



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 259**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99947589 .0**

86 Fecha de presentación : **15.10.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1121461**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2001**

54 Título: **Sondas fluorescentes de pintura cromosómica.**

30 Prioridad: **15.10.1998 FR 98 12957**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Serono Genetics Institute S.A.**
route Nationale 7
91030 Evry Cédex, FR

72 Inventor/es: **Cherif, Dorra**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Sondas fluorescentes de pintura cromosómica.

5 La presente invención se refiere al pintado cromosómico y más particularmente a las sondas fluorescentes que pueden ser usadas en métodos tales como el método FISH ("Hibridación *in situ* con ondas fluorescentes"). También se describen combinaciones de fluoróforos y de filtros ópticos.

10 La hibridación *in situ* es una técnica que hace posible detectar una secuencia de ADN (o ARN) mediante una sonda que tiene una secuencia específica que es homóloga a la estudiada. Está basada en la complementariedad de los nucleótidos (A/T, A/U, G/C) y puede ser llevada a cabo en precisas condiciones fisicoquímicas en preparaciones de tejido o cromosomas. El resultado del procedimiento de hibridación *in situ* es la formación de un híbrido entre una sonda y una molécula objetivo. La hibridación *in situ* incluye una etapa de desnaturalización y también una etapa de detección del híbrido o de la sonda que es llevada a cabo después de la hibridación *in situ* de la sonda a la molécula objetivo. La muestra puede adherirse en forma de una capa a la superficie del portaobjetos y esta muestra, por ejemplo, puede comprender o contener cromosomas individuales o regiones cromosómicas que han sido tratadas para mantener sus morfologías en condiciones desnaturalizantes. En el contexto de la hibridación *in situ* con ondas fluorescentes, las sondas son marcadas con un fluoróforo y la hibridación es detectada por el marcado fluorescente.

20 El reciente desarrollo de esta técnica permite la visualización simultánea, en la misma preparación, de varias sondas cada una detectada por un fluoróforo diferente. Esta técnica, llamada FISH multi-color o multi-FISH, ha sido posible gracias a la combinación de filtros específicos para las longitudes de onda de emisión de las diferentes moléculas fluorescentes que aseguran el marcado con la ayuda de una imagimática computerizada llevada a cabo mediante cámaras CCD en frío de alta resolución sensibles al infrarrojo (Schröck *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996).

25 El uso de sondas que tienen una secuencia específica homóloga a una precisa secuencia cromosómica o a un cromosoma entero acoplado con el potencial para un marcado fluorescente multi-color hace posible desarrollar las denominadas técnicas de pintado cromosómicas, es decir, obtener cromosomas de colores diferentes y así obtener, de ser deseado, un cariotipo completo multi-color. El cariotipo se sobrentiende que significa la disposición característica de los cromosomas de una célula en la metafase.

30 Dentro del significado general del término, se sobrentiende que "marcado" significa una entidad tal como un isótopo radiactivo o una entidad no isotópica tales como enzimas, biotina, avidina, estreptavidina, digoxigenina, agentes luminiscentes, tintes, haptenos y otros similares. Los agentes luminiscentes, dependiendo de la fuente de energía de excitación, pueden ser clasificados en agentes radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fotoluminiscentes (incluyendo fluorescentes y fosforescentes). El término "fluorescente" se refiere en general a la propiedad de una sustancia (tal como un fluoróforo) para producir luz cuando se excita mediante una fuente de energía tal como la luz ultravioleta, por ejemplo.

40 "Sonda de pintado cromosómico" se sobrentiende que significa una sonda o una composición de sondas tal como la composición de sondas de esta invención, que es adecuada para hibridarse, en condiciones de hibridación, con una molécula objetivo que comprende un cromosoma predeterminado de un genoma multicromosómico. Si sólo una fracción de tal cromosoma está presente en la muestra que se somete a tal hibridación con tal composición de sonda, entonces esta fracción se hibrida y se identifica. En la práctica, una sonda de pintado de esta invención puede ser mezclada con una segunda, tercera, y etc., para permitir el marcado y la detección simultánea de dos, tres, y etc., cromosomas predeterminados.

50 La visualización de todos los 24 cromosomas humanos ha sido posible por el uso de un marcado con una combinación de fluorocromos. Por ejemplo, en el caso del uso de 5 fluoróforos diferentes, pueden ser obtenidas 31 combinaciones de fluoróforos. Usando este principio de marcado y 24 sondas de ADN específicas para cada uno de los cromosomas humanos, ha sido posible visualizar cada cromosoma diferencialmente. La atribución, por procesamiento informático, de colores artificiales a cada una de las combinaciones de fluoróforos hace así posible colorear los 24 cromosomas humanos de manera diferente.

55 Brevemente, los fuertes potenciales de tal marcado multicolor han permitido el análisis de aberraciones cromosómicas que hubieran sido difíciles de detectar en la actualidad por las técnicas citogenéticas convencionales para el marcado de cromosomas en bandas (Summer *et al.*, 1971; Dutrillaux y Lejeune, 1971) (teñido Giemsa, marcación con BrdU, y etc.). El principio del marcado de cromosomas en bandas está basado en las diferencias de la composición de los pares de bases promedio (riqueza en GC) entre las bandas y en las diferencias de la compactación de la cromatina entre las bandas de cromosomas. El pintado cromosómico ha demostrado que es una herramienta muy útil para detectar aberraciones intercromosómicas tales como desplazamientos, secuencias de ADN amplificadas tales como regiones homogéneamente teñidas llamadas HSR (Regiones Homogéneamente Teñidas) o los excesos de materiales cromosómicos tales como los cromosomas marcadores o cromosomas doble minuto. Las aberraciones intracromosómicas tales como deleciones y duplicaciones sólo serán detectadas como una función del tamaño de las aberraciones, si las aberraciones afectan a la longitud de los cromosomas, mientras que las inversiones cromosómicas no serán detectables en absoluto por este método.

Los límites del uso del cariotipado espectral actual como tal son debidos al hecho de que no posibilitan la detección de la naturaleza de las bandas del cromosoma implicadas en una redistribución inter- o intra-cromosómica. Para hacer esto, es esencial acoplar esta técnica a una más convencionalmente usada para bandas cromosómicas (marcado de R o G) tal como tinción con DAPI, tinción de Giemsa o yoduro de propidio, por ejemplo.

La necesidad de combinar técnicas diferentes constituye por supuesto una dificultad en el análisis de aberraciones cromosómicas y, además, el uso del método FISH o multiFISH que combina el alto coste del aparato y la instrumentación necesaria para la visualización del pintado cromosómico con el alto coste de las sondas específicas para los cromosomas restringe las posibilidades de esta técnica para extenderse en laboratorios de investigación o laboratorios diagnósticos.

Las sondas de pintura actualmente disponibles en el mercado (GIBCO-BRL, Oncor, Boehringer Mannheim y similares) son obtenidas por amplificación DOP-PCR usando cebadores de PCR degenerados para cromosomas o para fragmentos de cromosomas aislados por técnicas incómodas tales como la clasificación de cromosomas por citometría de flujo o la microdissección de cromosomas. La hibridación de sondas obtenidas por DOP-PCR no genera bandas cromosómicas basadas en los cromosomas. La generación de bandas cromosómicas fue buscada por la creación de bandas artificiales a lo largo de los cromosomas. Esta creación de bandas artificiales requiere el uso de técnicas incómodas y caras. Además, causa bandas que no son marcas de referencia conocidas en el campo de la citogenética.

Otros autores han descrito el uso de sondas de pintado cromosómico obtenidas por amplificación de cromosomas por IRS-PCR (secuencias repetidas internas) usando cebadores específicos para las secuencias de ADN que están repetidas y dispersadas en el genoma, tales como las secuencias LINE y Alu. Lengauer *et al.*, 1990 han propuesto el uso separado de cebadores de PCR de LINE y Alu para obtener sondas de pintado cromosómico. Lichter *et al.*, 1990 antes habían propuesto el uso combinado de cebadores de PCR de LINE y Alu para la amplificación de cromosomas humanos mediante ISR-PCR. Sin embargo, el marcado en las bandas R que fue obtenido por estos autores no hace posible asegurar un pintado completo que cubra todas las regiones del genoma, en particular las regiones teloméricas y ciertas bandas cromosómicas de G.

El objeto de la presente invención es proporcionar mezclas de sondas cromosómicas que pueden ser obtenidas económicamente y, además, con las que es posible proporcionar bandas cromosómicas de calidad para que aparezcan directamente en cromosomas pintados en su totalidad.

Para hacer esto, la presente invención se refiere a mezclas de sondas requeridas para el marcado de un cromosoma, caracterizado porque están compuestas de un grupo de segmentos de ADN que son mejor representados en ciertas bandas cromosómicas y que son obtenidos por la amplificación de IRS-PCR a partir de dichos cromosomas con la ayuda de cebadores específicos para las secuencias de ADN de Alu y LINE.

El término “sonda” se refiere a un polinucleótido o una mezcla de polinucleótidos tal que los segmentos de ADN o las secuencias de ADN son combinadas químicamente con entidades marcadas individuales. Cada uno de los polinucleótidos que constituyen una sonda está característicamente en forma monocatenaria en el momento de la hibridación a la molécula objetivo.

Las expresiones “fragmento de ADN” y “segmento de ADN” generalmente indican sólo una parte del polinucleótido o de una secuencia presente en un cromosoma o una parte de un cromosoma. Un polinucleótido, por ejemplo, puede ser cortado o fragmentado en una multitud de segmentos o de fragmentos. Un cromosoma contiene característicamente regiones que tienen secuencias de ADN que contienen segmentos de ADN repetidos. El término “repetido” se refiere al hecho de que un segmento de ADN particular esté presente muchas veces (al menos dos veces), dispersado o de otra forma en el genoma. El método denominado IRS-PCR usa cebadores que se hibridan con las secuencias repetidas dispersadas del genoma, tales como, por ejemplo, las secuencias Alu o LINE.

“Genoma” designa la copia completa y única de las instrucciones genéticas de un organismo codificado por el ADN de este organismo. En la presente invención, el genoma particular considerado es multicromosómico tal que el ADN está distribuido en la célula entre varios cromosomas individuales. El genoma humano está compuesto de 23 pares de cromosomas, de los cuales un par XX o XY determinan el sexo.

El término “cromosoma” se refiere al soporte para los genes que llevan la herencia en una célula viva que se deriva de la cromatina y que comprende el ADN y los componentes proteicos (esencialmente las histonas). El sistema internacional convencional para identificar y enumerar los cromosomas del genoma humano es el usado en este documento. El tamaño de un cromosoma individual puede variar dentro de un genoma multicromosómico y de un genoma a otro. En este caso del genoma humano, la longitud total de ADN de un cromosoma dado es generalmente mayor que 50.000.000 bp. Por vía de la comparación, la longitud total del genoma humano es 3×10^9 bp.

El genoma de mamíferos contiene secuencias de ADN repetidas dispersadas por todo el genoma. En los seres humanos, la mayoría de este tipo de secuencias es representada por diferentes familias de secuencias Alu, que tienen aproximadamente 10^6 en número y que tiene en común una secuencia consenso de 300 bp. Las secuencias LINE repetidas (o L1) están, como las secuencias Alu, ampliamente distribuidas en todo el genoma. Son, sin embargo, menos numerosas (aproximadamente 10^4). Sus secuencias consensos tienen aproximadamente 6 kb. Preferiblemente

están situadas en las bandas G oscuras (G positiva o R negativa), mientras que las secuencias Alu están en cambio situadas en las bandas R oscuras (R positiva) (Korenberg y Kirowski, 1988).

Los segmentos de ADN amplificados por IRS-PCR de acuerdo con la invención pueden tener como su fuentes híbridos somáticos, preferiblemente híbridos somáticos roedor-humano, cromosomas o fragmentos de cromosomas. Los cromosomas o los fragmentos de cromosomas pueden ser obtenidos por clasificación de cromosomas mediante citometría de flujo o por microdissección de cromosomas. Dentro del marco de la realización preferida de la presente invención, los segmentos de ADN amplificados por IRS-PCR tienen como su fuente híbridos somáticos de roedor-humano monocromosómicos.

Los segmentos de ADN amplificados por IRS-PCR de acuerdo con la invención están mejor representados en un tipo de banda citogenética. Las bandas citogenéticas preferidas son las bandas G o las bandas R. En la realización preferida de la presente invención, los segmentos de ADN amplificados por IRS-PCR están mejor representados en las bandas R.

También son encontradas en el genoma de roedores secuencias repetidas, análogas a las secuencias humanas repetidas. Sin embargo, la divergencia de este tipo de secuencias entre los seres humanos y los roedores es suficientemente importante para que haya poca homología entre ellos. Esta divergencia permite una amplificación selectiva de los segmentos de ADN contenidos en el cromosoma humano cuando son usados híbridos humano-roedor. Así, comenzando con el ADN de un híbrido somático humano-roedor y usando los cebadores específicos para la secuencia Alu y/o consenso L1, es posible amplificar por PCR selectivamente las secuencias de ADN entre dos secuencias repetidas (en la orientación "cabeza a cola") separadas por una distancia < 5 kb. El producto de amplificación así obtenido consiste en un grupo de fragmentos (cuyo tamaño varía de aproximadamente 100 bp a 5 kb) lo que es representativo de prácticamente el cromosoma humano entero contenido en el ADN del híbrido somático.

En general, la presente invención se refiere por supuesto más particularmente a producir mezclas de sondas específicas para cromosomas humanos, aunque sea posible proveer pintados cromosómicos para otros tipos de células (Sabile *et al.*, 1997).

Las mezclas de las sondas de la presente invención se caracterizan porque las sondas se derivan a partir de una mezcla de dos productos de amplificación de IRS-PCR que está compuesta, por una parte, de un:

- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para las secuencias de ADN Alu, y, por otra parte, de un:
- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para las secuencias de ADN Alu y el cebador específico para las secuencias de ADN LINE.

La presente invención se refiere a un método para producir mezclas de sondas requeridas para marcar cromosomas humanos, caracterizado porque dicho método comprende la mezcla de dos productos de amplificación obtenidos por dos amplificaciones de IRS-PCR a partir de dichos cromosomas usando, por un lado, cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu y LINE, y, por otra parte, cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu.

Cualquier cebador específico para las secuencias Alu o LINE puede ser usado en la presente invención. Preferiblemente, los cebadores específicos para las secuencias de ADN Alu consisten en el cebador SR1 cuya secuencia se describe en SEQ ID NO. 1 y el cebador específico para la secuencia de ADN LINE es preferiblemente el cebador LIH, cuya secuencia se describe en SEQ ID NOs. 2 y 3.

De forma alternativa, las mezclas de sondas de acuerdo con la presente invención también pueden ser derivadas a partir de una mezcla de dos productos de amplificación de IRS-PCR que está compuesta, por una parte, de un:

- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para las secuencias de ADN LINE, y, por otra parte, de un:
- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para las secuencias de ADN Alu y el cebador específico para las secuencias de ADN LINE.

La presente invención también se refiere a un método para producir mezclas de sondas requeridas para marcar cromosomas humanos, caracterizado porque dicho método comprende la mezcla de dos productos de amplificación obtenidos por dos amplificaciones de IRS-PCR a partir de dichos cromosomas usando, por un lado, cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu y LINE, y, por otra parte, cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN LINE.

El uso de fluoróforos y de filtros, cuya combinación hace posible asegurar el pintado cromosómico que proporciona cariotipos muy legibles, es decir obtener colores de pintado cromosómico bien definidos y contrastados, también se describe.

Así, las sondas de ADN descritas anteriormente se marcan directamente o indirectamente por técnicas de fluorescencia. Aunque no exhaustivamente, los fluoróforos usados para el marcado pueden ser escogidos a partir de marcadores del tipo cianina, rodamina, fluoresceína, Bobipy, Rojo Texas, Oregon Verde, Azul Cascada. En particular, todos los fluoróforos citados en el manual "Handbook of fluorescent probes and research chemicals" (Richard P Haugland, 1996, Molecular Probes, MTZ Spence ed., más particularmente págs. 145-146, 153, 155-156, 157-158, 161) pueden ser usados para marcar las sondas de la presente invención.

Preferiblemente, las sondas de acuerdo con la invención se marcan con al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 fluoróforos escogidos a partir del grupo siguiente: isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5), cianina 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

El método preferido para marcar las sondas de ADN es la "translación de mellas". Sin embargo, el marcado también puede ser llevado a cabo por todas las reacciones estándar para la síntesis de ADN catalizado por una polimerasa y para marcar oligonucleótidos. Por ejemplo, el marcado puede ser llevado a cabo por técnicas de cebado aleatorio, de amplificación o extensión del cebador *in situ*.

La expresión "sonda directamente marcada" designa o describe una sonda de ácido nucleico cuyo marcado después de la formación del híbrido con la molécula objetivo es detectable sin tratamiento con reactivo subsecuente del híbrido. Las sondas se marcan directamente usando los fluoróforos FITC, Rojo Texas, Cy3 y Cy5 de acuerdo con la presente invención.

La expresión "sonda marcada indirectamente" designa o describe una sonda de ácido nucleico cuyo marcado después de la formación del híbrido con la molécula objetivo debe sufrir un tratamiento con reactivo adicional con uno o varios reactivos para combinar con esto una o varias entidades a partir de la cual resulta finalmente un compuesto detectable. Por ejemplo, se pueden marcar las sondas mediante DNP, digoxigenina o biotina y su detección comprende poner la sonda en contacto con un anticuerpo anti-DNP o antidigoxigenina marcado por un fluoróforo o con una avidina acoplada a un fluoróforo. Las sondas que usan los fluoróforos Cy7, Bodipy 630/650, Cy5.5. de acuerdo con la presente invención son marcadas indirectamente.

Preferiblemente, la composición de la sonda de la presente invención comprende el número más grande posible de sondas "directamente marcadas". Además del hecho de que las sondas directamente marcadas sean más fáciles de usar, éstas permiten una mejor resolución. Esta buena resolución es importante para una buena observación de las bandas cromosómicas. Preferiblemente, la composición de la sonda de la presente invención es del tipo "marcado directo" para todos los fluoróforos. Una composición de sonda preferida de la presente invención es del tipo "marcado directo" para 4 de los 5 fluoróforos usados. En otra composición preferida, las sondas marcadas directamente representan 3 sondas de 5 ó 6 fluoróforos usados.

La presente invención también se refiere a un grupo de mezclas de sondas requeridas para marcar cromosomas humanos, caracterizado porque contiene mezclas de sondas de acuerdo con la presente invención para cada uno de los cromosomas humanos y para un cierto número de ellos. Este grupo de mezclas de sondas hará posible analizar en una sola operación un cariotipo completo para detectarlo *in situ* e identificar posibles aberraciones cromosómicas *in situ* como se describe anteriormente.

La presente invención también se refiere a un método de FISH multi-color requerido para estudiar el cariotipo, caracterizado porque las sondas de ADN se marcan con fluoróforos y porque cada fluoróforo que tiene una longitud de onda de absorción y emisión específica se combina con un par de filtros ópticos, uno para la absorción y otro para la emisión.

Los fluoróforos son escogidos tal que el solapamiento de los espectros de absorción y emisión entre los diferentes fluoróforos sea el mínimo. Más particularmente, es importante que no haya ningún solapamiento entre el máximo de absorción y emisión de los diferentes fluoróforos.

Cada fluoróforo se usa con un par de filtros ópticos; uno para la absorción y otro para la emisión. Los filtros hacen posible seleccionar los anchos de banda tal que las longitudes de onda correspondientes a un solapamiento con otro fluoróforo sean eliminadas. En consecuencia, los filtros usados en la presente invención son preferiblemente del tipo de filtro óptico con ancho de banda estrecha. Los filtros son preferiblemente de una calidad superior porque es importante que el filtro no deje pasar la luz fuera del ancho de banda.

Preferiblemente, la presente invención también se refiere a un método de FISH multi-color requerido, en particular, para estudiar el cariotipo, caracterizado porque las sondas de ADN de acuerdo con la presente invención se marcan por fluoróforos y porque cada fluoróforo que tiene una longitud de onda de absorción y emisión específica es combinada con un par de filtros ópticos, uno para la absorción y otro para la emisión, usando dicho método fluoróforos y pares de filtros escogidos a partir del grupo siguiente:

- a) el fluoróforo FITC que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 494 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 517 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 490DF30 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 530DF30 (Omega Optical),

ES 2 299 259 T3

- b) el fluoróforo Cy3 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 554 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 568 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 546DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 570DF10 (Omega Optical),
- c) el fluoróforo TR que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 593 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 613 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 590DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 615DF10 (Omega Optical),
- d) el fluoróforo Cy5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 652 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 670 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 650DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 670DF10 (Omega Optical),
- e) el fluoróforo Cy7 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 743 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 767 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 740DF25 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 780EFLP (Omega Optical),
- f) el fluoróforo Cy5.5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 675 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 694 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 680DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 700EFLP (Omega Optical),
- g) el fluoróforo Bodipy 630/650 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 632 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 658 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 630DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 650DF10 (Omega Optical).

La invención también se refiere a un kit diagnóstico FISH multi-color caracterizado porque comprende mezclas de sondas de ADN de acuerdo con la presente invención marcadas por fluoróforos y porque cada fluoróforo que tiene una longitud de onda específica de absorción y emisión se asocia con un par de filtros ópticos, uno para la absorción y otro para la emisión, usando dicho kit fluoróforos y pares de filtros escogidos a partir del grupo siguiente:

- a) el fluoróforo FITC que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 494 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 517 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 490DF30 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 530DF30 (Omega Optical),
- b) el fluoróforo Cy3 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 554 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 568 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 546DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 570DF10 (Omega Optical),
- c) el fluoróforo TR que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 593 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 613 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 590DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 615DF10 (Omega Optical),
- d) el fluoróforo Cy5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 652 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 670 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 650DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 670DF10 (Omega Optical),
- e) el fluoróforo Cy7 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 743 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 767 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 740DF25 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 780EFLP (Omega Optical),
- f) el fluoróforo Cy5.5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 675 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 694 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 680DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 700EFLP (Omega Optical),
- g) el fluoróforo Bodipy 630/650 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 632 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 658 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 630DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 650DF10 (Omega Optical).

Los filtros de acuerdo con la presente invención son preferiblemente tal que:

- son del tipo de 6 cavidades,
- tienen un ADI de 0°;
- tienen una tolerancia $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- tienen una tolerancia en FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,

ES 2 299 259 T3

- tienen un OD5 de rechazo fuera del ancho de banda para UV a 1200 nm,
- tienen una T de la curva de transmisión $\geq 50\%$ en λ_0 .

Preferiblemente, los filtros también deben tener un diámetro útil centrado mayor que 21 mm, y un espesor ≤ 7 mm.

Los fluoróforos y los filtros anteriores pueden ser usados para el marcado de las sondas de acuerdo con la presente invención o de forma alternativa para diferentes sondas usadas, por ejemplo, para el pintado cromosómico o para el FISH multi-color.

En la presente invención, “filtros” se sobrentiende que significa filtros de interferencia de ancho de banda estrecha que transmiten la luz dentro de una banda espectral dada muy estrecha centrada alrededor de la longitud de onda de referencia λ_0 . Se caracterizan por su curva de transmisión: $T=f(\lambda)$. El ancho de la banda es definido por el ancho completo a la mitad de la transmisión máxima (FWHM).

Fuera del ancho de banda, el filtro permite pasar una señal residual que está idealmente tan atenuada como sea posible.

Los filtros de interferencia funcionan según el principio de interferencia constructiva y destructiva. Se llama al componente básico de un filtro de interferencia la cavidad. Éste tiene dos grupos de reflectores separados por una capa de un sólido dieléctrico. Cuanto más alto sea el número de cavidades, más rectangular será la forma de la curva de transmisión (es decir, mayor la pendiente de esta curva). Además, cuanto más alto sea el número de cavidades, mejor será el coeficiente de atenuación fuera del ancho de banda.

Para la aplicación de multifuorescencia, los espectros de excitación o emisión de los fluorocromos usados están muy cerca entre sí. Es, por lo tanto, necesario recuperar la cantidad mínima de señal posible fuera del ancho de banda. Fueron escogidos en consecuencia filtros de 6 cavidades, que ofrecen las mejores características en este nivel.

Los filtros usados tienen preferiblemente los siguientes datos específicos:

- están diseñados para ser usados en una incidencia de luz normal,
- la tolerancia en la longitud de onda del centro (λ_0) es $\pm 20\%$ del ancho de banda, por ejemplo, para un filtro con un ancho de banda de 10 nm, λ_0 será definida con una tolerancia de ± 2 nm,
- la tolerancia en el paso del ancho de banda es $\pm 20\%$,
- el coeficiente de transmisión T de estos filtros es mayor que el 50%,
- el rechazo fuera del ancho de banda de estos filtros es 5OD para ultravioleta a 1200 nm; esto significa que fuera del ancho de banda, el coeficiente de transmisión es 10^{-5} , es decir 0,001%. Para filtros estándar, el rechazo fuera del ancho de banda es asegurado para longitudes de onda en el intervalo de $0,8 \lambda_0$ a $1,2 \lambda_0$; por ejemplo, para un filtro de $\lambda_0 = 620$ nm, el rechazo fuera del ancho de banda ocurre sólo entre 500 y 740 nm. Sin embargo, para la aplicación de multifuorescencia, se observan fluorocromos cuyos espectros están en el intervalo de 350 a 800 nm. En consecuencia, fueron usados filtros cuyo rechazo fuera del ancho de banda estaba asegurado para ultravioleta a 1200 nm.

También se describe un kit de marcado caracterizado porque comprende al menos las mezclas de sondas de ADN que se describen anteriormente o un grupo de mezclas de sondas como se menciona anteriormente.

La presente invención se refiere a un kit diagnóstico de FISH multi-color, caracterizado porque comprende las mezclas de sondas de ADN que se describen anteriormente o un grupo de sondas de ADN como se menciona anteriormente y una combinación de filtros y de fluoróforos como se describe anteriormente.

La técnica FISH o multiFISH a las cuales se hace o serán hechas referencias varias veces en la presente descripción están en particular descritas en Speicher *et al.*, 1996; Schröck *et al.*, 1996.

Otras características y ventajas de la presente invención surgirán en la lectura de los ejemplos siguientes.

Las combinaciones de fluoróforos y de filtros ópticos descritos pueden ser usadas en múltiples técnicas que implican la microscopía de fluorescencia. De hecho, los fluoróforos descritos pueden ser usados para marcar muchas moléculas o estructuras. Aunque no exhaustivamente, dichos fluoróforos pueden ser usados para marcar polipéptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ácidos grasos, derivados de esterol, membranas, orgánulos y muchas otras macromoléculas biológicas. Los orgánulos pueden ser mitocondrias, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y lisosomas.

ES 2 299 259 T3

La combinación de fluoróforos y de filtros ópticos puede ser usada para llevar a cabo el FISH. En particular, esto puede permitir el uso simultáneo de varias sondas. Esta combinación puede ser usada para estudiar múltiples aspectos tales como la morfología de las células, el citoesqueleto, los receptores de las células, los canales iónicos, neurotransmisores, la circulación de los fluidos, la fluidez de la membrana, la viabilidad de las células y la proliferación, la apoptosis, pinocitosis, endocitosis y exocitosis, transducción, pH y concentraciones de iones (por ejemplo las concentraciones de calcio, potasio, magnesio y cinc) (Richard P Haugland, 1996, Molecular Probes, MTZ Spence ed.). Esto puede permitir el estudio de la expresión y la translación.

Se describe una combinación de fluoróforos escogidos a partir de: isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5), cianina 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

Preferiblemente, la combinación de fluoróforos comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 fluoróforos escogidos a partir de: isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5), cianina 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

Una combinación preferida de fluoróforos comprende los 5 fluoróforos siguientes: isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), cianina 5 (Cy5) y cianina 7 (Cy7).

Otra combinación preferida de fluoróforos comprende los 6 fluoróforos siguientes: isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), Bodipy 630/650, cianina 5 (Cy5) y cianina 7 (Cy7).

Otra combinación preferida de fluoróforos comprende los 5 fluoróforos siguientes: isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), Bodipy 630/650 y cianina 5 (Cy5).

Las combinaciones de fluoróforos pueden ser incluidas en un kit diagnóstico FISH multi-color.

Las combinaciones de fluoróforos pueden ser usadas para marcar una entidad escogida a partir de polipéptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ácidos grasos, derivados de esterol, membranas, orgánulos y macromoléculas biológicas.

Además, se describe una combinación de fluoróforos asociados con un par de filtros ópticos escogidos a partir de:

- a. el fluoróforo FITC que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 494 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 517 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 490DF30 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 530DF30 (Omega Optical),
- b. el fluoróforo Cy3 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 554 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 568 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 546DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 570DF10 (Omega Optical),
- c. el fluoróforo TR que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 593 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 613 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 590DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 615DF10 (Omega Optical),
- d. el fluoróforo Cy5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 652 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 670 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 650DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 670DF10 (Omega Optical),
- e. el fluoróforo Cy7 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 743 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 767 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 740DF25 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 780EFLP (Omega Optical),
- f. el fluoróforo Cy5.5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 675 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 694 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 680DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 700EFLP (Omega Optical),
- g. el fluoróforo Bodipy 630/650 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 632 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 658 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 630DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 650DF10 (Omega Optical).

Preferiblemente, la combinación de fluoróforos asociados con un par de filtros ópticos comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 fluoróforos y filtros escogidos a partir de:

- a) el fluoróforo FITC que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 494 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 517 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 490DF30 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 530DF30 (Omega Optical),

ES 2 299 259 T3

- b) el fluoróforo Cy3 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 554 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 568 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 546DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 570DF10 (Omega Optical),
- c) el fluoróforo TR que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 593 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 613 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 590DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 615DF10 (Omega Optical),
- d) el fluoróforo Cy5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 652 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 670 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 650DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 670DF10 (Omega Optical),
- e) el fluoróforo Cy7 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 743 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 767 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 740DF25 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 780EFLP (Omega Optical),
- f) el fluoróforo Cy5.5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 675 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 694 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 680DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 700EFLP (Omega Optical),
- g) el fluoróforo Bodipy 630/650 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 632 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 658 nm asociado con un filtro de excitación del tipo 630DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 650DF10 (Omega Optical).

Las combinaciones de fluoróforos asociados con el par de filtros ópticos pueden ser incluidas en un kit diagnóstico FISH multi-color.

Las combinaciones de fluoróforos asociados con un par de filtros ópticos pueden ser usadas para marcar una entidad escogida a partir de polipéptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ácidos grasos, derivados de esterol, membranas, orgánulos y macromoléculas biológicas.

Las sondas y las combinaciones de fluoróforos pueden ser usadas con cualquier tipo de microscopio (monocromador, láser, microscopio de fluorescencia). Preferiblemente, la invención usa un microscopio de fluorescencia.

Ejemplos

1. Preparación de las sondas

El ADN genómico extraído a partir de varias líneas híbridas somáticas humano-roedor (NIGMS Human genetic Mutant Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camdem) (Tabla 1) sirvió como plantilla para la PCR.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 299 259 T3

TABLA 1

Cromosoma	Línea de referencia
1	GM 13139
2	GM 10826B
3	GM 10253
4	GM 10115
5	GM 10114
6	GM 11580
7	GM 10791
8	GM 10156C
9	GM 10611
10	GM 10926B
11	GM 10927A
12	GM 10868
13	GM 10898
14	GM 11535
15	GM 11715
16	GM 10567
17	GM 10498
18	GM 11010
19	GM 10449
20	GM 13260
21	GM 10323
22	GM 10888
X	GM 6318B

La PCR fue llevada a cabo tanto en presencia únicamente del cebador SR1 (situado en el extremo 3' de la secuencia consenso Alu, la posición 241 a 261:

5' CCACTGCACTCCAGCCTGGG 3' (SEQ ID NO. 1) (Romana *et al.*, 1993), o en presencia del cebador SR1 y del cebador L1H:

5' CATGGCACATGTATACATATGTAAC(A/T)AACC 3' (SEQ ID NO. 2 y NO. 3) (Ledbetter *et al.*, 1990). Cuando sólo fue usado el cebador SR1 en la PCR, el producto de amplificación marcado y usado como sonda en los cromosomas de metafase tiñeron casi completamente el cromosoma correspondiente (a excepción de las regiones centroméricas) con un perfil de banda tipo R (como ha sido descrito por Lichter *et al.*, 1990 con otros tipos de cebadores Alu). Sin embargo, para tener una representación de las bandas R negativas, también fue llevada a cabo una PCR incorporando 2 cebadores: SR1 y L1. Así, cuando los 2 productos de amplificación (SR1 y SR1/L1) fueron mezclados y usados como sonda, las bandas R negativas en realidad fueron teñidas y las regiones teloméricas fueron perfectamente delimitadas.

Condiciones de la PCR

La reacción de la PCR ocurrió en un volumen final de 50 μ l que contenía 500 ng de ADN genómico (híbrido somático), 1 μ M de cada oligonucleótido (SR1 1 μ M, o SR1 1 μ M y L1H 1 μ M), Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 0,01% de gelatina, 250 μ M de cada trifosfato de desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y 2,5 U de ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Perkin-Elmer-Cetus). Una desnaturación inicial fue llevada a cabo a 96°C durante 6 minutos, seguido de 30 ciclos: desnaturación a 94°C durante 1 minuto, templado a 63°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 10 minutos. Al final de los ciclos, fue llevada a cabo una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los 2 productos de amplificación (SR1 y SR1/L1H) fueron mezclados y luego fueron precipitados con etanol. El pelete de ADN fue llevado a 20 μ l de agua y la concentración de ADN fue estimada en un gel de agarosa del 1,3%.

Marcado de las sondas por "translación de mellas"

15 μ g de la mezcla de los productos de la PCR pudieron marcarse durante una reacción de translación de mellas simple. La reacción ocurrió en un volumen final de 500 μ l, conteniendo 20 μ M de cada uno de los trifosfatos de desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP), dTTP 10 μ M y dUTP 10 μ M modificado, Tris-HCl 50 μ M, MgCl₂ 5 μ M, β -mercaptoetanol 1 μ M y 20 U de una mezcla de enzimas (Dnasa/Polimerasa: Boehringer-Mannheim). Para marcar directamente la sonda con fluorescencia, el nucleótido modificado fue dUTP-12-FITC (Boehringer-Mannheim) o dUTP-12-Rojo Texas (Molecular Probes) o dUTP-Cy3 (Amersham) o dUTP-Cy5 (Amersham). Por otra parte, para un marcado indirecto, fue usado dUTP-16-biotinilado (Boehringer-Mannheim). El marcado fue llevado a cabo en un tubo Eppendorf (2 ml) de la noche a la mañana a 15-16°C. Los nucleótidos libres entonces fueron eliminados por la precipitación de la sonda con etanol. El pelete de ADN fue llevado a 500 μ l de TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) de modo que la sonda estaba a una concentración de aproximadamente 30 ng/ μ l.

Composición de la mezcla de las 23 sondas de pintado cromosómico

Cada sonda específica para un cromosoma fue marcada individualmente con varios dUTP modificados (fluorescente o de otra forma). Dependiendo de la riqueza en las bandas R y G de cada uno de los cromosomas y dependiendo de su tamaño, las que tenían o de otra forma estaban compuestas de diferentes fluorocromos fueron establecidas *a priori*. Por ejemplo, fueron usadas combinaciones de 3 ó 4 fluorocromos preferiblemente para cromosomas ricos en bandas R (por ejemplo: cromosoma 19); por otra parte, para cromosomas bajos en bandas R, fueron usados sólo de 1 a 2 fluorocromos (por ejemplo: cromosoma 8). Esta opción también depende, para cada fluorocromo, de la combinación de filtros de excitación y emisión. En realidad, cuando se marca una sonda en proporción equivalente con diferentes fluorocromos, las intensidades de señal para los diferentes fluorocromos no son necesariamente comparables. Esto depende en realidad de la calidad de los filtros de excitación y emisión para cada fluorocromo, pero también de la cantidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo. Esta cantidad depende por sí misma de la intensidad del flujo luminoso de excitación y por lo tanto de la potencia espectral de la fuente de iluminación (Lámpara de mercurio 100 W-OSRAM de HBO). Entre todos estos parámetros, fue escogido preferiblemente optimizar la potencia de resolución de las combinaciones de filtros, para obtener en la emisión la mejor relación de señal/ruido de fondo para cada fluorocromo. De hecho, las diferencias de la intensidad de fluorescencia pueden ser compensadas para, por un lado, aumentar o disminuir el tiempo de exposición durante la adquisición de la imagen por la cámara (Hamamatsu C4880), y también para variar las concentraciones de las sondas dependiendo del marcador fluorescente usado. Finalmente, las concentraciones de sondas fueron ajustadas tal que para un fluorocromo dado (y por lo tanto para una combinación de filtro dada), todos los cromosomas marcados emitían una fluorescencia de intensidad equivalente.

La composición de las 23 sondas de pintado cromosómico fue definida por lo tanto experimentalmente y con precisión después de muchos experimentos de control (Tabla 2).

400 μ g (aprox. 27 veces) de ADN de Cot1 (ADN competidor humano) fueron añadidos a estos 1470 ng de mezcla de sondas cromosómicas (50 sondas diferentes). La mezcla de ADN entonces fue precipitada con etanol. El pelete fue llevado a 10 μ l de mezcla de hibridación (formamida del 50%, sulfato de dextrano del 10%, 2 x SSC (pH 7), 1 μ g/ μ l de ADN de espermatozoos de arenque sonificado).

ES 2 299 259 T3

TABLA 2

Crom. Fluor.	FITC	Cy3	TR	Cy5	Bio/Cy7	Mezcla 1470 ng =
1		35				35
2			40			40
3	30				25	55
4				50		50
5	50					50
6				40	30	70
7			30		35	65
8	60			30		90
9	30	20				50
10		30	25		20	75
11		30		40		70
12			35	50		85
13	60		45			105
14	25	20			25	70
15	50	15	15			80
16	30	20		20		70
17		15		25	20	60
18					40	40
19	25	10	20		20	75
20		20	20	30		70
21		30	30			60
22	10		15	20		45
X		30			30	60

Nombre completo de los fluorocromos:

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; TR: Rojo Texas; Cy3: Cianina 3; Cy5: Cianina 5; Bio: Biotina; Cy7: Cianina 7

Una preparación alternativa de las sondas

De forma alternativa, la preparación de la mezcla de sondas fue llevada a cabo antes de su marcado por la translación de mellas para cada fluorocromo (Tabla 3). 5 mezclas de sondas fueron así obtenidas que fueron marcadas con la translación de mellas con la ayuda de nucleótidos modificados de acuerdo con el protocolo siguiente.

Fueron marcados mediante la translación de mellas de 1 a 2 μg de la mezcla de sondas en un volumen de 50 μl que contenía: 20 μM de cada uno de los trifosfatos de desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP), dTTP 10 μM y dUTP 10 μM modificado, Tris-HCl 50 μM , MgCl_2 5 μM , β -mercaptoetanol 1 μM y 20 U de una mezcla de enzimas (Dnasa/Polimerasa: Boehringer-Mannheim). Para marcar directamente la sonda con fluorescencia, el nucleótido modificado fue dUTP-12-FITC (Boehringer-Mannheim) o dUTP-12-Rojo Texas (Molecular Probes) o dUTP-Cy3

ES 2 299 259 T3

(Amersham) o dUTP-Cy5 (Amersham). Por otra parte, para un marcado indirecto, fue usado dUTP-16-biotinilado (Boehringer-Mannheim). El marcado fue llevado a cabo en un tubo Eppendorf (2 ml) de la noche a la mañana a 15-16°C.

Después del marcado, las 5 mezclas de sondas cromosómicas (14,75 μ g) fueron precipitadas juntas (con etanol) en presencia de 400 μ g (aprox. 27 veces) de ADN de Cot1 (ADN competidor humano). El pelete fue llevado a 10 μ l de mezcla de hibridación (50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2 x SSC (pH 7), 1 μ g/ μ l de ADN de esperma de arenque sonificado).

Este método alternativo de marcado tiene la ventaja de hacer que el protocolo marque las sondas menos incómodas y más simples reduciendo el número de marcados por la translación de mellas a cinco en vez de cincuenta y preparando una mezcla sola de sondas en vez de dos.

2. Hibridación *in situ* con fluorescencia

El procedimiento fue el descrito por Cherif *et al.*, 1990, con unas pocas modificaciones.

Preparación de los cromosomas en la metafase

La preparación de los cromosomas de la metafase fue llevada a cabo comenzando con un cultivo de linfocitos circulantes obtenidos por punción venosa de un sujeto normal. Los linfocitos estimulados por fitohemaglutinina (PHA) (100 μ l por 0,8 ml de cultivo) fueron cultivados durante 72 horas a 37°C en medio RPMI-1640. Las células entonces fueron sincronizadas añadiendo metotrexato (10 μ M) durante 17 horas y luego fueron aclaradas y recultivadas en presencia de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) (0,1 mM) durante 6 horas. Después de la acción de la colchicina (1 mg/ml) durante 15 minutos, fue obtenida la interrupción de las células por la resuspensión en una solución de KCl hipotónica (75 mM). Los cromosomas fueron fijados en una mezcla de metanol/ácido acético (3 vol/1 vol) y de una a dos gotas de suspensión celular fueron extendidas en cada portaobjetos. Los portaobjetos fueron secados a temperatura ambiente durante 2 a 3 días y después fueron almacenados a -20°C durante varios meses.

TABLA 3

Crom. Fluor.	FITC	Cy3	TR	Cy5	Bio/Cy7	Mezcla
1		0,3				0,3
2			0,4			0,4
3	0,3				0,25	0,55
4				0,5		0,5
5	0,5					0,5
6				0,4	0,3	0,7
7			0,3		0,35	0,65
8	0,6			0,3		0,9
9	0,3	0,2				0,5
10		0,3	0,25		0,2	0,75
11		0,3		0,4		0,7
12			0,35	0,5		0,85

Crom. Fluor.	FITC	Cy3	TR	Cy5	Bio/Cy7	Mezcla
13	0,6		0,45			1,05
14	0,25	0,2			0,25	0,7
15	0,5	0,15	0,15			0,8
16	0,3	0,2		0,2		0,7
17		0,15		0,25	0,2	0,6
18					0,4	0,4
19	0,25	0,1	0,2		0,2	0,75
20		0,2	0,2	0,3		0,7
21		0,3	0,3			0,6
22	0,1		0,15	0,2		0,45
X		0,3			0,3	0,6
Total (µg)	3,7	2,7	2,75	3,15	2,45	14,75

Nombre completo de los fluorocromos:

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; TR: Rojo Texas; Cy3: Cianina 3; Cy5: Cianina 5; Bio: Biotina; Cy7: Cianina 7

Preparación de los portaobjetos

Los portaobjetos fueron tratados con RNAsa (100 µg/ml) durante 1 hora a 37°C y luego fueron aclarados 3 veces (5 minutos cada uno) en una solución 2 x SSC, pH 7. Los portaobjetos entonces fueron deshidratados por pasos sucesivos en una serie de baños de etanol a concentración creciente (70%, 80%, 90% y 100% y 2 minutos por baño), y fueron secados. El ADN cromosómico fue desnaturalizado sumergiendo los portaobjetos en un baño del 70% de formamida/2 x SSC (pH 7) a 70°C durante 2 minutos. La desnaturación fue parada sumergiendo los portaobjetos (2 minutos) en etanol del 70% enfriado a -20°C y fueron mantenidos en un baño con hielo. Los portaobjetos entonces fueron deshidratados por pasos sucesivos en una serie de baños de etanol a concentración creciente y fueron secados. Los portaobjetos entonces fueron incubados durante 8 a 10 minutos a 37°C en una solución (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 2 mM) conteniendo proteinasa K (100 ng/ml) y luego fueron deshidratados en una serie de baños de etanol y fueron secados.

Hibridación y detección de la señal

La mezcla de sondas y de ADN competidor (10 µl) fue desnaturalizada durante 10 minutos a 70°C y luego fue sumergida en hielo y fue prehibridada durante al menos 3 horas a 37°C. Esta mezcla entonces fue depositada en el portaobjeto y fue cubierta con una laminilla cubre-objetos (18 x 22 mm). La hibridación ocurrió a los 2-3 días a 37°C en una cámara húmeda.

Los portaobjetos entonces fueron lavados en una serie de 3 baños de formamida del 50%, 2 x SSC, pH 7 (3 minutos cada uno) a una temperatura de 42-45°C, seguido de 5 lavados en 2 x SSC, pH 7 (2 minutos cada uno) y un minuto de lavado en una solución 1 x BN (0,1 M de bicarbonato de sodio, 0,05% de nonidet P-40). Las sondas biotiniladas fueron detectadas añadiendo avidina (Laboratorios Biosys Vector) acoplada a cianina 7 (Amersham) (Avidina-Cy7) (5 µg/ml). La unión de la avidina a la cianina 7 fue llevada a cabo con un kit de acoplamiento (Amersham). Para reducir los problemas del ruido de fondo relacionados con las uniones no específicas de avidina, los portaobjetos fueron previamente incubados durante 10 minutos en una solución 1 x BN que contenía polvo de leche desnatada del 5%. Los portaobjetos entonces fueron incubados durante 1/2 hora a 37°C en una solución que contenía avidina-Cy7 (5 µg/ml en 1 x BN + 5% de leche en polvo y luego fueron sucesivamente lavados 3 veces (2 minutos) en una solución 1 x BN a 45°C. La señal fluorescente fue amplificada añadiendo una capa de anticuerpos de antiavidina biotinilados (5 µg/ml) (Laboratorios Vector, Biosys Francia), seguido por una capa de avidina-Cy7 (5 µg/ml) de acuerdo con el protocolo descrito por Pinkel *et al.*, 1986. Para cada capa, los portaobjetos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C y luego fueron lavados 3 veces en una solución 1 x BN. Las sondas marcadas por dUTP-FITC, dUTP-TR, dUTP-Cy3 y dUTP-Cy5 no requirieron ninguna etapa de detección adicional.

Los portaobjetos fueron examinados con la ayuda de un fotomicroscopio epifluorescencia (DMRX B, LEICA) equipado con la combinación de los filtros que se describe anteriormente. Dos ruedas independientes fueron usadas para llevar 8 filtros cada una. La rueda que llevaba los filtros de excitación fue insertada inmediatamente después de la lámpara de Hg y la que llevaba los filtros de emisión fue colocada antes de los objetivos y el filtro separador

de rayos. Antes de la adquisición de las imágenes, 20 μ l de una solución antidecoloradora (Johnson *et al.*, 1981) fueron depositados sobre cada portaobjeto y fueron cubiertos con un cubre-objetos (solución antidecoloradora: 100 mg de PPD (p-fenilendiamina, Sigma) en una solución compuesta de 10 ml de PBS y 90 ml de glicerol; el pH de la solución fue ajustado a 8,0 con NaOH 0,1 M). La solución antidecoloradora hace posible evitar la extinción rápida de la fluorescencia emitida por los diferentes fluorocromos cuando son sometidos a una irradiación fuerte.

3. Ejemplo de uso de una combinación de 6 fluoróforos

Ya que la cianina 7 es un fluorocromo relativamente inestable, fueron hechos esfuerzos para sustituirla por otro fluorocromo, por ejemplo Bodipy 630/650 (Molecular Probes). Acoplado a un anticuerpo o una molécula de avidina, el Bodipy hace posible detectar indirectamente una sonda marcada con biotina, con digoxigenina o con dinitrofenol (DNP). En este caso, la opción de los 5 fluorocromos para la multifuorescencia puede además ser la misma porque los espectros de absorción y emisión de cianina 5 y de Bodipy 630/650 están muy cerca para que haya una buena discriminación entre estos dos fluorocromos. La opción será la siguiente:

- isotiocianato de fluoresceína (FITC)
- Rojo Texas (TR)
- Cianina 3 (Cy3)
- Bodipy 630/650
- Cianina 5.5 (Cy5.5).

Esta opción también tiene la ventaja de permitir el uso de cianina 7 como el 6º fluorocromo si fuera necesario (por ejemplo, para aplicaciones en las que no sea posible llevar a cabo el marcado de la sonda combinatoria, y en las que sería ventajoso tener diferentes sondas que puedan ser distinguidas entre un máximo de fluorocromos diferentes).

En este caso, el Cy5.5 también debería ser acoplado a un anticuerpo o una molécula de avidina para ser capaz de revelar una sonda marcada con biotina, digoxigenina o DNP.

Por ejemplo, para el cariotipado por multifuorescencia, los diferentes sistemas para marcar y detectar las sondas serán:

<u>Marcado</u>	<u>Tipo de marcado</u>	<u>Detección</u>
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Directo	No
Rojo Texas (TR)	Directo	No
Cianina 3 (Cy3)	Directo	No
Digoxigenina (Dig)	Indirecto	anti-dig-Bodipy 630/650
Biotina (Bio)	Indirecto	avidina-Cy5.5

Si lo deseable es usar 6 fluorocromos al mismo tiempo, la opción sería:

<u>Marcado</u>	<u>Tipo de marcado</u>	<u>Detección</u>
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Directo	No
Rojo Red (TR)	Directo	No
Cianina 3 (Cy3)	Directo	No
Dinitrofenol (DNP)	Indirecto	anti-DNP Bodipy 630/650
Digoxigenina (Dig)	Indirecto	anti-dig-Cy5.5
Biotina (Bio)	Indirecto	avidina-Cy7

Texto libre del listado de secuencias

cebador de la PCR LINE

5 cebador de la PCR Alu.

Referencias

10 **Cherif D., Julier C., Delattre O., Derre J., Lathrop G M., Berger R., (1990).** “Simultaneous localization of cosmid and chromosome R-banding by fluorescence microscopy: Application to regional mapping of chromosome 11”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6639.

15 **Dutrillaux B., Lejeune J. (1971).** “Sur une nouvelle technique d’analyse du caryotype humain (On a new technique for analyzing human karyotype)”. *C.R. Acad. Sci.* **272**, 2638.

15 **Johnson G. D., De Nogueira C., Arango J. G. M. (1981).** “A simple method for reducing the fading of immunofluorescence during microscopy”. *J. Immunol. Methods* **43**, 349.

20 **Korenberg J. R., Rikowski M. C. (1988).** “Human genome organization: Alu, Lines and the molecular structure of metaphase chromosome bands”. *Cell* **53**, 391.

20 **Ledbetter S. A., Garcia-Heras J., Ledbetter D. H. (1990).** ““PCR-karyotype” of human chromosomes in somatic cell hybrids”. *Genomics* **8**, 614.

25 **Lengauer et al. (1990).** “Painting of human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers”. *Human Genetics* **86**, 1-6.

30 **Lichter P., Ledbetter S. A., Ledbetter D. H., Ward D. C. (1990).** “Fluorescence *in situ* hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6634.

30 **Pinkel D., Straume T., Gray J. W. (1996).** “Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2934.

35 Richard P **Haugland, 1996, Molecular Probes**, MTZ Spence Ed. “Handbook of fluorescent probes and research chemicals”.

40 **Romana S. P., Tachdjian G., Druart L., Cohen D., Berger R., Cherif D. (1993).** “A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes”. *Eur. J. Hum. Genet.* **1**, 245.

40 **Sabile A., Poras I., Cherif D., Goodfellow P., Avner P. (1997).** “Isolation of monochromosomal hybrid for mouse chromosomes 3, 6, 10, 12, 14 and 18”. *Mammalian Genome* **8**, 81.

45 **Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. (1996).** “Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes”. *Science* **273**, 494-497.

50 **Speicher M. R., Ballard S. G., Ward D C. (1996).** “Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH”. *Nature Genetics* **12**, 368-375.

50 **Summer A. T., Evans H. J., Buckland R. A. (1971).** “A new technique for distinguishing between human chromosomes”. *Nature (New Biol)* **232**, 31.

REIVINDICACIONES

1. La mezcla de sondas requerida para el marcado de un cromosoma, que consiste en una mezcla de dos productos de amplificación de IRS-PCR a partir de dicho cromosoma, compuesta, por una parte, de un:

- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para secuencias de ADN Alu o el cebador específico para secuencias de ADN LINE, y, por otra parte, de un:
- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para secuencias de ADN Alu y el cebador específico para secuencias de ADN LINE.

2. La mezcla de sondas de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en una mezcla de dos productos de amplificación de IRS-PCR compuestos, por una parte, de un:

- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para secuencias de ADN Alu, y, por otra parte, de un:
- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para secuencias de ADN Alu y el cebador específico para secuencias de ADN LINE.

3. La mezcla de sondas de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en una mezcla de dos productos de amplificación de IRS-PCR compuestos, por una parte, de un:

- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para secuencias de ADN LINE, y, por otra parte, de un:
- producto de amplificación de la PCR obtenido usando el cebador específico para secuencias de ADN Alu y el cebador específico para secuencias de ADN LINE.

4. La mezcla de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque los segmentos de ADN amplificados por IRS-PCR tienen como su fuente híbridos somáticos roedor/humano monocromosómicos.

5. La mezcla de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dichas sondas son específicas para un cromosoma humano.

6. La mezcla de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque dichos cebadores específicos usados comprenden o son los cebadores de las secuencias:

- SEQ ID NO. 1 para el cebador específico para las secuencias de ADN Alu,
- SEQ ID NOs. 2 y 3 para el cebador específico para las secuencias de ADN LINE.

7. La mezcla de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque los segmentos de ADN son marcados directamente o indirectamente por técnicas de fluorescencia.

8. La mezcla de sondas de ADN de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada** porque los segmentos de ADN son marcados con al menos un fluoróforo escogido a partir de isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TR), cianina 3 (Cy3), cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5), cianina 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

9. El grupo de mezclas de sondas requeridas para el marcado de cromosomas humanos, **caracterizado** porque contiene mezclas de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para cada uno de los cromosomas humanos.

10. El método para producir una mezcla de sondas requeridas para marcar cromosomas humanos, **caracterizado** porque dicho método comprende las etapas siguientes:

- llevar a cabo dos amplificaciones de IRS-PCR usando dichos cromosomas, por una parte, los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu y LINE y, por otra parte, los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu o los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN LINE;
- mezclar los dos productos de amplificación.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque las dos amplificaciones de IRS-PCR usan, por una parte, los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu y LINE y, por otra parte, los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque las dos amplificaciones de IRS-PCR usan, por una parte, los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN Alu y LINE y, por otra parte, los cebadores de la PCR específicos para las secuencias de ADN LINE.

13. El uso de una mezcla de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un grupo de mezclas de sondas de acuerdo con la reivindicación 9 para el pintado y el marcado en bandas citogenéticas de un cromosoma.

14. El método de FISH multicolor, **caracterizado** porque su puesta en práctica implica el uso de mezclas de sondas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de un grupo de mezclas de sondas de acuerdo con la reivindicación 9.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado** porque las sondas de ADN son marcadas con fluoróforos y porque cada fluoróforo que tiene una longitud de onda específica de absorción y emisión está asociado con un par de filtros ópticos, uno para la absorción y otro para la emisión, usando dicho método fluoróforos y pares de filtros escogidos a partir del grupo siguiente:

- a) el fluoróforo FITC que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 494 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 517 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 490DF30 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 530DF30 (Omega Optical),
- b) el fluoróforo Cy3 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 554 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 568 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 546DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 570DF10 (Omega Optical),
- c) el fluoróforo TR que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 593 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 613 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 590DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 615DF10 (Omega Optical),
- d) el fluoróforo Cy5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 652 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 670 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 650DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 670DF10 (Omega Optical),
- e) el fluoróforo Cy7 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 743 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 767 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 740DF25 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 780EFLP (Omega Optical),
- f) el fluoróforo Cy5.5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 675 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 694 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 680DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 700EFLP (Omega Optical),
- g) el fluoróforo Bodipy 630/650 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 632 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 658 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 630DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 650DF10 (Omega Optical).

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado** porque los filtros ópticos tienen las calidades siguientes:

- son del tipo de 6 cavidades,
- tienen un ADI de 0°;
- tienen una tolerancia $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- tienen una tolerancia en FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,
- tienen un OD5 de rechazo fuera del ancho de banda para UV a 1200 nm,
- tienen una T de la curva de transmisión $\geq 50\%$ en λ_0 .

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque los filtros ópticos también tienen las características siguientes:

- tienen un diámetro útil centrado mayor que 21 mm,
- tienen un espesor ≤ 7 mm.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, **caracterizado** porque dichas sondas son usadas para estudiar cariotipos y los cariotipos de reajustes cromosómicos.

ES 2 299 259 T3

19. Un kit diagnóstico, **caracterizado** porque comprende al menos las mezclas de sondas de ADN que se describen en las reivindicaciones 1 a 8 o un grupo de mezclas de sondas de acuerdo con la reivindicación 9.

20. El kit de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado** porque las sondas de ADN son marcadas por fluoróforos y porque cada fluoróforo que tiene una longitud de onda específica de absorción y emisión está asociado con un par de filtros ópticos, uno para la absorción y otro para la emisión, usando dicho kit fluoróforos y pares de filtros escogidos a partir del grupo siguiente:

- a) el fluoróforo FITC que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 494 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 517 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 490DF30 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 530DF30 (Omega Optical),
- b) el fluoróforo Cy3 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 554 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 568 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 546DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 570DF10 (Omega Optical),
- c) el fluoróforo TR que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 593 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 613 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 590DF10 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 615DF10 (Omega Optical),
- d) el fluoróforo Cy5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 652 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 670 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 650DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 670DF10 (Omega Optical),
- e) el fluoróforo Cy7 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 743 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 767 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 740DF25 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 780EFLP (Omega Optical),
- f) el fluoróforo Cy5.5 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 675 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 694 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 680DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 700EFLP (Omega Optical),
- g) el fluoróforo Bodipy 630/650 que tiene un máximo de longitud de onda de absorción de 632 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 658 nm asociados con un filtro de excitación del tipo 630DF20 (Omega Optical) y con un filtro de emisión del tipo 650DF10 (Omega Optical).

ES 2 299 259 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> GENSET
5	<120> SONDAS FLUORESCENTES PARA PINTADO CROMOSÓMICO
	<130> 340 291/D.17757/PM
10	<150> FR 98/12957
	<151> 1998-10-15
15	<160> 3
	<210> 1
	<211> 20
20	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
25	<221> cebador_bind
	<222> 1. .20
	<223> cebador de la PCR Alu
30	<400> 1
	CCACTGCACT CCAGCCTGGG
35	<210> 2
	<211> 30
	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
40	<220>
	<221> cebador_bind
	<222> 1. .30
45	<223> cebador de la PCR LINE
	<400> 2
50	CATGGCACAT GTATACATAT GTAACAAACC
	<210> 3
	<211> 30
55	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
60	<221> cebador_bind
	<222> 1. .30
	<223> cebador de la PCR LINE
65	

ES 2 299 259 T3

<400> 3

CATGGCACAT GTATACATAT GTAAC TAACC

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65