemplo, compuestos de disolventes, agentes de aceleración, agentes de bloqueo, sales, agentes quelantes y tampones. El disolvente más utilizado es la formamida en concentración variable de entre 5 % y 50 %, el agente acelerador es, por ejemplo, el sulfato de dextrano sódico en concentración variable de entre 5 % y 30 % y las sales están representadas, por ejemplo, por cloruro de sodio, citrato de sodio y citrato de sodio tribásico anhidro.

35 En los tampones convencionales, agentes de bloqueo tales como esperma de salmón y agentes de quelación tales como EDTA también pueden estar presentes.

Propuestas alternativas para el procedimiento estándar se describen en Matthiesen y Hansen, "Fast and non-toxic In-Situ Hybridization without Blocking of Repetitive Sequences" WO2009/144581, WO2010/097655, WO2010/097656, WO2010/097707 y WO2013/057310 y las referencias contenidas en los mismos.

40 Estos límites existen, por ejemplo, en el Kit IQFISH DAKO™ que, aunque ofrece una reducción en el tiempo necesario para realizar el procedimiento FISH, es muy caro y vinculado a una sola diana molecular (gen Her-2 y prueba de centrómero relativa, utilizando una sonda teñida con Rojo Texas).

Un segundo aspecto de los procedimientos convencionales a ser evaluado es la presencia de formamida desionizada en el tampón de hibridación. Este compuesto es tóxico para los humanos, su manejo requiere precauciones especiales y existen reglas estrictas para su eliminación.

45 Steen H. Matthiesen et al., "Fast and Non-Toxic In Situ Hybridization without Blocking of Repetitive Sequences", PLOS ONE, vol. 7, no. 7, 2012, p. e40675 - 1, divulga soluciones que son: formamida o solvente al 15 % v/v; sulfato de dextrano al 20 % v/v; NaCl 600 mM; tampón citrato 10 mM, pH 6,2; b) formamida o disolvente al 45 % v/v; sulfato de dextrano al 10 % v/v; Cot - 1 humano 0,1 µg/µl; NaCl 300 mM; tampón fosfato 5 mM, pH 7,5.

50 El documento WO 2010/097655 divulga el uso de diversos disolventes próticos polares como aditivos que aceleran la hibridación.

El documento WO 2013/057310 divulga una composición de hibridación que comprende una secuencia de ácido nucleico y un disolvente de desnaturalización que se selecciona del grupo que consiste en butadieno sulfona,

tetrahidrotiofeno 1-óxido (tetrametileno sulfóxido), d-valerolactama (2-piperidona), 2-pirrolidona, ciclopentanona, N-metil-2-pirrolidona, 1,3-dimetil-1,3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona, N,N-dimeti- acetamida e isobutiramida.

5 El documento WO 2014/070460 divulga la hibridación utilizando un tampón de hibridación que comprende dextrano sulfato al 10-20 %, 2xSSC y NaOH 1,0-5,0 mM y disolventes apróticos opcionalmente polares, tales como carbonato de etileno y DMSO.

La presente invención propone superar los problemas mencionados anteriormente, en particular para reducir los tiempos de análisis y reducir sustancialmente el uso de formamida.

10 La presente invención tiene otras ventajas, tales como el bajo coste de los reactivos necesarios y la posibilidad de aplicar el procedimiento y el acelerador adyuvante de aceleración propuesto en el presente documento a cualquier tipo de sonda molecular, tejido diana y tinción.

El uso de la presente invención tanto en el laboratorio de investigación como en el diagnóstico humano proporciona al médico una respuesta rápida y mejora la calidad de vida del paciente y de los servicios de salud proporcionados.

### Sumario de la invención

15 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que mediante la adición de una solución salina acuosa que comprende sulfato de dextrano de sodio, una base mineral fuerte, posiblemente mezclado con al menos un disolvente aprótico polar, o al menos un disolvente aprótico polar, a una sonda molecular (en solución y/o en su formato comercial y/o de producción) directamente sobre la muestra a examinar, se obtienen varias ventajas, que incluyen: una reducción en el tiempo requerido para realizar las investigaciones con sondas moleculares en muestras histológicas y citológicas; la creación de un procedimiento rápido y de bajo coste para la hibridación de muestras histológicas y citológicas con sondas moleculares, con la posibilidad de aplicarlo al protocolo ya en uso en las prácticas rutinarias de varios laboratorios para reducir el tiempo de trabajo de histología y muestras citológicas para investigaciones con sondas moleculares, sin impactos organizacionales en el trabajo de los operadores; la posibilidad de aplicar el aditivo de hibridación de acuerdo con la presente invención a las sondas que ya están en uso en las prácticas de rutina de varios laboratorios sin la necesidad de aumentar el gasto en instrumentación o partes de la misma; la posibilidad de repetir en un día cualquier investigación con sondas moleculares en muestras histológicas y citológicas que no resulten concluyentes después de aplicar el procedimiento estándar y/o el propuesto en la presente invención; la posibilidad de usar el aditivo descrito aquí sin formamida y, por lo tanto, con un menor nivel de toxicidad; la posibilidad de realizar lo descrito anteriormente también en muestras histológicas consideradas, debido a características biológicas y/o tisulares particulares y/o características conferidas por procedimientos preanalíticos, que es difícil de procesar.

30 El aditivo utilizado en el procedimiento de hibridación de la presente invención no pretende sustituir los ya presentes cuando se empaican o preparan sondas moleculares, pero se añade como aditivo adyuvante de aceleración que permite las fases de desnaturalización y la hibridación que se va a implementar.

El procedimiento de hibridación que utiliza de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a cualquier sistema y/o modelo y/o muestra biológica, particularmente para muestras de origen humano.

35 La presente invención es adecuada para ser aplicada a cualquier técnica de hibridación in situ, preferiblemente hibridación in situ con sondas de fluorescencia (FISH).

El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a cualquier sistema molecular capaz de hibridar ácidos nucleicos diana en muestras histológicas y/o citológicas por medio de apareamiento complementario de bases, por ejemplo, ADN, ARN y similares.

40 La presente invención también permite que la cantidad de sonda molecular requerida para el éxito de la hibridación que se va a reducir.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de hibridación de sondas moleculares que comprenden el uso de un aditivo para la aceleración de la hibridación que comprende:

- a) una solución acuosa de sulfato de dextrano de sodio,
- 45 b) una sal,
- c) una sistema tampón de citrato de sodio salino (SSC),
- d) una base mineral fuerte posiblemente mezclada con al menos un disolvente aprótico polar, o al menos un disolvente aprótico polar.

50 con la condición de que dicho aditivo no contenga ácidos nucleicos de formamida, agentes quelantes que no sean citrato de sodio salino (SSC), agentes bloqueantes.

5 En una realización de la presente invención, en el que dicho aditivo usado en el procedimiento de hibridación, dicha base mineral es un hidróxido de un metal. Preferiblemente, dicho hidróxido metálico se elige del grupo compuesto por hidróxido de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de potasio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de berilio, hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario, hidróxido de aluminio, hidróxido de galio, hidróxido de indio, e hidróxido de estaño. Más preferiblemente, dicho hidróxido metálico es hidróxido de sodio.

10 En una realización de la presente invención, en dicho aditivo utilizado en el procedimiento de hibridación, dicho disolvente aprótico polar es un disolvente orgánico que tiene un momento dipolar de al menos aproximadamente 2 unidades Debye, una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 5 % en volumen a temperatura ambiente y que no sufre un intercambio significativo de hidrógeno a pH neutro. Preferiblemente, dicho disolvente es elegido del grupo compuesto por carbonato de etileno,  $\gamma$  - butirrolactona, dióxido de azufre de tetrametilen sulfona, acetonitrilo, sulfito de glicol/sulfato de etileno, carbonato de propileno, tritiocarbonato de etileno,  $\epsilon$  - caprolactona, N - metil pirrolidinona, acetanilida, N - acetilpirrolidona, 4 - aminopiridina, benzamida, benzamidazol, 1,2,3 - benzotriazol, dióxido de butadieno, carbonato de 2,3 - butileno, caprolactona, anhídrido cloromaleico, 2 - clorociclohexanona, cloronitrometano, anhídrido citracónico, crotonolactona, ciclopropilnitrilo, dimetil sulfato, dimetil sulfona, dimetilsulfóxido, 1,2 - dinitrobenceno, 2,4 - dinitrotolueno, difenilsulfona, cloruro de etanosulfonilo, aldehído furánico, 2 - furonitrilo, isoxazol, anhídrido maleico, malononitrilo, 4 - metoxibenzonitrilo, 1 - metoxi - 2 - nitrobenceno, 1 - metilimidazol, 3 - metilisoxazol, N - metilmorfolino - N - óxido, metilfenilsulfona, metilsulfolano, metil - 4 - tolueno sulfato, 3 - nitroanilina, 2 - nitrotiofeno, 9,10-p henanthrenequinona, anhídrido ftálico, 1,3 - propano sultona, beta - propiolactona, 2 - pirrolidona, succinonitrilo, sulfanilamida, 2,2,6,6 - tetraclorociclohexanona, tiazol, 3,3,3 - tricloropropeno, 1,1,2 - tricloropropeno y 1,2,3 - tricloropropeno. Más preferiblemente dicho disolvente es carbonato de etileno.

En una realización de la presente invención, en el que dicho aditivo usado en el procedimiento de hibridación, dicho componente d) se compone de un disolvente polar aprótico.

25 En una realización de la presente invención, dicha hibridación es in situ, en particular, dicha hibridación se selecciona de entre el grupo que consiste en la hibridación de fluorescencia y la hibridación no fluorescencia.

30 En una realización de la presente invención, dicho aditivo se usa en la determinación de la constitución genética de Her2 en cáncer de mama y gástrico con el fin de asignar la terapia dirigida, o en la determinación de reordenamiento ALK, en particular en el cáncer de pulmón y tiroides con el fin de asignar terapia dirigida, o para determinar una posible alteración genética y cromosómica para su uso diagnóstico, en particular al evaluar las eliminaciones cromosómicas 1p36 y 19q13 como factores pronósticos, particularmente en neoplasmas gliales, o en la determinación de la ganancia del gen TERC (3q26) como marcador diagnóstico/pronóstico en lesiones potencialmente malignas de la cavidad oral (OPML).

En una realización de la presente invención, dicho aditivo se utiliza para el reprocesamiento de muestras sometidas a hibridación, especialmente hibridación in situ.

35 Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento de hibridación de sondas moleculares que implican el uso del aditivo mencionado anteriormente. En una realización de la presente invención, dicho aditivo es mezclado con la sonda molecular, preferiblemente en la muestra biológica. En particular, dicha hibridación es in situ, por ejemplo, elegida del grupo que consiste en FISH, CISH y SISH.

En una realización de la presente invención, en dicho procedimiento, se lleva a cabo la desparafinización en caliente.

40 La presente invención se describirá ahora en detalle también por medio de ejemplos y figuras.

La figura 1 muestra un diagrama de flujo de una realización del procedimiento de acuerdo con la presente invención.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

En el contexto de la presente invención, se aplicarán las siguientes definiciones.

45 Una "muestra biológica" significa cualquier muestra in vivo, in vitro o in situ formada por una o más células o fragmentos de células. Esto puede ser, por ejemplo, un organismo unicelular o multicelular, una sección de tejido, una muestra citológica, un precipitado cromosómico, secuencias de secuencias de ácido nucleico purificadas, secuencias de ácido nucleico artificial, por ejemplo, basadas en un sistema biológico o síntesis químico, micromatrices u otra forma de chip de ácido nucleico. En las realizaciones mencionadas, una muestra significa una muestra de tejido de mamífero tal como, por ejemplo, humano, felino o canino.

50 Esta definición también incluye "muestras histológicas y citológicas".

"Ácido nucleico", "cadena de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" significan cualquier cosa que se une o hibrida con un emparejamiento de bases que incluye oligómeros o polímeros que tienen una estructura formada por

nucleótidos naturales y/o similares de ácidos nucleicos que comprende bases nitrogenadas no estándar y/o estructuras no estándar (por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (PNA) o ácido nucleico bloqueado (LNA)), o cualquier forma derivada de un ácido nucleico.

- 5 Un “disolvente aprótico polar” significa un disolvente orgánico que tiene un momento dipolar de alrededor de 2 o más unidades Debye, una solubilidad en agua de al menos alrededor de 5 % (en volumen) que corresponde a o cerca de temperatura ambiente, es decir, alrededor de 20 °C, y eso no sufre un intercambio de hidrógeno significativo a un pH aproximadamente neutro, es decir, en el intervalo de 5 a 9, en particular en el intervalo de 6 a 8.

“Solución acuosa” significa una solución que contiene agua, incluso pequeñas cantidades de agua. Por ejemplo, una solución que contiene 1 % de agua se considerará una solución acuosa.

- 10 “Hibridación” se considera que incluyen tanto los de desnaturalización y de hibridación fases del procedimiento de hibridación a menos que se indique lo contrario.

Se considera que “aditivo de hibridación” o “solución de hibridación” o “tampón de hibridación”, en adelante incluso simplemente “aditivo”, es una solución acuosa necesaria para implementar el procedimiento de hibridación, por ejemplo, para unir una sonda molecular a una secuencia de ácido nucleico de la muestra.

15 **Elección de base mineral fuerte y solvente**

El aditivo utilizado en el procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención comprende o puede comprender al menos un disolvente polar aprótico.

Como se ve en las definiciones dadas anteriormente, un disolvente aprótico polar es un disolvente orgánico que tiene ciertas características y realizar la función de desnaturalizante en la fase de hibridación.

- 20 De acuerdo con la presente invención, dicho disolvente puede estar presente junto con la base mineral fuerte o por su cuenta.

Los ejemplos de disolvente aprótico polar adecuado para la presente invención son carbonato de etileno (EC),  $\gamma$ -butirolactona (GBL), sulfolano (SL), dióxido de tetrametileno azufre, acetonitrilo (AN), glicol sulfito sulfito/etileno (GS), carbonato de propileno (PC), tritiocarbonato de etileno (ETC),  $\epsilon$ -caprolactona; N-metil pirrolidina, acetanilida, N-acetilpirrolidona, 4-amminopiridina, benzamida, benzamidazol, 1,2,3-benzotriazol, dióxido de butadieno, carbonato de 2,3-butileno, caprolactona, anhídrido cloromaleico, 2-clorociclohexanona, cloronitrometano, anhídrido citracónico, crotonolactona, ciclopropilnitrilo, sulfato de dimetilo, sulfato de dimetilo, dimetil sulfona, sulfóxido de dimetilo, 1,2-dinitrobenzoceno, 2,4-dinitrotolueno, difenilsulfona, cloruro de etanosulfonilo, aldehído furánico, 2-furonitrilo, isoxazol, anhídrido maleico, malononitrilo, 4-metoxibenzonitrilo, 1-metoxi-2-nitrobenzoceno, 1-metilimidazol, 3-metilisoxazol, N-metilmorfolina-N-óxido, metilfenilsulfona, metilsulfolano, metil-4-tolueno sulfato, 3-nitroanilina, 2-nitrotiofeno, 9,10-fenantrenequinona, anhídrido ftálico, 1,3-propano sultona, beta-propiolactona, 2-pirrolidona, succinonitrilo, sulfanilamida, 2,2,6,6-tetraclorociclohexanona, tiazol, 3,3,3-tricloropropeno, 1,1,2-tricloropropeno y 1,2,3-tricloropropeno.

- 35 El aditivo adyuvante de aceleración utilizado en el procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención no es un sustituto del tampón en la que se embalan las sondas moleculares, pero se añade al producto comercial, por medio de la hibridación con los ácidos nucleicos diana .

El aditivo utilizado en el procedimiento de hibridación de la presente invención no contiene ácidos nucleicos, agentes quelantes o agentes de bloqueo.

**Optimización para aplicaciones particulares**

- 40 El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención puede ser modificado en relación con los requisitos particulares de la aplicación ya sea en relación a la muestra biológica a analizar (por ejemplo, citológico, histológico, etc.), para el sistema y/o modelo y/o muestra biológica (por ejemplo, insectos, ratones, gatos, perros, etc.) o para las sondas moleculares utilizadas.

45 Por ejemplo, es posible variar los tiempos relativos a los tratamientos térmicos y enzimáticos en relación con el tratamiento pre - analítica de la muestra biológica en cuestión.

Por ejemplo, es posible variar las concentraciones de los diversos componentes del aditivo adyuvante de aceleración en relación con las características de la muestra biológica en cuestión y/o de la sonda molecular utilizada.

Por ejemplo, es posible variar la temperatura de hibridación posterior a la co - desnaturalización de la sonda molecular en uso con el ácido nucleico diana en relación con las especificaciones de las instrucciones del fabricante de la sonda.

- 50 Por ejemplo, es posible variar la co-desnaturalización temperatura poste hibridación de la sonda molecular en uso con el ácido nucleico diana en relación con las especificaciones de las instrucciones del fabricante de la sonda.

**Aplicaciones, procedimientos y usos**

Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento de hibridación de sondas moleculares que implica el uso del aditivo anteriormente descrito.

5 En una realización preferida de la invención, dicha hibridación es in situ y, en particular, la hibridación se selecciona de entre el grupo que consiste en FISH, CISH y SIS.

Con referencia a una realización en la Figura 1, dicho procedimiento implica:

- incubación de la muestra biológica en un horno de secado, por ejemplo, a una temperatura de 60 °C;
- incubación en inmersión en una solución que contiene un agente de diafonización, como limoneno, en un horno de secado, por ejemplo, a una temperatura de 60 °C;
- 10 – incubación en inmersión en una solución acuosa a base de cloruro de sodio, citrato de sodio tribásico anhidro, por ejemplo, a una temperatura de 77 °C, por ejemplo, en un baño termostáticamente controlado;
- incubación en inmersión en una solución acuosa a base de cloruro de sodio, citrato de sodio tribásico anhidro, complementado con una proteína enzimática capaz de digerir los enlaces peptídicos de las proteínas celulares como, por ejemplo, la proteinasa K, por ejemplo, a una temperatura de 47 °C, por ejemplo, en un
- 15 baño termostáticamente controlado.

Las etapas descritas hasta ahora se llevan a cabo utilizando procedimientos y reactivos convencionales.

El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención prevé las siguientes fases para la fase de hibridación de los ácidos nucleicos de la muestra con la sonda molecular:

- fijar de una cantidad adecuada de la sonda molecular utilizada, en su formulación comercial, a la muestra preparada anteriormente;
- unir una cantidad adecuada del aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención a la muestra mencionada en el punto anterior;
- mezclar la cantidad de sonda molecular utilizada, en su formulación comercial, unida a la muestra con la cantidad de tampón aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención, directamente sobre
- 25 la muestra;
- colocar un cubreobjetos y sellarlo con adhesivo de vinilo o similar, como Rubber Cement™;
- colocar las muestras preparadas como se describe en los puntos anteriores en una placa calentada tipo TopBrite™ a la temperatura específica para cada sonda según las instrucciones del fabricante (por ejemplo, 75 °C) durante el tiempo mínimo necesario para la desnaturalización correcta de los ácidos nucleicos (por
- 30 ejemplo, 15 minutos);
- enfriar las muestras mientras todavía están en la placa calentada mencionada en el punto anterior hasta que se alcanza la temperatura de hibridación óptima;
- incubar para la fase de hibridación, mientras todavía se encuentra en la placa calentada mencionada anteriormente, a la temperatura óptima según las instrucciones del fabricante (por ejemplo, 37 °C) durante
- 35 un tiempo más corto que el procedimiento estándar (por ejemplo, 40 minutos con el procedimiento de acuerdo con la presente invención en comparación con el período nocturno del procedimiento convencional). Para verificar que se haya producido la hibridación y determinar la temperatura óptima, se retiran los portaobjetos de la placa de hibridación, se realizan los procesos de rigurosidad y contraste nuclear posteriores y se observan los portaobjetos bajo el microscopio, comparándolos con la muestra procesada utilizando El
- 40 procedimiento estándar. Por supuesto, el procedimiento puede luego ser estandarizado en base al experimento y al tipo de muestra examinada.

El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención también contempla el uso de tratamientos térmicos de las muestras histológicas y citológicas para la fase de post - hibridación de los ácidos nucleicos de la muestra con la sonda molecular, que comprende:

- 45 – incubar en la inmersión en una solución acuosa a base de cloruro de sodio, citrato de sodio tribásico anhidro y NP40 (octilfenoxipolietoxietanol), por ejemplo, a una temperatura de 75 °C, por ejemplo, en un baño termostáticamente controlado.

50 El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención prevé, con el fin de ver la preparación en el microscopio de fluorescencia durante la fase de post - hibridación de los ácidos nucleicos de la muestra con la sonda molecular:

- fijar de una cantidad adecuada de una solución que contiene DAPI (2 - (4 - amidino fenil) - 1H - indol - 6 - carboxamidina) a la que PPD (1,4 - diaminobenceno) puede o no puede ser añadido para evitar la pérdida de la señal fluorescente debido a la exposición a fuentes de luz (foto - blanqueo);
- 55 – unir a un cubreobjetos.

Se entiende que cualquier variación en el procedimiento descrito anteriormente que son de conocimiento general común en el sector, por ejemplo, variaciones de tratamientos térmicos, reactivos y condiciones, caen dentro del alcance de la presente invención, caracterizado por el uso de la aditivo de hibridación descrito anteriormente.

5 El aditivo adyuvante de aceleración utilizado en el procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención permite la hibridación en análisis in situ, por ejemplo, FISH, a realizar en un tiempo muy corto, por ejemplo, reducido a 157-165 minutos en comparación con alrededor de 210 minutos del sistema más rápido actualmente disponible en el mercado.

10 El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención se puede utilizar tal como son, o parcialmente modificado. Por ejemplo, es posible realizar las adaptaciones apropiadas dependiendo de la muestra biológica a tratar, y adaptarla a la que ya se utiliza en el laboratorio cambiando los tiempos de tratamiento y desparafinación, por ejemplo, en todas las hibridaciones in situ relacionadas con los campos de citología, histología y biología molecular, en el contexto humano, animal, vegetal y microbiológico.

El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención también se puede utilizar en asociación con los procedimientos estándar, posiblemente modificado para adecuarse a los requisitos operacionales.

15 En una realización preferida de la presente invención, dicho aditivo se utiliza en un procedimiento de hibridación para determinar la constitución genética de Her2 en cáncer de mama y gástrico con el fin de asignar la terapia dirigida.

En una realización preferida de la presente invención, dicho aditivo se utiliza en un procedimiento de hibridación para determinar la transposición de ALK, en particular, en el pulmón y cáncer de tiroides con el fin de asignar una terapia dirigida.

20 En una realización preferida de la presente invención, dicho aditivo se utiliza en un procedimiento de hibridación para determinar una potencial alteración de gen y cromosoma, útil para propósitos de diagnóstico.

En una realización preferida de la presente invención, dicho aditivo se utiliza en un procedimiento de hibridación para evaluar las eliminaciones cromosómicas 1p36 y 19q13 como factores de pronóstico, en particular en neoplasmas gliales.

25 En una realización preferida de la presente invención, dicho aditivo se utiliza en un procedimiento de hibridación para el evaluación de la ganancia de copias de la TERC gen (3q26) como marcador de diagnóstico/pronóstico en lesiones potencialmente malignas de la cavidad oral (OPML).

El procedimiento de hibridación de acuerdo con la presente invención puede utilizarse también en el caso de un segundo procesamiento de la misma muestra si el primer análisis no es técnicamente concluyente.

30 En los protocolos de hibridación convencionales, las muestras FFPE deben ser despojados de parafina al someterse a lavados sucesivos, típicamente en xilol durante 10-20 minutos cada uno, rehidratada por lo general en alcoholes (3-5 lavados de 2 a 5 minutos cada uno) y se sometieron a tratamientos de proteasa y térmicos, por ejemplo, en SSC2X a 75 °C durante 1-20 minutos y SSC2X/Proteinasa K a 45 °C durante 1-20 minutos.

35 A esto le sigue una fase de desnaturalización conjunta de la sonda molecular utilizada con los ácidos nucleicos de la muestra a una temperatura indicada en las instrucciones del fabricante de la sonda o establecida por el laboratorio individual, durante un tiempo, por ejemplo, de 15 minutos.

A continuación, viene la fase de hibridación de la sonda molecular utilizada con los ácidos nucleicos de la muestra a una temperatura indicada en las instrucciones del fabricante de la sonda o establecida por el laboratorio individual, durante un tiempo especificado como "durante la noche".

40 Después de la hibridación, la muestra se somete a un lavado riguroso, por ejemplo, en SSC2X/NP40 a 75 °C durante 1-3 minutos, y es entonces deshidratado y montado para su análisis.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención implica las siguientes etapas:

Si el tejido es fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE), se obtienen las secciones de 4-5 µm para ser colocado en un portaobjetos polarizado.

45 En un baño controlado por termostato, establezca una temperatura de 67 °C - 100 °C, preferiblemente 70 °C - 92 °C, más preferiblemente 71 °C - 84 °C (temperatura óptima 77 °C).

Insertar una bandeja vertical que contiene 100 ml de tampón de citrato a pH 7 (SSC2x, obtenida por dilución de una solución madre SSC20x que comprende: 175,3 g de cloruro de sodio, 119,05 g de citrato de sodio tribásico anhidro y agua bidestilada para un volumen final de 1 litro)

50 En un baño controlado por termostato, establezca una temperatura de 33 °C - 73 °C, preferiblemente 40 °C - 63 °C, más preferiblemente 40 °C - 53 °C (temperatura óptima 47 °C).

## ES 2 796 701 T3

Insertar una bandeja vertical que contiene 100 ml de tampón de citrato a pH 7 (SSC2x, obtenida por dilución de una solución madre SSC20x que comprende: 175,3 g de cloruro de sodio, 119,05 g de citrato de sodio tribásico anhidro y agua bidestilada para un volumen final de 1 litro)

- 5 En un baño controlado por termostato, establezca una temperatura de 67 °C - 100 °C, preferiblemente 66 °C - 92 °C, más preferiblemente 66 °C - 84 °C (temperatura óptima 75 °C).

- 10 Insertar una bandeja vertical que contiene 100 ml de tampón de citrato a pH 7 (SSC2x, obtenida por dilución de una solución madre SSC20x que comprende: cloruro de sodio 175,3 g, citrato de sodio tribásico anhidro 119,05 g y agua bidestilada hasta un volumen final de 1 litro) en el que se ha diluido una cantidad adecuada de octilfenoxipolietoxietanol o detergente no iónico no desnaturizante similar, como un porcentaje del volumen total de entre 0,1 % - 15 %, preferiblemente 0,3 % - 9 % (intervalo óptimo 1,5 %).

Si es necesario, llevar gradualmente las sondas moleculares utilizadas hasta la temperatura ambiente.

Llevar el aditivo de hibridación a temperatura ambiente en la composición adecuada para el material a analizar.

Composición general del aditivo adyuvante de aceleración: los porcentajes se expresan en peso/volumen en el caso de un sólido, o en volumen/volumen en el caso de líquidos.

- 15 Hidróxido de sodio: como un porcentaje del volumen final entre el 0 % - 54 %, preferentemente 0,3 % - 28 %, más preferentemente 0,3 % - 14 % (concentración óptima 1,07 %).

Carbonato de etileno calentado a una temperatura de 37 °C como un porcentaje del volumen final entre el 0 % - 54 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 20 % - 35 % (de manera óptima 28,57 %).

- 20 El sulfato dextrano de sodio (preparado diluyendo 2,5 g de sulfato dextrano de sodio en 5 ml de agua bidestilada a 60 °C) como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 20 % - 50 %, (óptimamente con respecto a la aplicación del tampón de acuerdo con la presente invención: 28,57 % y 49,46 %).

agua Bi - destilada como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 % (de manera óptima en lo que respecta a la aplicación del tampón de acuerdo con la presente invención 28,57 % y 32,97 %).

- 25 Tampón citrato (también llamado SSC20x): 175,3 g de cloruro de sodio, 119,05 g de citrato de sodio tribásico anhidro, agua bidestilada para un volumen final de 1 litro como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 3 % - 25 % (óptimamente con respecto a la aplicación del tampón de acuerdo con la presente invención 14,29 % y 16,48 %).

- 30 Para los casos considerados "estándar" debido a las características de procesamiento histológico y/o pre - analítico y/o para el reprocesado de los casos considerados como "difíciles" debido a las características de procesamiento histológico y/o pre - analítico y/o poco concluyente. después de un diagnóstico inicial utilizando el procedimiento estándar y/o todo o parte del propuesto en la presente invención para su uso a temperatura ambiente, el aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención en la denominada formulación "DO" se compone de la siguiente manera:

- 35 Carbonato de etileno calentado a una temperatura de 37 °C como porcentaje del volumen final entre los siguientes intervalos: 0,1 % - 54 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 20 % - 35 % (óptimamente 28,57 %).

El sulfato de dextrano de sodio (preparado diluyendo 2,5 g de sulfato de dextrano de sodio en 5 ml de agua bidestilada a 60 °C) como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 24 % - 35 % (óptimamente 28,57 %).

- 40 Agua bidestilada como porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 24 % - 35 % (óptimamente 28,57 %).

El SSC20x comprende: cloruro de sodio 175,3 g, citrato de sodio tribásico anhidro 119,05 g, agua bidestilada hasta un volumen final de 1 litro, como porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 3 % - 40 %, más preferiblemente 10 % - 25 % (óptimamente 14,29 %).

- 45 Para los casos considerados "difíciles", debido a las características de procesamiento histológico y/o pre - analítico y/o al reprocesamiento de los casos considerados como "estándar" debido a las características de procesamiento histológico y/o pre - analítico y/o no concluyente después de un diagnóstico inicial utilizando el procedimiento estándar y/o todo o parte del propuesto en la presente invención para su uso a temperatura ambiente, el aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención en las formulaciones denominadas "MO" compone de la siguiente manera:

- 50 Hidróxido de sodio como porcentaje del volumen final entre: 0 % - 54 %, preferiblemente 0,3 % - 28 %, más preferiblemente 0,3 % - 14 % (óptimamente 1,07 %).



## ES 2 796 701 T3

- El sulfato de dextrano de sodio (preparada diluyendo 2,5 g de sulfato de dextrano de sodio en 5 ml de agua bidestilada a 60 °C) como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 25 % - 73 %, más preferiblemente 20 % - 50 % (óptimamente 49,46 %).
- 5 Agua bidestilada como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 25 % - 49 %, más preferiblemente 10 % - 40 % (de manera óptima 32,97 %).
- El SSC20x comprende: cloruro de sodio 175,3 g, citrato de sodio tribásico anhidro 119,05 g, agua bidestilada hasta un volumen final de 1 litro, como porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 7 % - 25 % (óptimamente 16,48 %).
- 10 Para casos considerados “estándar” debido a características de procesamiento histológico y/o preanalítico y/o para el reprocesamiento de casos considerados “difíciles” debido a características de procesamiento histológico y/o preanalítico y/o no concluyente después de un diagnóstico inicial utilizando el procedimiento estándar y/o todo o parte de lo propuesto en la presente invención y/o para tratamientos de casos considerados “estándar” debido a características de procesamiento histológico y/o preanalítico y/o para tratamientos de casos considerados “difíciles” debido a las características de procesamiento histológico y/o preanalítico para su uso a temperatura ambiente, el aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención en la denominada formulación “**DOMO**” se compone de la siguiente manera:
- 15 Hidróxido de sodio como porcentaje del volumen final entre: 0 % - 54 %, preferiblemente 0,1 % - 20 %, más preferiblemente 0,15 % - 12 %, (óptimamente 0,43 %).
- 20 Carbonato de etileno calentado a una temperatura de 37 °C como un porcentaje del volumen final entre el 0,1 % - 54 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 3 % - 35 % (de manera óptima 13,86 %).
- El sulfato de dextrano de sodio (preparado diluyendo 2,5 g de sulfato de dextrano de sodio en 5 ml de agua bidestilada a 60 °C) como un porcentaje del volumen final de entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 24 % - 35 % (óptimamente 28,75 %).
- 25 Agua bidestilada como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 24 % - 35 %, más preferiblemente 10 % - 40 % (de manera óptima 28,57 %).
- SSC20x que comprende: cloruro de sodio 175,3 g, citrato de sodio tribásico anhidro 119,05 g, agua bidestilada hasta un volumen final de 1 litro como porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 55 %, preferiblemente 10 % - 40 %, más preferiblemente 3 % - 25 % (óptimamente 13,68 %).
- 30 Se calienta a 37 °C una alícuota de Proteinasa K (obtenida diluyendo la solución madre de Proteinasa K con una cantidad apropiada de agua bidestilada) con un volumen entre: 100 µl – 2.000 µl, preferiblemente 200 µl – 1.500 µl, más preferiblemente 300 µl – 1.200 µl (óptimamente 625 µl) y una concentración entre 0,05 mg/ml - 1,11 mg/ml, preferiblemente 0,15 mg/ml - 0,82 mg/ml, más preferiblemente 0,05 mg/ml - 0,52 mg/ml (óptimamente 0,25 mg/ml).
- 35 Sumergir las secciones en xilol o (R) o limoneno (S) en el horno, a una temperatura de entre 33 °C - 73 °C, preferiblemente 43 °C - 67 °C, más preferiblemente de 53 °C - 63 °C (óptimamente 60 °C), durante un tiempo entre: 5,2' - 64', preferiblemente 20' - 49', más preferiblemente 25' - 35' (óptimamente 30').
- Luego realice 3 lavados sucesivos en xilol/limoneno en una bandeja horizontal que oscile durante un tiempo para cada uno entre: 1' - 24', preferiblemente 2' - 10', más preferiblemente 3' - 9' (óptimamente 4').
- Secar al aire a temperatura ambiente.
- 40 Luego realice 2 lavados sucesivos en etanol al 100 % en una bandeja horizontal que oscile durante un tiempo para cada uno entre: 1' - 24', preferiblemente 2' - 10', más preferiblemente 3' - 9' (óptimamente 4').
- Secar al aire a temperatura ambiente.
- 45 Sumergir las secciones secas en la bandeja que contiene 100 ml de SSC2x a una temperatura de entre 67 °C - 100 °C, preferiblemente 70 °C - 92 °C, más preferiblemente 71 °C - 84 °C (de manera óptima 77 °C), durante un tiempo entre: 1' - 24', preferiblemente 6' - 18', más preferiblemente 7' - 23' (óptimamente 13' para mama y tiroides; 14' para pulmón; 20' para carcinoma de cavidad oral).
- Después de que hayan transcurrido de 1 a 3 minutos, disolver la proteinasa K en la bandeja que contiene 100 ml de SSC2x a una temperatura de entre: 33 °C - 73 °C, preferiblemente, 40 °C - 63 °C, más preferiblemente 43 °C - 53 °C, (óptimamente 47 °C).
- 50 Después de que hayan transcurrido los minutos restantes, sumergir la secciones de la bandeja que contiene 100 ml de SSC2x a una temperatura de entre: 33 °C - 73 °C, preferiblemente 40 °C - 63 °C, más preferiblemente de 43 °C - 53 °C (óptimamente 47 °C), durante un tiempo entre: 1' - 24', preferiblemente 6' - 18', más preferiblemente 7' - 23' (óptimamente 13' para mama y tiroides; 14' para pulmón; 20' para el carcinoma de la cavidad oral).

Luego lave los portaobjetos en 100 ml de SSC2x en una bandeja vertical durante un tiempo de entre 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2').

- 5 Deshidrate las secciones lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol: durante un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2') en una bandeja vertical que contiene 100 ml de etanol al 70 % (obtenido diluyendo 70 ml de etanol al 100 % con 30 ml de agua bidestilada) durante un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2') en una bandeja vertical que contiene 100 ml de etanol al 85 % (obtenido por diluir 85 ml de etanol al 100 % con 15 ml de agua bidestilada) durante un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2') en una bandeja vertical que contiene 100 ml de etanol al 100 %.

Secar al aire a temperatura ambiente.

- 10 Al mismo tiempo, incubar a 37 °C una alícuota del aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención en la composición adecuada para el material a analizar.

Adjunte a las secciones una cantidad adecuada de sonda molecular según la preparación o paquete comercial, y agregue directamente a la sección una cantidad igual del tampón aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención en la composición adecuada para el material a analizar.

- 15 Mezclar directamente en la sección de la cantidad de sonda molecular prescindirse de la misma cantidad de aditivo adyuvante aceleración de tampón de acuerdo con la presente invención en la composición adecuada para el material a analizar.

Coloque un cubreobjetos y selle con adhesivo de vinilo o similar, como Rubber Cement™.

Se incuba la sección sobre una placa calentada (hibridador) de acuerdo con el siguiente programa:

- 20 Fase de desnaturalización con la temperatura y los tiempos de acuerdo con las instrucciones de la sonda molecular utilizada.

Fase de hibridación con temperatura de acuerdo con las instrucciones de la sonda molecular utilizada durante un tiempo entre: 14' - 160', preferiblemente 25' - 120', más preferiblemente 11' - 80' (óptimamente 40').

- 25 Cuando haya transcurrido el tiempo, retire el sellador sumergiendo las secciones en una bandeja vertical que contiene 100 ml de SSC2x a temperatura ambiente.

Luego sumerja las secciones en la bandeja que contiene 100 ml de SSC2x, (octilfenoxipolietoxietanol), como un porcentaje del volumen final entre: 0,1 % - 15 %, preferiblemente 0,3 % - 9 % (óptimamente 1,5 %) a una temperatura entre: 67 °C - 100 °C, preferiblemente 70 °C - 92 °C, más preferiblemente 71 °C - 84 °C (óptimamente 75 °C) durante un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 3').

- 30 Luego lave los portaobjetos en 100 ml de SSC2x en una bandeja vertical durante un tiempo entre 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2').

Deshidrate las secciones lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol durante un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2') en una bandeja vertical que contiene 100 ml de etanol al 70 % por un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2') en una bandeja vertical que contiene 100 ml de etanol al 85 % durante un tiempo entre: 30" - 6', preferiblemente 1' - 5' (óptimamente 2') en una bandeja vertical que contiene 100 ml de etanol al 100 %.

- 35 Secar al aire a temperatura ambiente.

Unir a las secciones de una cantidad adecuada de DAPI (2-(4-amidinofenil)- 1H-indol-6-carboxamida) PPD a la que se puede añadir (1,4-diaminobenceno) con el fin de evitar la pérdida de la señal fluorescente debido a la exposición a fuentes de luz, es decir, foto - blanqueo.

- 40 Luego, ajusta el cubreobjetos.

Mantener en la oscuridad a + 4 °C o pasar a la fase de lectura.

- 45 El tiempo total óptimo promedio desde el principio del procedimiento es entre 157 minutos y 165 minutos, dependiendo del tejido analizado con el aditivo adyuvante de aceleración de acuerdo con la presente invención. A modo de comparación, el tiempo promedio de un procedimiento convencional es de alrededor de 24 horas.

También se ha descubierto, y es otro aspecto de la presente invención, que al llevar a cabo la fase preliminar de desparafinación en caliente, entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 60 °C, los tiempos totales del procedimiento pueden ser más reducidos.

- 50 Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención reduce el tiempo de trabajo global gracias a la reducción en los tiempos de desparafinación y rehidratación (de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 40

minutos) y, sobre todo, a la reducción en el tiempo de hibridación en placa de la sonda con ácido nucleico diana (de la noche a la mañana [o/n] a 40') debido al efecto del tampón aditivo acelerador.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

5 Los reactivos utilizados en los siguientes ejemplos son:

Micro limpieza (a base de D-limoneno sustituido con xileno) de la Diapath S.p.A. Company (X0025) para eliminar la parafina; Diawhite absoluto (mezcla de alcohol incoloro con un grado absoluto de 99,7 - 99,9 %) de Diapath S.p.A. Company (A0165) para la rehidratación parcial inicial; agua destilada de Carlo Erba Company (307582) para preparar tampones y diluciones de alcohol; alcohol etílico absoluto de Panreac Company (1091 PA) para aumentar progresivamente las concentraciones de alcohol para la fase de deshidratación; cloruro de sodio de Carlo Erba Company (368259) para preparar el tampón de citrato de sodio (SSC); citrato de sodio tribásico anhidro de Carlo Erba Company (E368107) para preparar el tampón de citrato de sodio (SSC); Nonidet<sup>R</sup> P40 Sustituto de Fluka Company (31903213) para preparar el tampón de restricción; hidrato de sodio de Carlo Erba Company (480507) para preparar el aditivo de hibridación; carbonato de etileno de la compañía Aldrich (E26258-500G) para preparar el aditivo de hibridación; sulfato de dextrano sódico de Sigma Company (42867-25G) para preparar el aditivo de hibridación; Pepsina de la mucosa gástrica porcina de Sigma Company (P7125-100G) para el tratamiento de proteasas de muestras citológicas; formalina al 10 % tamponada neutra de Bio-Optica Company (05-K01009) para preparar el tampón posterior a la fijación de las muestras citológicas; cloruro de magnesio de Sigma Company (M8266-1KG) para preparar el tampón posterior a la fijación de las muestras citológicas; Ácido clorhídrico al 37 % de Carlo Erba Company (7647-01-0) para preparar el tampón de tratamiento de proteasa de las muestras citológicas; Proteinasa K, recombinante, grado de PCR de la Roche Diagnostics Company (03 115 852 001) para el tratamiento de la proteasa de las muestras histológicas de FFPE o muestras citológicas de bloque celular; mezcla de las sondas de control Poseidon<sup>TM</sup> ERBB2, Her-2/neu (17q12)/SE 17 de Kreatech Diagnostics Company (KBI-10701) para evaluar la amplificación génica del gen Her-2; mezcla de sondas en el kit de sondas Vysis EGFR/CEP7 FISH de Abbott Molecular Company (01N35-020) para evaluar la amplificación del gen EGFR y la aneusomía del cromosoma 7; Mezcla de sondas en el kit de sonda Vysis ALK Break Apart FISH de Abbott Molecular Company (06N38-020) para evaluar la reorganización del gen ALK; Mezcla de sondas en el kit de sondas Vysis 1p36/1q25 y 19q13/19p13 FISH de Abbott Molecular Company (4N6020) para evaluar las eliminaciones cromosómicas 1p36 y 19q13; Mezcla de sondas CÁNCER CERVICAL (3T26, 8T24, A-SAT CHR. 7) ditta Kreatech Diagnostics (KBI-10704) para la evaluación de la ganancia de las copias del gen como marcador de diagnóstico/pronóstico en las lesiones potencialmente malignas de la boca cavidad (OPML); Rubber Cement<sup>TM</sup> de Royal Talens Company (95306500) para sellar los cubreobjetos durante la fase de desnaturalización/hibridación de la sonda molecular con el ácido nucleico de la muestra; Contratación DAPI de la Kreatech Diagnostics Company (LK-096A) para contrarrestar los núcleos al final del procedimiento para realizar la hibridación in situ;

35 para las etapas de desparafinación a alta temperatura se usó el horno de secado Digit-HOT de la PBI International Company (56297); para los tratamientos térmicos y de proteasa, se utilizaron un baño controlado termostáticamente de dos pozos Clifton y un baño controlado termostáticamente con oscilador de Bicara Company; Para las etapas de desnaturalización e hibridación, se usó una placa calentada TopBrite de Rosnova srl Company (TB-001S).

40 La evaluación de las preparaciones FISH se llevó a cabo dentro de los 3 días de la hibridación, utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon BX61 equipado con filtros DAPI FITC, TRITC, B/G, y U/B/G y 4X, lentes de inmersión 20X, 40X y 100X.

### Ejemplo 1 - Procedimiento de FISH en muestras histológicas y/o de bloqueo celular:

45 Las secciones de tejido (mama, pulmón, tiroides y cerebro) o material de bloque de células FFPE se cortan a un espesor de 4-5 mm y se colocan bajo portaobjetos polarizados.

Se incuban a continuación en un horno de secado durante 30 minutos a 60 °C y se eliminó la parafina durante 30 min en xilol, también a 60 °C.

Las secciones se sumergieron en 3 lavados sucesivos de xilol a temperatura ambiente durante 4 minutos cada uno, con agitación.

50 Posteriormente, las secciones se secan al aire a temperatura ambiente y se someten a 2 lavados sucesivos en etanol al 100 % durante 5 minutos cada uno, bajo agitación.

Las secciones se secaron al aire a temperatura ambiente.

55 Una vez secas, las secciones se transfieren al tampón SSC2x de citrato de sodio y se calientan a una temperatura de 77 °C durante los siguientes tiempos: lesiones de mama y tiroides y neoplásicas relativas 13 minutos, lesiones pulmonares y neoplásicas relativas 14 minutos, lesiones neoplásicas y de cerebro relativas 14 minutos.

Las secciones se transfieren a continuación en el tampón SSC2x de citrato de sodio, en la que se ha disuelto un 625 µl alícuota de proteinasa K 20 mg/ml y se calentó a 47 °C durante los siguientes momentos: lesiones neoplásicas de mama y tiroides y relativas 13 minutos, lesiones pulmonares y neoplásicas relativas 14 minutos, lesiones cerebrales y neoplásicas relativas 14 minutos.

- 5 Las muestras se lavan luego en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y se deshidratan lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol (70 %, 85 %, 100 %) durante 2 minutos cada una.

Luego se secan al aire a temperatura ambiente.

- 10 Una vez seco, adjuntar a las secciones 3-5 µl de una mezcla de sondas específicas (Her2/CEP17; EGFR/CEP7; ALK - EML4; 1p36/1q25; 19q13/19p13; 3Q26, 8Q24, A-SAT CHR 7) y luego agregue algunos de los tampones aditivos adyuvantes de aceleración de acuerdo con la presente invención, para ser precisos: **DO** para las muestras de mama y **MO** para las muestras de tiroides, pulmón, cerebro y orales.

Luego, vuelva a suspender la mezcla de sondas específicas en el portaobjetos, junto con el aditivo adyuvante acelerador relativo de la presente invención, coloque un cubreobjetos y selle con Rubber Cement™.

Coloque los portaobjetos así preparados en la placa de hibridación TopBrite ajustada a los siguientes parámetros:

- 15 – Desnaturalización: 75 °C durante 15'  
– Hibridación: 37 °C durante 40'

- 20 Una vez que la fase conocida generalmente como la hibridación se ha completado, el cubreobjetos se elimina mediante la inmersión de los portaobjetos en un tampón SSC2x de citrato de sodio y sometiéndolas a un lavado riguroso en SSC2x-NP40 a 73 °C durante 3 minutos en el caso de lesiones mamarias, tiroideas y neoplásicas relativas y lesiones pulmonares, cerebrales y neoplásicas relativas, cavidad oral y lesiones neoplásicas y preneoplásicas relativas. Las muestras se lavan luego en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y se deshidratan lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol (70 % - 85 % - 100 %) durante 2 minutos cada una.

Luego se secan al aire a temperatura ambiente.

El procedimiento se concluye mediante el montaje de la muestra con contratinción DAPI y montar el cubreobjetos.

## 25 **Ejemplo 2 - Procedimiento de FISH en muestras citológicas**

El cubreobjetos se retira de las muestras citológicas teñidas previamente.

Las muestras entonces se someten a 3 lavados xilol de 20 minutos cada uno.

Las secciones se secaron al aire a temperatura ambiente y se someten a 2 lavados sucesivos en etanol al 100 % durante 5 minutos cada uno, con agitación.

- 30 Los portaobjetos se sumergieron entonces en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y se incubaron en SSC2x a 73 °C durante 2 minutos.

A continuación, se realiza un tratamiento enzimático en HCl 0,01 N/pepsina 0,5 g a 37 °C durante 30 minutos.

Las muestras se incuban a continuación en una solución de formalina/MgCl<sub>2</sub> al 1 % tamponada neutra durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- 35 Las muestras se lavaron luego en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y se deshidrataron en concentraciones progresivamente mayores de alcohol (70 % - 85 % - 100 %) durante 2 minutos cada uno.

Luego se secan al aire a temperatura ambiente.

- 40 Una vez seco, adjunte a las secciones 3-5 µl de una mezcla de sondas específicas (Her2/CEP17; EGFR/CEP7; ALK - EML4; 1p36/1q25; 19q13/19p13) y luego agregue una alícuota del aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención, para ser precisos: **DO** para las muestras de mama y **MO** para las muestras de tiroides y pulmón.

Luego, vuelva a suspender en el portaobjetos la mezcla de sondas específicas con el aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención, ajuste el cubreobjetos y selle con Rubber Cement™.

Coloque los portaobjetos así preparados en la placa de hibridación TopBrite ajustada a los siguientes parámetros:

- 45 – Desnaturalización: 75 °C durante 15'  
– Hibridación: 37 °C durante 40'

Una vez que se ha completado la fase generalmente conocida como hibridación, se retira el cubreobjetos sumergiendo los portaobjetos en un tampón SSC2x de citrato de sodio y sometiéndolos a un lavado riguroso en SSC2x-NP40 a 73 °C durante 3 minutos en el caso de lesiones neoplásicas de mama, tiroides y relativas; 2 minutos en el caso de lesiones pulmonares, cerebrales y neoplásicas relativas. Las muestras se lavan luego en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y se deshidratan lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol (70 % - 85 % - 100 %) durante 2 minutos cada una.

Luego se secan al aire a temperatura ambiente.

El procedimiento se concluye mediante el montaje de la muestra con contratinción DAPI y montar el cubreobjetos.

**Ejemplo 3 - Procedimiento FISH para reprocesamiento (tanto para muestras histológicas y de bloque de células FFPE como para muestras citológicas).**

Esto se aplica al reprocesamiento de casos considerados como "estándar" debido a características de procesamiento histológico y/o preanalítico y/o al reprocesamiento de casos considerados como "difíciles" debido a características de procesamiento histológico y/o preanalítico y/o no concluyentes después de un diagnóstico inicial utilizando el procedimiento estándar y/o todo o parte del propuesto en la presente invención.

Retire el cubreobjetos sumergiendo las muestras en SSC2x<sup>1</sup> deshidráteles a temperatura ambiente durante 10 minutos, bajo agitación, lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol (70 % - 85 % - 100 %) durante 2 minutos cada una y secarlos al aire a temperatura ambiente.

<sup>1</sup>*Nota del traductor:* 'x' omitida en el original

Las secciones se sumergieron en 3 lavados sucesivos de xilol a temperatura ambiente durante 10 minutos cada uno, con agitación.

Las secciones se secan al aire a temperatura ambiente y se someten a 2 lavados sucesivos en etanol al 100 % durante 5 minutos cada uno, bajo agitación.

Las secciones se secan al aire a temperatura ambiente.

Una vez secas, las secciones se transfieren al tampón de citrato de sodio SSC2x, se calientan a una temperatura de 77 °C durante un tiempo variable, dependiendo de la causa del fallo del primer proceso (generalmente varía entre 30 segundos y 3 minutos).

Luego se transfieren al tampón SSC2x de citrato de sodio, en el que se ha disuelto una alícuota de 625 µl de Proteinasa K 20 mg/ml y que se calienta a 47 °C durante los siguientes tiempos: durante un tiempo variable dependiendo de la causa del fallo del primer proceso (generalmente varía entre 30 segundos y 3 minutos).

Las muestras se lavaron luego en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y deshidratado por lavado en concentraciones progresivamente mayores de alcohol (70 %, 85 %, 100 %) durante 2 minutos cada uno.

Luego se secan al aire a temperatura ambiente.

Una vez seco, se une a las secciones 3-5 µl de una mezcla de sondas específicas (Her2/CEP17; EGFR/CEP7; ALK - EML4; 1p36/1q25; 19q13/19p13; 3Q26, 8Q24, A-SAT CHR. 7) y luego agregue una alícuota del aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención, para ser precisos: **DOMO**.

Luego, vuelva a suspender en el portaobjetos la mezcla de sondas específicas con el aditivo adyuvante acelerador de acuerdo con la presente invención, coloque el cubreobjetos y selle con Rubber Cement™.

Coloque los portaobjetos así preparados en la placa de hibridación TopBrite ajustada a los siguientes parámetros:

- Desnaturalización: 75 °C durante 15'
- Hibridación: 37 °C durante 40'

Una vez que se ha completado la fase generalmente conocida como hibridación, se retira el cubreobjetos sumergiendo los portaobjetos en un tampón de citrato de sodio SSC2x y sometiéndolos a un lavado riguroso en SSC2x-NP40 a 73 °C durante 3 minutos en el caso de lesiones neoplásicas mamarias, tiroideas y relativas y lesiones neoplásicas pulmonares, cerebrales y relativas. Las muestras se lavan luego en SSC2x a temperatura ambiente durante 2 minutos y se deshidratan lavándolas en concentraciones progresivamente más altas de alcohol (70 % - 85 % - 100 %) durante 2 minutos cada una.

Luego se secan al aire a temperatura ambiente.

El procedimiento se concluye mediante el montaje de la muestra con contratinción DAPI y montar el cubreobjetos.

Las concentraciones en % de p/v y/o v/v de los componentes del aditivo adyuvante de aceleración de acuerdo con la presente invención en el portaobjetos son los siguientes:

5 Para 5 µl de mezcla de sonda molecular comercial (que contiene en promedio formamida al 40 % v/v, sulfato de dextrano al 10 % v/v, 25 % v/v de otros, 25 % v/v de H<sub>2</sub>O) se añaden 5 µl del aditivo adyuvante de aceleración llamado **DO** (compuesto así: carbonato de etileno al 28,57 %, sulfato de dextrano al 28,57 %, 28,57 % de H<sub>2</sub>O, SSC20x al 14,29 %), dando una mezcla final en el portaobjetos que contiene carbonato de etileno al 14 % v/v, sulfato de dextrano al 19 % v/v y 26,05 % v/v de H<sub>2</sub>O.

10 A 5 µl de mezcla comercial de sonda molecular (que contiene en promedio formamida al 40 % v/v, sulfato de dextrano al 10 % v/v, 25 % v/v de otros, 25 % v/v de H<sub>2</sub>O) se agregó 5 µl del aditivo adyuvante acelerador llamado **MO** (compuesto así: NaOH al 1,07 %, sulfato de dextrano al 49,46 %, 32,97 % de H<sub>2</sub>O, SSC20x al 16,48 %), dando una mezcla final en el portaobjetos que contiene: NaOH al 0,5 % v/v, dextrano de sulfato al 29,7 % y 28,9 % v/v de H<sub>2</sub>O.

15 A 5 µl de mezcla comercial de sonda molecular (que contiene en promedio formamida al 40 % v/v, sulfato de dextrano 10 % v/v, 25 % v/v de otros, 25 % v/v de H<sub>2</sub>O) se agregó 5 µl del aditivo adyuvante acelerador llamado **DOMO** (compuesto así: 0,43 % de NaOH, carbonato de etileno al 28,57 %, sulfato de dextrano al 28,57 %, 28,57 % de H<sub>2</sub>O, 13,86 % de SSC20x), dando una mezcla final en el portaobjetos que contiene: carbonato de etileno al 14 %, NaOH al 0,2 % v/v, sulfato de dextrano al 19 % v/v y 26,05 % v/v de H<sub>2</sub>O.

**"Puntuación" de las secciones de tejido**

Las muestras se han evaluado tanto desde un punto de vista cualitativo (intensidad de señal, porcentaje de núcleos con hibridación, ruido de fondo) como cuantitativo de acuerdo con las directrices para los diversos análisis:

20 Her-2: Wolff A. et al. (2013) 10,1200/JCO.2013.50.9984;  
1p-19q: Smith, JS, et al. (2000) J. Clin. Oncol 18, 635-645;

ALK: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™). Non-Small Cell Lung Cancer (Version 3.2011). © 2011 National Comprehensive Cancer Network, Inc. Available at: NCCN.org. Accessed [March 28, 2011].

25 3Q26, 8Q24, A-SAT CHR. 7: Riazimand S.H., Welkoborsky H.-J, Bernauer H.S, Jacob R, Mann W.J, Investigations for Fine Mapping of Amplifications in Chromosome 3q26.3.28 Frequently Occurring in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Oncology 2002;(63):385-392.

Estadísticas relacionadas con el pulmón.

FISH Estándar	FISH de acuerdo con la presente invención
NEG	NEG
POS	POS
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG

(continuación)

FISH Estándar	FISH de acuerdo con la presente invención
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
POS	POS
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
POS	POS
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG

Conjunto de datos (estadísticas relacionadas con el pulmón)	FISH Estándar	FISH de acuerdo con la presente
Tamaño de muestra	30	30
Media	4,9033	4,5267
Desviación estándar	5,4397	6,1784
<b><i>T</i></b>	<b>0,2506</b>	
<b>Grados de libertad</b>	<b>58</b>	
<b>P (nivel de significancia)</b>	<b>0,8030</b>	

ES 2 796 701 T3

Estadísticas relacionadas con la mama

Estándar		FISH		Estándar		FISH	
FISH		<i>De acuerdo con la presente invención</i>		FISH		<i>De acuerdo con la presente invención</i>	
ID	Interpretación de gen HER2	Interpretación de gen HER2	ID	Interpretación de gen HER2	Interpretación de HER2 gene		
1	N*	N	26	N	N		
2	N	N	27	N	N		
3	N	N	28	N	N		
4	A*	A	29	N	N		
5	A	A	30	N	N		
6	N	N	31	A	A		
7	N	N	32	N	N		
8	N	N	33	A	A		
9	N	N	34	A	A		
10	N	N	35	N	N		
11	N	N	36	N	N		
12	A	A	37	N	N		
13	N	A	38	N	N		
14	N	N	39	N	N		
15	N	N	40	N	N		
16	N	N	41	N	N		
17	N	N	42	N	N		
18	N	N	43	N	N		
19	N	N	44	N	N		
20	N	N	45	N	N		
21	N	N	46	N	N		
22	N	N	47	N	N		
23	A	N	48	N	N		
24	N	N	49	N	N		
25	N	N	50	N	N		



ES 2 796 701 T3

(continuación)

Estándar		FISH		Estándar		FISH	
FISH		<i>De acuerdo con la presente invención</i>		FISH		<i>De acuerdo con la presente invención</i>	
ID	Interpretación de gen HER2	ID	Interpretación de gen HER2	ID	Interpretación de gen HER2	ID	Interpretación de HER2 gene
		51	N		N		N
		52	N		N		N
		53	N		N		N
		54	N		N		N
		55	N		N		N
		56	A		A		A
		57	N		N		N
		58	N		N		N
		59	A		A		A

**\*N:** Indica el caso en que no tiene amplificación del gen HER2

**\*A:** Indica el caso en que no tiene amplificación

FISH	FISH Estándar	IQFISH*
De acuerdo con la presente invención		
157-165 min	2 días	210 min
(40 min de hibridación)	(12-20 horas de hibridación)	(60-120 min de hibridación)
Concordancia		
FISH de acuerdo con la presente invención 98 %	95 %	
Vs	(intervalo 96.8-99.1 %)(intervalo 92-99)*	
Standard FISH		
<b>Estadísticas que se relacionan con la mama</b> * Datos de Her2 IQFISH pharmDx™ Cod K5731 Segunda edición, Dako Denmark, páginas 21-22		

Las siguientes tablas contienen datos sobre el procesamiento de imágenes de microscopio que muestran la comparación entre los diámetros de las señales en un muestreo de cada sonda probada.

**Mediciones de diámetro de señal – Agotamiento 1p de cerebro**

Núcleo	Método de acuerdo con la presente invención		Método estándar		
	Rojo	Verde	Rojo	Verde	
1	10	5,4	9,2	5,7	Mediciones en pixeles hechas en imagen jpg, 1376x1024 utilizando software GIMP 2.8
2	10	4	8,2	5,8	
3	10	5,8	8,5	9,1	
4	8	4	7,8	9	
5	13	7,3	7,9	8,1	
6	8	6,4	10,8	4	
7	8,9	8,6	10,4	6,3	
8	10	6,4	7,8	6,2	
9	13	7,1	8,1	5,7	
10	12,2	10,6	11	5,4	
Media	10,31	6,56	8,97	6,53	
	<b>rojo vs. rojo</b>	<b>verde vs. verde</b>			
t	1,8721	0,036343			
Grados de libertad	18	18			
P (nivel de significancia)	0,07753305	0,971409			
Diferencia entre los medios observados	No significativo para $p < 0,01$				

**Mediciones de diámetro de señal – Agotamiento 19q de cerebro**

Núcleo	Método de acuerdo con la presente invención		Método estándar		
	Rojo	Verde	Rojo	Verde	
1	7,2	5,1	8,5	7,6	Mediciones en pixeles hechas en imagen jpg, 1376x1024 utilizando software GIMP 2.8
2	5	6,8	8,9	8,5	
3	5,8	6,7	4,2	7,2	
4	6,3	5,7	4,1	4	
5	5	5	5,8	4,5	

(continuación)

**Mediciones de diámetro de señal – Agotamiento 19q de cerebro**

	Método de acuerdo con la presente invención		Método estándar	
	6	4,5	5,8	6,7
7	5,4	8	9	5,7
8	7,2	5	5,1	4,1
9	7	7	7	10
10	7,1	4,1	7,3	8,1
Media	6,05	5,92	6,66	6,39
	<b>rojo vs. rojo</b>	<b>verde vs. verde</b>		
t	0,9151	0,601527		
Grados de libertad	18	18		
P (nivel de significancia)	0,372223	0,55499		
Diferencia entre los medios observados	No significativo para $p < 0,01$			

**Mediciones de diámetro de señal – Pulmón Alk**

Núcleo	Método de acuerdo con la presente invención		Método estándar	
	Rojo	Verde	Rojo	Verde
1	8,6	7,3	10,4	7
2	8,5	6	9,4	6,5
3	6,2	7,6	8,1	6
4	9,1	5,1	7,1	7,4
5	9,2	7	8,2	8,1
6	7,8	6	7	5
7	7,8	8,1	6,3	7
8	11	7,1	8,2	6
9	7	8	5,8	5,1
10	7,8	5,1	6,4	8,5
Media	8,3	6,73	7,69	6,66

Mediciones en pixeles hechas en imagen jpg, 1376x1024 utilizando software GIMP 2.8

(continuación)

**Mediciones de diámetro de señal – Pulmón Alk**

	Método de acuerdo con la presente invención		Método estándar	
	<b>rojo vs. rojo</b>	<b>verde vs. verde</b>		
	t	0,982835	0,1370	
Grados de libertad	18	18		
P (nivel de significancia)	0,3387159	0,892526		
Diferencia entre los medios observados	No significativo para $p < 0,01$			

**Mediciones de diámetro de señal – Her2 de mama**

	Método de acuerdo con la presente invención		Método estándar Her2		
	Rojo	Verde	Rojo	Verde	
Núcleo					
1	10,3	14	10,2	10,3	Mediciones en pixeles hechas en imagen jpg, 1376x1024 utilizando software GIMP 2.8
2	11,7	12	6,03	12,4	
3	7,6	15	4,1	15,2	
4	12	11	10	17	
5	10,6	14	10,8	8	
6	12,4	18,4	10,8	9,1	
7	12,4	12,4	6,4	10,8	
8	9,2	12	7,6	15,3	
9	12,3	15,5	13,6	12,2	
10	12,3	11,4	10,3	9,1	
Media	11,08	13,57	8,983	11,94	
	<b>rojo vs. rojo</b>	<b>verde vs. verde</b>			
t	2,0148	1,353512			
Grados de libertad	18	18			
P (nivel de significancia)	0,05911328	0,192646			
Diferencia entre los medios observados	No significativo para $p < 0,01$				

ES 2 796 701 T3

Estadística del carcinoma de la cavidad oral TERC 3Q26 (Gracias al método rápido, es posible hibridar eficientemente obteniendo datos sorprendentes sobre los tejidos de la cavidad oral).

DISPLASIA	FISH RÁPIDA	FISH STD
Ligera	<b>POS</b>	FALLIDA
Ligera-Moderada	<b>NEG</b>	FALLIDA
Ligera	<b>POS</b>	FALLIDA
Ligera	<b>POS</b>	FALLIDA
No	<b>POS</b>	FALLIDA
Ligera	<b>POS</b>	FALLIDA
Moderada	<b>POS</b>	FALLIDA
Moderada	<b>POS</b>	FALLIDA
Moderada	<b>POS</b>	FALLIDA
No	<b>POS</b>	FALLIDA
Ligera	<b>POS</b>	FALLIDA
No	<b>POS</b>	FALLIDA
No	<b>POS</b>	FALLIDA
No	<b>NEG</b>	FALLIDA
No	<b>NEG</b>	FALLIDA
Ligera (SIL de bajo grado)	<b>NEG</b>	FALLIDA
Ligera	<b>NEG</b>	FALLIDA
Ligera	<b>NEG</b>	FALLIDA
No	<b>NEG</b>	FALLIDA
No	<b>NEG</b>	FALLIDA
CA Microinvasivo	<b>POS</b>	FALLIDA
No	<b>NEG</b>	FALLIDA
No	<b>NO ENSAYADA</b>	FALLIDA
Ligera	<b>NO ENSAYADA</b>	FALLIDA
No	<b>NO ENSAYADA</b>	FALLIDA
No	<b>POS</b>	FALLIDA
Ligera	<b>POS</b>	FALLIDA

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de hibridación de sondas moleculares que comprende el uso de un aditivo acelerador que comprende:
- a. una solución acuosa de sulfato de dextrano sódico,
  - 5 b. una sal,
  - c. un sistema tampón de citrato de sodio salino (SSC),
  - d. una base mineral fuerte opcionalmente mezclada con al menos un solvente aprótico polar;
- con la condición de que dicho aditivo no contenga formamida, ácidos nucleicos, agentes quelantes que no sean citrato de sodio salino (SSC) o agentes bloqueantes.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el aditivo es mezclado con la sonda molecular.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por las siguientes etapas:
- a. unir una sonda molecular en una muestra preparada previamente;
  - b. agregar posteriormente el aditivo acelerador a la muestra;
  - 15 c. mezclar la sonda molecular con el aditivo acelerador directamente sobre la muestra.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 -3 en el que dicha hibridación es in situ.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha hibridación es elegida del grupo que consiste en FISH, CISH y SISH.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la desparafinación es realizada en caliente.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la determinación de la constitución genética de Her2 en cáncer de mama y gástrico para asignar una terapia dirigida.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la determinación de la reordenación de ALK en particular en cáncer de pulmón y tiroides para asignar una terapia dirigida.
- 25 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la determinación de un potencial gen y alteración cromosómica para su uso diagnóstico.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 para su uso en la evaluación de eliminaciones cromosómicas 1p36 y 19q13 como factores pronósticos, particularmente en neoplasias gliales.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la evaluación de la ganancia del gen TERC (3q26) como marcador de diagnóstico/pronóstico en las lesiones potencialmente malignas de la cavidad oral (OPML).
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el reprocesamiento de muestras sometidas a hibridación, particularmente hibridación in situ.

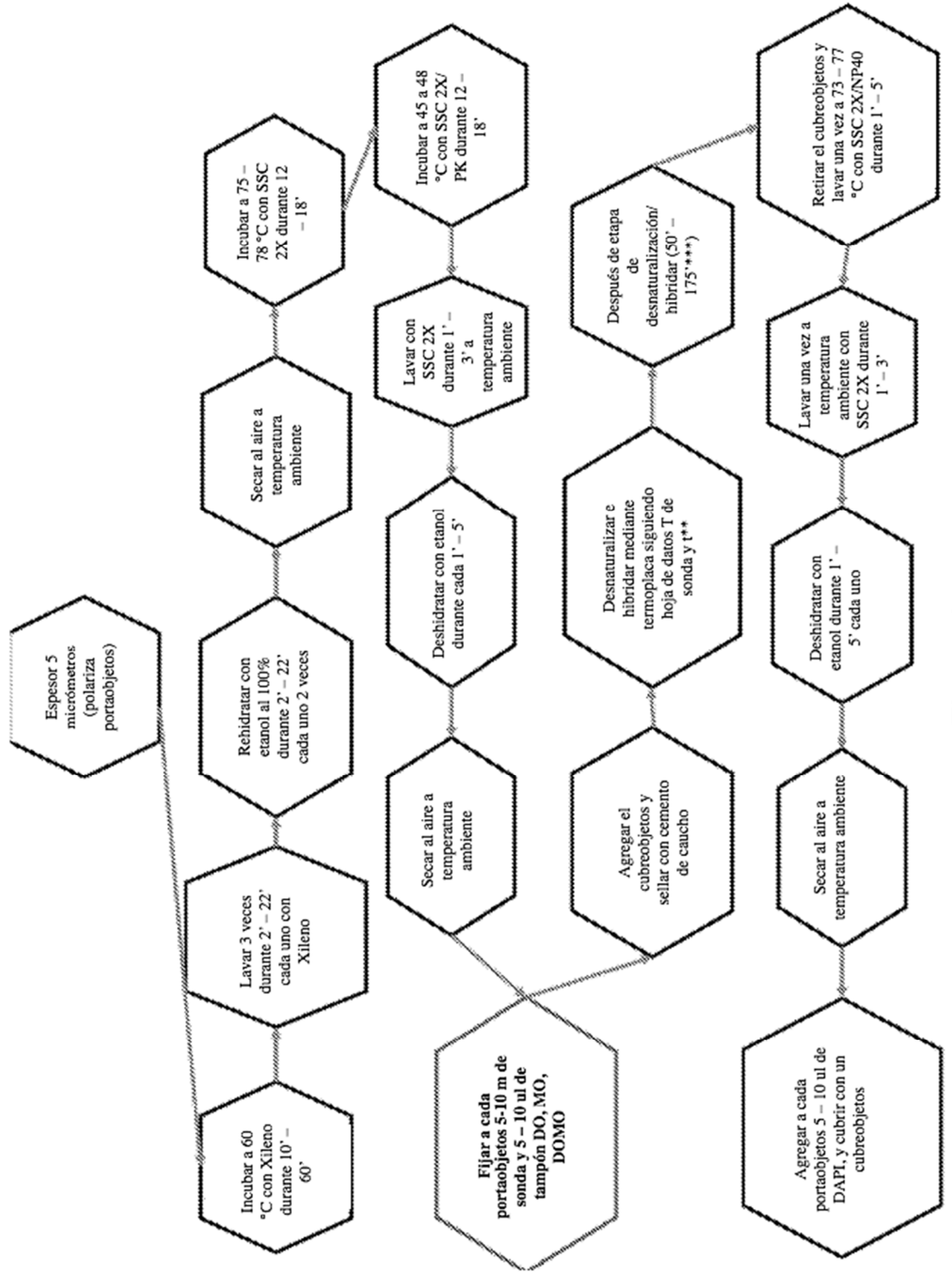


Figura 1