

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 491**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2006 E 06816876 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1934607**

54 Título: **Análisis inmunohistoquímico multiplex in situ**

30 Prioridad:

13.10.2005 US 726809 P

24.10.2005 US 729567 P

30.06.2006 US 817824 P

26.07.2006 US 833670 P

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

16.12.2013

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO D. ANNA SOMMER CHAMPALIMAUD
E DR. CARLOS MONTEZ CHAMPALIMAUD
(100.0%)**

**Avenida Brasilia
1400-038 Lisboa, PT**

72 Inventor/es:

**HAMANN, STEFAN;
DONOVAN, MICHAEL, J.;
CLAYTON, MARK y
KOTSIANTI, ANGELIKI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 434 491 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

Análisis inmunohistoquímico multiplex in situ

- 5 La inmunofluorescencia es un método para detectar la distribución de un antígeno en una muestra biológica a través de la unión específica de un anticuerpo que, a su vez, está acoplado a un agente fluorescente. El anticuerpo se une específicamente a la molécula diana de modo que la marca fluorescente indica cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de la diana.
- 10 Se han desarrollado diferentes métodos para la unión de la marca fluorescente. El método de marcado directo utiliza un anticuerpo primario (un anticuerpo que reconoce a la diana) que es acoplado a continuación al agente fluorescente. Este método requiere mucho trabajo y cierta cantidad de anticuerpo podría inactivarse en el proceso (si la propia marca se une a la región de reconocimiento del antígeno del anticuerpo).
- 15 El método indirecto utiliza un anticuerpo secundario - un anticuerpo que reconoce al anticuerpo primario - acoplado a un agente fluorescente para unirse a la marca. Se han descrito varias variaciones diferentes de este método. A menudo el anticuerpo primario se aplica primero a la muestra, seguido por una etapa de lavado y la aplicación de un anticuerpo secundario específico de especie que porta una marca fluorescente. Esto da como resultado, a menudo, problemas de fondo debido a unión inespecífica del anticuerpo secundario al tejido. Otra estrategia ha utilizado complejos de anticuerpo primario-secundario formados previamente (Tuson et al. 1990). Este método permite el marcado indirecto de anticuerpos primarios derivados de la misma especie, pero el uso de anticuerpos secundarios divalentes puede conducir a complejos entrecruzados.
- 20 Una estrategia similar que evita este problema es el uso de fragmentos Fab específicos de Fc monovalentes para la generación de complejos formados previamente y ha sido comercializada por Molecular Probes (Zenon; Eugene, OR). Otros han modificado este método utilizando fragmentos Fab que reconocen las regiones tanto Fc como f(ab')₂ del anticuerpo primario (Brown et al. 2004). Esta estrategia se describe en la solicitud estadounidense 10/118.204 presentada el 5 de abril de 2002 y en el documento WO 03/030817.
- 25 Todos los métodos anteriores tienen en común que el anticuerpo primario se marca antes de ponerlo en contacto con una muestra biológica. El anticuerpo primario es marcado directamente con un fluoróforo (a través de medios químicos, mediante unión al anticuerpo secundario o un fragmento Fab marcado con un agente fluorescente) o los anticuerpos primarios son detectados con un anticuerpo secundario bivalente que está marcado con un fluoróforo (habitualmente por medios químicos). Esto puede causar problemas, especialmente en una muestra de tejido incluida en parafina y fijada que es generalmente menos accesible a moléculas grandes que otras muestras biológicas (por ejemplo células cultivadas permeabilizadas y fijadas). Por ejemplo, un anticuerpo en un complejo formado previamente con un anticuerpo secundario tiene dos veces el peso molecular del anticuerpo primario. Un anticuerpo en un complejo formado previamente con fragmentos Fab tiene aproximadamente dos veces el peso molecular del anticuerpo primario si están unidos tres fragmentos Fab por anticuerpo.
- 30 El mayor tamaño de estos complejos puede impedir la penetración suficiente del tejido y, por lo tanto, restringir o inhibir la detección de la molécula diana, causar una excesiva tinción de fondo y, por lo tanto, complicar la detección de la molécula diana. Esto es especialmente relevante para la detección de un biomarcador nuclear, donde los complejos anticuerpo - Fab son incapaces de penetrar en la proteína complejada del núcleo y en su lugar se encuentran acumulados en el citoplasma. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos mejorados para analizar antígenos intracelulares.
- 35 El documento G.M. Wessel y D.R. McClay, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* vol 34, no. 6 págs. 703-706 (1986) desvela un método inmunohistoquímico en el que la muestra se pone en contacto con anticuerpos no marcados específicos para un antígeno diana dado y posteriormente se pone en contacto con reactivo de marcado. El método se usa para detectar dos (y no más) dianas, específicamente en tejido de erizo de mar.
- 40 El documento M Semar et al. (1969) *Quantitative Comparison Immunohistochemistry*. *Clinical Chemistry* 15(6) págs. 505-508 desvela la autofluorescencia de proteínas tisulares. El documento S.A. Pilen et al. (1997) *Journal of Pathology* 183, págs. 116-123 proporciona una comparación de diferentes métodos de técnicas de recuperación de antígenos en inmunohistoquímica.
- 45 Existen cada vez más evidencias de que la proliferación de células tumorales tiene importancia en el pronóstico para diversos tumores que se producen habitualmente, incluyendo linfoma (Braylan R. C., Diamond L. W., Powell M.L., Harty-Golder B. Percentage of cells in the S phase of the cell cycle in human lymphoma determined by flow cytometry: Correlation with labeling index and patient survival. *Cytometry* 1980; 1: 171-174; y Bauer K. D., Merkel D.E., Winter J.N., et al. Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in diffuse large cell lymphomas. *Cancer Res* 1986; 46: 3173-3178), cáncer de mama (Clark G.M., Dressler L.G., Owens M.A., Pounds G., Oldaker T., McGuire W.L. Predictions of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl J Med* 1989; 320: 627-633; Silvestrini R., Daidone M. G., Gasparini G. Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Cancer* 1985; 56: 982-1987; y Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A., et al. Indicators of
- 50
- 55
- 60
- 65

prognosis in node negative breast cancer. N Engl J Med 1990; 322: 1045-1053) y cáncer de colon (Bauer K. D., Lincoln S. T., Vera-Roman J.M., et al. al. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas Lab Invest 1987; 57: 329 -335). En algunos estudios, la proliferación de células tumorales tiene importancia en el pronóstico independiente, incluso aunque el análisis del contenido total de ADN ("ploidía") no la tenga (Visscher D. W., Zarbo R. J., Greenawald K. A., Crissman J. D. Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometric DNA analysis in carcinoma of the breast. Pathol Ann 1990; 25 (Parte-I): 171-210).

La citometría de flujo (FCM) se ha usado ampliamente para determinar la actividad del ciclo celular, principalmente mediante cuantificación de la parte de fase S del análisis del contenido de ADN ("ploidía"). Este método padece una serie de graves limitaciones técnicas, sin embargo. En primer lugar, puede ser difícil obtener suspensiones de células individuales a partir de tumores sólidos, y pueden perderse cantidades variables de células tumorales durante la preparación. En segundo lugar, las células tumorales son diluidas de forma variable por células normales e inflamatorias benignas, lo que puede conducir a subestimación de la fracción de fase S, particularmente para tumores con ADN diploide. En tercer lugar, la complejidad del análisis del contenido de ADN ("ploidía"), que está constituida por una serie de curvas solapantes, puede excluir el uso preciso de algoritmos de ajuste de curva para medir la parte de fase S del histograma. Estudios multicentro han mostrado mala reproducibilidad para fracción de fase S de citometría de flujo, haciendo a la utilidad clínica práctica de la medición algo dudosa. Otro problema asociado con la medición de la cinética celular mediante citometría de flujo es que, normalmente, sólo se determina la fracción de fase S, mientras que una proporción significativa de la población de células tumorales puede residir en la fase G₁ del ciclo celular, compuesta por células dispuestas a entrar en el ciclo pero que aún no sintetizan ADN. Posiblemente, dos tumores pueden tener fracciones de fase S idénticas pero diferir significativamente en la fracción total de células en estado no de reposo y, por lo tanto, pueden mostrar cinética de crecimiento y respuesta a agentes quimioterapéuticos dependientes del ciclo diferentes.

Por todas estas razones, métodos *in situ* de análisis del ciclo de células tumorales pueden proporcionar más información biológicamente significativa de la que puede obtenerse usando células tumorales desagregadas (Weinberg D. S. Relative applicability of image analysis and flow cytometry in clinical medicine. En: Bauer K. D., Duque R. E., eds. Flow cytometry: Principles and applications. Baltimore: Williams y Wilkins; 1992: 359-372; y Weinberg D. S. Proliferation indices in solid tumors. Adv Pathol Lab Med 1992; 5: 163--191). Además de garantizar que las mediciones adquiridas se realizan específicamente en las células tumorales, los métodos *in situ* pueden permitir un muestreo más amplio del tumor y la determinación de la heterogeneidad de las células tumorales.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que combinar una técnica de recuperación de antígeno único y técnicas de eliminación de autofluorescencia de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) permite la detección inmunohistoquímica altamente sensible de múltiples antígenos diana en muestras de tejido. Por consiguiente, la invención proporciona un método para detectar al menos tres moléculas diana en muestras biológicas que son secciones de tejido incluidas en parafina.

La invención proporciona métodos de detección de tres o más dianas en una muestra biológica. Tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, quince o más dianas son detectadas en una muestra biológica.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención se proporciona un método inmunohistoquímico para detectar simultáneamente la presencia o ausencia de al menos tres dianas en una muestra biológica que comprende las etapas de:

(a) realizar recuperación de antígenos en la muestra biológica, en el que dicha recuperación de antígenos comprende las etapas de:

- i. desparafinar y rehidratar la muestra biológica; y
- ii. llevar a ebullición en tampón de recuperación de antígenos;

(b) realizar reducción de autofluorescencia en la muestra biológica antes de la etapa (a), la etapa (c) o la etapa (d), en el que dicha reducción de autofluorescencia comprende incubar dicha muestra biológica en una solución que comprende ácido clorhídrico al 1 % y etanol al 70 %;

(c) poner en contacto a la muestra biológica con (1) un primer anticuerpo específico para una primera diana, (2) un primer reactivo de marcado en donde dicho primer reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho primer anticuerpo y un primer resto de detección, (3) un segundo anticuerpo específico para una segunda diana, (4) un segundo reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho segundo anticuerpo y un segundo resto de detección, (5) un tercer anticuerpo específico para una tercera diana, y (6) un tercer reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho tercer anticuerpo y un tercer resto de detección; y

(d) detectar cada uno de dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado, respectivamente, en dicha muestra biológica con lo que la presencia de dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado, respectivamente, indica la presencia de dichas primera, segunda o tercera dianas, respectivamente, en dicha

muestra biológica y la ausencia de dichos primer, segundo o tercer reactivos de marcado indica la ausencia de dichas primera, segunda o tercera dianas, respectivamente, en dicha muestra biológica,

en el que dicha muestra biológica es tejido humano incluido en parafina.

5 Las dianas se detectan poniendo en contacto a una muestra biológica con un reactivo de detección y un reactivo de marcado en condiciones en las que la diana, el reactivo de detección y el reactivo de marcado son capaces de formar un complejo. El reactivo de detección unido al reactivo de marcado es detectado a continuación por el sistema de detección apropiado (por ejemplo, microscopio de fluorescencia). La presencia del reactivo de marcado indica la presencia de la diana en la muestra biológica. Análogamente, la ausencia del reactivo de marcado indica la ausencia de la diana en la muestra biológica. Adicionalmente la concentración de la diana en la muestra biológica se determina comparando la cantidad de reactivo de marcado detectado con una muestra de control. La determinación de las concentraciones de la diana permite determinar relaciones de dos o más dianas en una muestra. La relación está relacionada con un intervalo predeterminado para indicar un estado de una enfermedad. La muestra de control es por ejemplo una micromatriz de péptidos. En algunos aspectos, la detección de la diana es indicativa de la heterogeneidad de las células tumorales. Opcionalmente, la muestra biológica se lava antes y/o después de la adición del reactivo de detección. La muestra biológica se pone en contacto con el reactivo de detección y el reactivo de marcado de forma secuencial. Como alternativa, la muestra biológica se pone en contacto con el reactivo de detección y el reactivo de marcado de forma concurrente. Opcionalmente, se permite que un primer reactivo de detección forme un complejo con un primer reactivo de marcado antes de entrar en contacto con la muestra biológica.

La muestra biológica es una sección de tejido humano incluida en parafina o una sección de tejido conservada criogénicamente. La muestra biológica está inmovilizada sobre una superficie, en algunos aspectos la muestra biológica está sustancialmente libre de ácidos nucleicos antes de la detección del reactivo de marcado.

25 El reactivo de detección es, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo específico para la diana de interés. El anticuerpo es, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. La diana es un antígeno de la superficie celular, un antígeno intracelular o un antígeno nuclear. Por ejemplo, la diana es una oncoproteína. Las dianas ejemplares incluyen un receptor de andrógenos, una proteína citoqueratina 18 o una proteína PTEN.

30 El reactivo de marcado contiene un resto de unión al reactivo de detección y un resto de detección, es decir, una marca. Un resto de unión al anticuerpo es, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monovalente tal como un fragmento Fab o Fab'. El resto de unión al anticuerpo se deriva de un anticuerpo policlonal o monoclonal. El fragmento de unión al anticuerpo es un fragmento de anticuerpo anti-Fc, un fragmento de anticuerpo anti-cadena ligera kappa, un fragmento de anticuerpo anti-cadena ligera lambda o un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. Como alternativa, el resto de unión al anticuerpo es una proteína no de anticuerpo tal como proteína G, una proteína A, una proteína L y una lectina. El resto de detección es, por ejemplo, un resto fluorescente, un resto radiactivo o una enzima.

40 Aunque no de acuerdo con la presente invención según las reivindicaciones, podría proporcionarse una plataforma para evaluación antigénica cuantitativa multiplexada que combina detección por inmunofluorescencia (IF) (por ejemplo, usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento) con análisis de imágenes asistido por ordenador. Las mediciones generadas por ordenador que reflejan la presencia, intensidad y distribución de marcas fluorescentes en imágenes del tejido están sujetas a enfoques matemáticos supervisados para generar modelos, por ejemplo, para el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad.

50 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque en la puesta en práctica o a prueba de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.

Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos.

55 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 es una representación esquemática de los métodos de la invención.
La figura 2 son fotografías que muestran la detección del receptor de andrógenos en tejido de próstata con IgG policlonal de conejo usando métodos convencionales (panel izquierdo) y los métodos de la invención (panel derecho).
La figura 3 es una representación esquemática de detección Multiplex de biomarcadores.
65 La figura 4 son fotografías que muestran la detección simultánea de Ki-67 y el receptor de andrógenos (AR) con IgG anti-AR policlonal de conejo e IgM anti-AR monoclonal de ratón.

La figura 5 es una representación esquemática de detección Multiplex de biomarcadores en secciones de tejido incluidas en parafina.

La figura 6 es una representación esquemática del uso de una matriz de péptidos para cuantificar la expresión de un biomarcador.

5 La figura 7 es un gráfico que muestra la curva patrón de la matriz de péptidos de pTyr.

La figura 8 es un gráfico que muestra la curva patrón de la matriz de péptidos de AR.

La figura 9 es una representación esquemática de amplificación con los métodos de la invención.

La figura 10 es una serie de fotografías que comparan detección de biomarcador no amplificado frente a amplificado usando los métodos de la invención.

10 La figura 11 son fotografías que muestran una única región de interés en el paciente ID 4752-1.

La figura 12 son fotografías que muestran una única región de interés en el paciente ID 4754-2.

La figura 13 son fotografías que muestran M-plex duplex con CD4 y CD8. Nótese la localización estromal adyacente a células epiteliales positivas para CK18.

15 La figura 14 son fotografías que muestran M-plex triplex con CD25, 69 y 86. Nótese la localización estromal adyacente a células epiteliales positivas para CK18

La figura 15 son fotografías que muestran M-plex duplex en bazo que ilustran la distribución y la localización celular de CD8 y 86. Nótese la abundancia de linfocitos CD8 presentes en el bazo junto con las células B activadas maduras esperadas, tal como se demuestra mediante la tinción con CD86. (AF= Autofluorescencia).

La figura 16 es un esquema que ilustra la detección espectral de CD8 y CD86 en tejido esplénico.

20 La figura 17 son fotografías que muestran M-plex triplex en bazo que ilustran la distribución y la localización celular de CD4, 25 y 69. Nótese la abundancia de linfocitos CD4 en el bazo tal como se esperaba con cantidades variables de CD25 y CD69.

La figura 18 son fotografías que muestran un quintplex.

La figura 19 son fotografías que muestran un 7-plex en tejido de la próstata.

25 La figura 20 son fotografías que muestran un quintplex en líneas celulares.

La figura 21 son fotografías que muestran un quintplex en líneas celulares.

Descripción detallada

30 La invención proporciona un método mejorado para la detección de tres o más dianas en una muestra biológica. Más específicamente, la presente invención se basa en un método de análisis *in situ* simultáneo de múltiples dianas intracelulares. Los métodos de la invención permiten una elevada resolución espacial para una precisa localización celular de antígeno y elevada resolución espectral para permitir la detección simultánea de múltiples tinciones inmunohistoquímicas. Los métodos son particularmente adecuados para la detección de antígenos nucleares. Los
35 métodos son útiles en una serie de campos tales como, por ejemplo, en diagnóstico y pronóstico del cáncer.

La presente invención es ventajosa respecto a métodos descritos anteriormente ya que proporciona los beneficios del marcado indirecto con la facilidad y la flexibilidad del marcado directo para la determinación de una diana deseada en una muestra biológica. Los reactivos de marcado específicos para un anticuerpo de unión a la diana son complejados después de la adición con una muestra biológica. Los reactivos de marcado de acuerdo con la presente
40 invención normalmente comprenden un fragmento de anticuerpo monovalente (Fab) que se une a la parte Fc y/o F(ab')₂ del anticuerpo primario y está unido covalente o no covalentemente a una marca fluorescente. Por lo tanto, a diferencia de métodos descritos anteriormente, el reactivo de marcado aplicado de forma independiente no comprende un anticuerpo bivalente que reconoce al anticuerpo primario, sino un fragmento de anticuerpo
45 monovalente mucho más pequeño, (Fab) o F(ab')₂ que tiene un mayor potencial para penetrar en tejido incluido en parafina y fijado con formalina. Por lo tanto, la presente invención proporciona numerosas ventajas respecto a los métodos convencionales de inmunomarcado.

Definiciones

50 "Afinidad" se define como la fuerza de la interacción de unión de dos moléculas, tales como un antígeno y su anticuerpo, que se define para anticuerpos y otras moléculas con más de un sitio de unión como la fuerza de unión del ligando en un sitio de unión específico. Aunque la unión no covalente de un ligando a un anticuerpo normalmente no es tan fuerte como una unión covalente, "Alta afinidad" es para un ligando que se une a un anticuerpo que tiene una constante de afinidad (K_a) de más de 10⁴ M⁻¹, normalmente 10⁵-10¹¹ M⁻¹; según lo
55 determinado mediante ELISA de inhibición o una afinidad equivalente determinada mediante técnicas comparables tales como, por ejemplo, gráficos de Scatchard o usando Kd/constante de disociación, que es la recíproca de la K_a, etc.

"Anticuerpo" se define como una proteína de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) que se une de forma no covalente a ciertas sustancias (por ejemplo antígenos e inmunógenos) para formar un complejo antígeno-anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitarse a, anticuerpos producidos por líneas celulares de hibridoma, mediante inmunización para provocar una respuesta de anticuerpo policlonal, mediante síntesis química y mediante células huésped recombinantes que han sido transformadas con un vector de expresión que codifica el anticuerpo. En seres humanos, los anticuerpos de inmunoglobulina se clasifican como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y se dice que miembros de cada clase tienen el mismo isotipo. Los isotipos de IgA e IgG humana están subdivididos adicionalmente en subtipos IgG₁, e IgA₂, e IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Los ratones generalmente
65

tienen los mismos isotipos que los seres humanos, pero el isotipo de IgG se subdivide en subtipos IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃. Por lo tanto, se entenderá que el término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye dentro de su alcance (a) cualquiera de las diversas clases o subclases de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, IgE derivadas de cualquiera de los animales usados convencionalmente y (b) anticuerpos policlonales y monoclonales, tales como anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados. Las moléculas de anticuerpo tienen regiones de secuencia de aminoácidos que pueden actuar como determinante antigénico, por ejemplo la región Fc, la cadena ligera kappa, la cadena ligera lambda, la región bisagra, etc. Un anticuerpo que se genera contra una región seleccionada se denomina anti-(región), por ejemplo anti-Fc, anti-cadena ligera kappa, anti-cadena ligera lambda, etc. Un anticuerpo se genera normalmente contra un antígeno inmunizando un organismo con una macromolécula para iniciar la activación de linfocitos para expresar la proteína inmunoglobulina. El término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, también abarca cualquier polipéptido, fragmento de anticuerpo, o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es homólogo a, un dominio de unión al anticuerpo, incluyendo, sin limitación, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., Science 242, 423 (1988) y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85,)). Estos pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse parcial o totalmente de forma sintética.

"Fragmentos de anticuerpo" se define como fragmentos de anticuerpos que conservan las principales características de unión electivas del anticuerpo completo. En la técnica son conocidos fragmentos particulares, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, que se obtienen mediante digestión con diversas proteasas y que carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto o los llamados fragmentos de "media-molécula" obtenidos mediante escisión reductiva de los puentes disulfuro que conectan los componentes de cadena pesada en el anticuerpo intacto. Dichos fragmentos también incluyen fragmentos aislados constituidos por la región variable de cadena ligera, fragmentos "Fv" constituidos por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que regiones variables ligera y pesada están conectadas por un enlazador peptídico. Otros ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) el fragmento Fd, constituido por los dominios VH y CHI; (ii) el fragmento dAb (Ward, et al., Nature 341, 544 (1989)), que está constituido por un dominio VH; (iii) regiones CDR aisladas; y (iv) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) descritas anteriormente, además, usando tecnología recombinante pueden fabricarse fragmentos arbitrarios que conservan características de reconocimiento del antígeno.

"Antígeno" se define como una molécula que induce, o es capaz de inducir, la formación de un anticuerpo o a la que un anticuerpo se une selectivamente, incluyendo aunque sin limitarse a, un material biológico. Antígeno también se refiere a "inmunógeno". Un anticuerpo se une selectivamente a un antígeno cuando existe una falta relativa de reactividad cruzada con o interferencia por otras sustancias presentes.

"Muestra biológica" o "material biológico" se define como una muestra recuperada de seres humanos en particular. La muestra puede ser de un tejido sano, tejido enfermo o tejido del que se sospecha que es tejido enfermo. La muestra puede ser una biopsia tomada, por ejemplo, durante un procedimiento quirúrgico. La muestra puede recogerse por medio de aspiración a través de aguja fina, raspando o lavando una cavidad para recoger células o tejido de ella. La muestra puede ser de un tumor por ejemplo, tumores sólidos y hematopoyéticos así como de tejido sano adyacente. La muestra es una sección de tejido incluida en parafina. Normalmente, la muestra comprende tejido, célula o células, extractos celulares, homogenados de células, proteínas purificadas o reconstituidas, proteínas recombinantes, fluidos corporales y otros fluidos biológicos, virus o partículas virales, priones, componentes subcelulares o proteínas sintetizadas. Posibles fuentes de material celular usadas para preparar la muestra de la invención incluyen sin limitación plantas, animales, hongos, protistas, bacterias, arqueobacterias o líneas celulares derivadas de dichos organismos.

"Complejo" se define como dos o más moléculas que se mantienen juntas mediante unión no covalente, que son normalmente combinaciones no covalentes de biomoléculas tales como una proteína complejada con otra proteína. En contraste, una proteína está marcada covalentemente con una sustancia cuando existe un enlace químico covalente entre la sustancia y la proteína.

"Distinta detectable" se define como la señal que es distinguible o separable mediante una propiedad física mediante observación o de forma instrumental. Por ejemplo, aunque sin limitación, un fluoróforo es fácilmente distinguible, mediante características espectrales o mediante intensidad de fluorescencia, ciclo de vida, polarización o velocidad de fotoblanqueo de otro fluoróforo en la muestra, así como de materiales adicionales que opcionalmente están presentes.

"Detectable directamente" se define para significar que la presencia de un material o la señal generada a partir del material es inmediatamente detectable mediante observación, instrumentación o película sin requerir modificaciones químicas.

"Inmunoconjugados" se definen para significar que se marcan proteínas de la invención, donde en lugar de que una marca detectable esté unida a la proteína, está unido un agente o fármaco terapéutico. El término inmunoconjugado se usa de forma intercambiable con proteína marcada con un fármaco.

"Fragmento de anticuerpo monovalente" se define como un fragmento de anticuerpo que tiene solamente un sitio de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo monovalentes incluyen, aunque sin limitarse a, fragmentos Fab (sin región bisagra), fragmentos Fab' (fragmentos monovalentes que contienen una región bisagra de cadena pesada) y proteínas variables de fragmento de cadena sencilla (ScFv).

"Identificación Multiplex" se refiere a la identificación simultánea de una o más dianas en una única mezcla. Por ejemplo, una amplificación dos-plex se refiere la identificación simultánea, en una única mezcla de reacción, de

dos dianas diferentes.

“Se une selectivamente” se define como la situación en la que un miembro de un par de unión intra- o inter-especies específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas diferentes de su socio de unión intra- o inter-especies específico (por ejemplo, una afinidad de aproximadamente 100 veces menos), es decir reactividad cruzada mínima.

Método de detección

En diversos aspectos, la invención proporciona: métodos de detección de al menos tres dianas en una muestra biológica. Las dianas se detectan poniendo en contacto una muestra biológica con un reactivo de detección de la diana, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo y un reactivo de marcado. Las dianas se detectan mediante la presencia o ausencia del complejo reactivo de detección-reactivo de marcado. Preferentemente, la muestra biológica se pone en contacto con el reactivo de detección de la diana y el reactivo de marcado de forma secuencial. Por ejemplo, la muestra biológica se incuba con el reactivo de detección en condiciones que permiten que se forme un complejo entre el reactivo de detección y la diana. Después de la formación del complejo, la muestra biológica se lava opcionalmente una o más veces para eliminar el reactivo de detección no unido. La muestra biológica se pone en contacto, además, con un reactivo de marcado que se une específicamente al reactivo de detección que está unido a la diana. La muestra biológica se lava opcionalmente una o más veces para eliminar el reactivo de marcado no unido. La presencia o ausencia de la diana en la muestra biológica se determina a continuación detectando el reactivo de marcado. Como alternativa, la muestra biológica se pone en contacto con el reactivo de detección de la diana y el reactivo de marcado de forma concurrente.

La invención posibilita la detección de dianas múltiples en una muestra. Dianas múltiples incluyen el epítipo discreto por el que tiene afinidad el anticuerpo de unión a la diana, así como moléculas o estructuras a las que está unido el epítipo. Por lo tanto, la identificación de dianas múltiples incluye el fenotipado de células basado en la concentración del mismo marcador de la superficie celular en diferentes células. De esta manera, la identificación de dianas múltiples no está limitada al epítipo discreto al que se une el anticuerpo de unión a la diana, aunque ésta es claramente una manera en la que pueden identificarse dianas múltiples, es decir basándose en la afinidad del anticuerpo de unión a la diana.

Dianas múltiples se identifican poniendo en contacto a la muestra biológica con reactivos de detección adicionales seguido por un reactivo de marcado adicional específico para los reactivos de detección adicionales usando el método descrito anteriormente. Por ejemplo, se preparan subconjuntos de reactivo de marcado con distintas marcas, por ejemplo, fluoróforos que se distinguen por sus espectros de emisión, por ejemplo, uno que emite en los espectros verdes y uno que emite en los espectros rojos. Los subconjuntos de reactivo de marcado se añaden a continuación a la muestra biológica que contiene complejos de reactivo de detección-diana en una relación controlada, por ejemplo, dos partes de un reactivo de marcado (por ejemplo, emisión verde) y una parte del otro reactivo de marcado (por ejemplo, emisión roja) por anticuerpo de unión a la diana, de esta manera los complejos inmunomarcados pueden usarse para detectar una diana. Si se añadían complejos madre inmunomarcados a la muestra, la diana original podía distinguirse de la diana detectada posteriormente.

En métodos alternativos, se identifican tres o más dianas en una muestra biológica mezclando previamente un primer reactivo de detección con un primer reactivo de marcado para formar un primer complejo. Opcionalmente, después de la formación del complejo, la mezcla se purifica para eliminar el reactivo de detección y el reactivo de marcado no complejados. La muestra biológica se incuba con el primer complejo y un segundo reactivo de detección. Opcionalmente, se detectan 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dianas en una muestra. Dependiendo del número de dianas a detectar, pueden usarse 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más reactivos de detección. Posteriormente, la muestra biológica se incuba con un segundo reactivo de marcado que se une específicamente al segundo reactivo de detección que está unido a la segunda diana. Opcionalmente, antes de incubar con el segundo reactivo de marcado, la muestra biológica se lava una o más veces para eliminar el primer complejo y el segundo reactivo de detección no unidos. La presencia o ausencia de la diana en la muestra biológica se determina a continuación detectando el reactivo de marcado. Opcionalmente, antes de detectar el reactivo de marcado, la muestra biológica se lava una o más veces para eliminar reactivos de marcado no unidos.

La muestra se define para incluir cualquier material que pueda contener una diana por la que un anticuerpo tiene afinidad. Normalmente, la muestra es de origen biológico y comprende tejido, una célula o una población de células, extractos celulares, homogenizados celulares, proteínas purificadas o reconstituidas, proteínas recombinantes, fluidos corporales y otros fluidos biológicos, virus o partículas virales, priones, componentes subcelulares o proteínas sintetizadas. La muestra es una sección de tejido humano incluida en parafina. Los ejemplos de fuentes de dichas muestras incluyen músculo, ojo; piel, gónadas, ganglios linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, tumores sólidos, macrófagos o mesotelio. La muestra se prepara de una manera que hace a la diana, que es determinada por el usuario final, en la muestra accesible a los complejos inmunomarcados. Normalmente, las muestras usadas en la invención están compuestas por tejido o células. Preferentemente, el tejido o las células a ensayar se obtendrán mediante procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, biopsia. El tejido o las células están fijadas, para permitir el seccionado histológico. Se usa detección *in situ* para determinar la presencia de una diana particular y para determinar la distribución de la diana en el tejido examinado. Las técnicas generales de detección *in situ* son

bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, el documento Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application" en *Mammalian Development: A Practical Approach*, Monk (ed.), 115 (1987). Pueden usarse tratamientos que permeabilizan la membrana plasmática, tales como electroporación, tratamientos de choque o elevado ATP extracelular, para introducir reactivos en el interior de las células.

5 Los métodos de la invención proporcionan ventajas significativas respecto a la tecnología existente, dado que no dependen de hibridaciones de ácido nucleico. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden realizarse en presencia de nucleasas, por ejemplo, nucleasas no específicas, ANDasa y ARNasa.

10 La diana es cualquier compuesto de origen biológico o sintético que está presente como una molécula o como un grupo de moléculas. Normalmente, la diana es un material biológico o determinante antigénico. La identidad química del antígeno diana puede ser conocida o desconocida. Los materiales biológicos incluyen, aunque sin limitarse a, anticuerpos, aminoácidos, proteínas, péptidos, polipéptidos, enzimas, sustratos enzimáticos, hormonas, linfoquinas, metabolitos, antígenos, haptenos, lectinas, avidina, estreptavidina, toxinas, venenos, contaminantes medioambientales, carbohidratos, oligosacáridos, polisacáridos, glucoproteínas, glucolípidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos y ácidos nucleicos derivatizados (incluyendo ácidos desoxirribo- y ribonucleicos y ácidos peptidonucleicos), fragmentos de ADN y ARN y fragmentos derivatizados (incluyendo fragmentos de cadena sencilla y de cadena múltiple), fármacos naturales y sintéticos, receptores, partículas de virus, partículas bacterianas, componentes de virus, células biológicas, componentes celulares (incluyendo membranas y orgánulos celulares), vesículas lipídicas naturales y sintéticas, y membranas poliméricas. Normalmente, el material diana está presente como componente o contaminante de una muestra tomada de un sistema biológico o medioambiental.

La diana es un marcador transmembrana. Como alternativa, la diana es un antígeno intracelular o nuclear. Los antígenos intracelulares incluyen, por ejemplo, alfa-fetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (HCG), antígeno-p específico del colon (CSAp), fosfatasa ácida prostática, antígeno oncofetal pancreático, fosfatasa alcalina placentaria, parathormona, calcitonina, antígeno polipeptídico tisular, galactosil transferasa-II (GT-II), antígeno asociado a gp-52 viral, antígeno asociado a cistadenocarcinoma de ovario (OCAA), antígeno específico de tumor de ovario (OCA), antígenos de cáncer del cuello del útero (CA-58, CCA, TA-4), fetoproteína básica (BFP), desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), antígenos asociados al melanoma citoplasmático, antígeno asociado al astrocitoma humano (HAAA), antígeno de glioma común (CGA), antígeno glioembrionario (GEA), proteína ácida fibrilar glial (GFA), antígeno de meningioma común (CMA), pMTOR, pAKT, PSMA, antígeno específico de próstata (PSA), x-metilacil-CoA racemasa (AMACR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factor de angiogénesis tumoral (TAF). Los antígenos nucleares incluyen, por ejemplo, PTEN, Ki67, Ciclina D1, EZH2, p53, IGFBP2, p-STAT-3. Otras dianas incluyen aquellas enumeradas en las tablas 1 y 2 a continuación.

El reactivo de detección es un compuesto que es capaz de unirse específicamente a la diana de interés. El reactivo de detección se selecciona basándose en la diana deseada. El reactivo de detección es, por ejemplo, un polipéptido tal como un anticuerpo específico de la diana o un fragmento del mismo. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), *es decir*, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno. Dichos anticuerpos incluyen, policlona, monoclonal, quimérico, de cadena sencilla, fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$ y $F_{(ab')_2}$, y una biblioteca de expresión de F_{ab} . Por "se une específicamente a" o "inmunorreacciona con" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (*es decir*, no se une) con otros polipéptidos o lo hace con una con afinidad muy baja ($K_d > 10^{-6}$) con otros polipéptidos.

Los anticuerpos monoclonales son particularmente ventajosos para poner en práctica los métodos de la presente invención. Generalmente, los anticuerpos monoclonales son más sensibles y específicos que los anticuerpos policlonaes. Además, a diferencia de los anticuerpos policlonaes, que dependen de la longevidad del animal que produce el anticuerpo, el suministro de anticuerpos monoclonales es indefinido. Los anticuerpos policlonaes, sin embargo, son útiles cuando es necesario usar anticuerpos con múltiples isotipos, dado que generalmente la mayoría de los anticuerpos monoclonales son de la subclase IgG1.

Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo" incluye cualquier determinante proteínico capaz de unión específica a una inmunoglobulina, un scFv, o un receptor de células T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteínico capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos habitualmente están constituidos por agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de interacciones de unión inmunológica puede expresarse en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en las que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se cuantifican usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos conlleva medir

las velocidades de formación y disociación del complejo sitio de unión al antígeno/antígeno, en el que esas velocidades dependen de las concentraciones de los socios del complejo, la afinidad de la interacción, y parámetros geométricos que influyen por igual la velocidad en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la “constante de asociación” (K_{on}) como la “constante de disociación” (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La relación de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, *en general*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473).

El reactivo de marcado contiene un resto de unión al anticuerpo y un resto de detección. El resto de unión al anticuerpo y el resto de detección están enlazados covalentemente. Como alternativa, el resto de unión al anticuerpo y el resto de detección están enlazados no covalentemente.

El resto de unión al anticuerpo se une selectivamente y con alta afinidad a una región seleccionada del reactivo de detección, por ejemplo, el anticuerpo de unión a la diana. La región de unión para el resto de unión al anticuerpo puede ser un enlazador peptídico seleccionado (que incluye la región J), cadena ligera o cadena pesada del anticuerpo de unión a la diana; preferentemente la proteína de marcado se une a la región Fc del anticuerpo de unión a la diana.

El resto de unión al anticuerpo es un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como, aunque sin limitarse a, anti-Fc, un isotipo anti-Fc, anti-cadena J, anti-cadena ligera kappa, anti-cadena ligera lambda, o una proteína variable de fragmento de cadena sencilla. Preferentemente, el resto de unión al anticuerpo es monovalente. Como alternativa, el resto de unión al anticuerpo es un péptido o proteína no anticuerpo, tal como, por ejemplo aunque sin limitarse a, receptor de Fc soluble, proteína G, proteína A, proteína L, lectinas o un fragmento de las mismas. Opcionalmente, la proteína o péptido no anticuerpo está acoplada con albúmina tal como albúminas de suero humano y bovino y ovoalbúmina.

Normalmente, el resto de unión al anticuerpo es un fragmento Fab específico para la parte Fc del anticuerpo de unión a la diana o para un isotipo de la parte Fc del anticuerpo de unión a la diana. Los fragmentos Fab monovalentes se producen a partir de anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales murinos generados en diversos animales, por ejemplo aunque sin limitarse a, conejo o cabra. Estos fragmentos pueden generarse a partir de cualquier isotipo tal como IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} o IgG₃ murino.

El resto de detección, es decir, la marca, es cualquier sustancia usada para facilitar la identificación y/o la cuantificación de una diana. Los restos de detección son observados o medidos directamente u observados o medidos indirectamente. Los restos de detección incluyen, aunque sin limitarse a, radiomarcas que pueden medirse con dispositivos de recuento de radiación; pigmentos, colorantes u otros cromógenos que pueden observarse visualmente o medirse con un espectrofotómetro; marcas de espín que pueden medirse con un analizador de marcas de espín; y restos fluorescentes, donde la señal de salida es generada por la excitación de un aducto molecular adecuado y que puede visualizarse mediante excitación con luz que es absorbida por el colorante o puede medirse con fluorómetros o sistemas de imaginología convencionales, por ejemplo. El resto de detección puede ser una sustancia luminiscente tal como un fósforo o fluorógeno; una sustancia bioluminiscente; una sustancia quimioluminiscente, donde la señal de salida es generada mediante modificación química del compuesto señal; una sustancia que contiene un metal; o una enzima, donde se produce una generación secundaria de señal dependiente de enzima, tal como la formación de un producto coloreado a partir de un sustrato incoloro. El resto de detección también puede asumir la forma de un producto químico o bioquímico, o una partícula inerte, incluyendo aunque sin limitarse a oro coloidal, microesferas, puntos cuánticos o cristales inorgánicos tales como nanocristales o fósforos (véase, por ejemplo, el documento Beverloo, et al., Anal. Biochem. 203, 326-34 (1992)). La expresión resto de detección también se refiere a una “etiqueta” o hapteno que puede unirse selectivamente a una molécula marcada de modo que la molécula marcada, cuando se añade posteriormente, se usa para generar una señal detectable. Por ejemplo, puede usarse biotina, iminobiotina o destiobiotina como etiqueta y a continuación usar un conjugado de avidina o estreptavidina de peroxidasa de rábano rusticano (HRP) para unirse a la etiqueta, y a continuación usar un sustrato cromógeno (por ejemplo, tetrametilbencidina) o un sustrato fluorógeno tal como Amplex Red o Amplex Gold. (Molecular Probes, Inc.) para detectar la presencia de HRP. Análogamente, la etiqueta puede ser un hapteno o antígeno (por ejemplo, digoxigenina), y puede usarse un anticuerpo marcado de forma enzimática, de forma fluorescente o de forma radiactiva para unirse a la etiqueta. Los expertos en la materia conocen numerosas marcas e incluyen, aunque sin limitarse a, partículas, colorantes fluorescentes, haptenos, enzimas y sus sustratos cromógenos, fluorógenos y quimioluminiscentes, y otras marcas que se describen en el documento Molecular Probes Handbook Of Fluorescent Probes And Research Chemicals de Richard P. Haugland, 6ª Ed., (1996), y sus posteriores actualizaciones de 7ª edición y 8ª edición editadas en CD ROM en noviembre de 1999 y mayo de 2001, respectivamente y en otras fuentes publicadas.

Un fluoróforo es cualquier resto químico que muestra un máximo de absorción más allá de 280 nm, y cuando está unido covalentemente a un reactivo de marcado conserva sus propiedades espectrales. Los fluoróforos incluyen, sin limitación; un pireno (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.132.432), un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbeno, un indol o bencindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina

(incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes en los documentos estadounidenses de N° de serie 09/968.401 y 09/969.853), una carbocianina (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes en los documentos estadounidenses de N° de serie 09/557.275; 09/969.853 y 09/968.401; Patentes de Estados Unidos N° 4.981.977; 5.268.486; 5.569.587; 5.569.766; 5.486.616; 5.627.027; 5.808.044; 5.877.310; 6.002.003; 6.004.536; 6.008.373; 6.043.025; 6.127.134; 6.130.094; 6.133.445; y publicaciones WO 02/26891, WO 97/40104, WO 99/51702, WO 01/21624; EP 1 065 250 A1), un carboestirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinolina, un boropoliazaindaceno (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 4.774.339; 5.187.288; 5.248.782; 5.274.113; y 5.433.896), un xanteno (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 6.162.931; 6.130.101; 6.229.055; 6.339.392; 5.451.343 y documentos estadounidenses con N° de serie 09/922.333), una oxazina (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 4.714.763) o una benzoxazina, una carbazina (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 4.810.636), una fenalenona, una coumarina (incluyendo compuestos correspondientes desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.696.157; 5.459.276; 5.501.980 y 5.830.912), un benzofurano (incluyendo compuestos correspondientes desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 4.603.209 y 4.849.362) y benzofenalenona (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 4.812.409) y sus derivados. Tal como se usan en el presente documento, oxazinas incluyen resorrufinas (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en la patente No 5.242.805), aminooxazinonas, diaminoxazinas y sus análogos benzosustituídos.

Cuando el fluoróforo es un xanteno, el fluoróforo es opcionalmente una fluoresceína, un rodol (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.227.487 y 5.442.045), o una rodamina (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes en las Patentes de Estados Unidos N° 5.798.276; 5.846.737; documentos estadounidenses con N° de serie 09/129.015). Tal como se usa en el presente documento, fluoresceína incluye benzo- o dibenzofluoresceínas, seminaftofluoresceínas o naftofluoresceínas. Análogamente, tal como se usa en el presente documento, rodol incluye seminaftorodafluoros (incluyendo cualesquiera compuestos correspondientes desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 4.945.171). Como alternativa, el fluoróforo es un xanteno que está unido mediante un enlace que es un único enlace covalente en la posición 9 del xanteno. Los xantenos preferidos incluyen derivados de 3H-xanten-6-ol-3-ona unidos en la posición 9, derivados de 6-amino-3H-xanten-3-ona unidos en la posición 9, o derivados de 6-amino-3H-xanten-3-imina unidos en la posición 9. Los fluoróforos preferidos de la invención incluyen xanteno (rodol, rodamina, fluoresceína y derivados de los mismos) coumarina, cianina, pireno, oxazina y boropoliazaindaceno. Los más preferidos son xantenos sulfonados, xantenos fluorados, coumarinas sulfonadas, coumarinas fluoradas y cianinas sulfonadas. La elección del fluoróforo unido al reactivo de marcado determinará las propiedades de absorción y emisión de fluorescencia del reactivo de marcado y el complejo inmunomarcado. Las propiedades físicas de una marca fluorófora incluyen características espectrales (absorción, emisión y desplazamiento de Stokes), intensidad de fluorescencia, ciclo de vida, polarización y velocidad de fotoblanqueo todas las cuales pueden usarse para distinguir un fluoróforo de otro.

Normalmente el fluoróforo contiene uno o más anillos aromáticos o heteroaromáticos, que están opcionalmente sustituidos una o más veces por diversos sustituyentes, incluyendo sin limitación, sistema de anillo halógeno, nitro, ciano, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxi, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilalquilo, acilo, arilo o heteroarilo, benzo u otros sustituyentes normalmente presentes en fluoróforos conocidos en la técnica.

En un aspecto de la invención, el fluoróforo tiene un máximo de absorción más allá de 480 nm. En una realización particularmente útil, el fluoróforo absorbe a o cerca de 488 nm a 514 nm (particularmente adecuado para excitación por la salida de la fuente de excitación por láser de iones de argón) o cerca de 546 nm (particularmente adecuado para excitación por una lámpara de arco de mercurio).

Preferentemente, el resto de detección es un colorante fluorescente. El colorante fluorescente incluye, por ejemplo, Fluoresceína, Rodamina, Texas Red, Cy2, Cy3, Cy5, Cy0, Cy0.5, Cy1, Cy1.5, Cy3.5, Cy7, VECTOR Red, ELF™ (por *Enzyme-Labeled Fluorescence*), FluorX, Calceína, Calceína-AM, CRYPTOFLUOR™S, Orange (42 kDa), Tangerina (35 kDa), Gold (31 kDa), Red (42 kDa), Crimson (40 kDa), BHMP, BHDMAP, Br-Oregon, Lucifer Yellow, familia de colorantes Alexa, N-(6-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-il)amino)caproilo (NBD), BODIPY™, dipirrometeno difluoruro de boro, Oregon Green, MITOTRACKER™ Red, DiOC₇ (3), DiIC₁₈, ficoeritrina, fibobiliproteínas BPE (240 kDa) RPE (240 kDa) CPC (264 kDa) APC (104 kDa), Spectrum Blue, Spectrum Aqua, Spectrum Green, Spectrum Gold, Spectrum Orange, Spectrum Red, NADH, NADPH, FAD, Colorantes Infrarrojos (IR), GDP-Ribosa cíclica (cGDPR), Calcofluor White, Tirosina y Triptófano.

Muchos de los fluoróforos también puede funcionar como cromóforos y, por lo tanto, los fluoróforos descritos también son cromóforos preferidos.

Además de los fluoróforos, las enzimas también son útiles como restos detectables. Las enzimas son restos detectables deseables debido a que la amplificación de la señal detectable puede obtenerse dando como resultado mayor sensibilidad del ensayo. La propia enzima no produce una respuesta detectable pero funciona para descomponer un sustrato cuando entra en contacto con ella un sustrato apropiado, de modo que el sustrato

convertido produce una señal fluorescente, colorimétrica o luminiscente. Las enzimas amplifican la señal detectable debido a que una enzima en un reactivo de marcado puede dar como resultado múltiples sustratos que se convierten en una señal detectable. Esto es ventajoso cuando hay una baja cantidad de diana presente en la muestra o no existe un fluoróforo que dará una señal comparable o más fuerte que la enzima. Sin embargo, los

5 fluoróforos son los más preferidos dado que no requieren etapas de ensayo adicionales y, por lo tanto, reducen el tiempo global requerido para completar un ensayo. El sustrato enzimático se selecciona para dar el producto medible preferido, por ejemplo calorimétrico, fluorescente o quimioluminiscencia. Dichos sustratos se usan ampliamente en la técnica, muchos de los cuales se describen en el documento MOLECULAR PROBES HANDBOOK, anterior.

10 Una combinación de sustrato calorimétrico o fluorógeno y enzima preferida usa oxidorreductasas tales como peroxidasa de rábano rusticano y un sustrato tal como 3,3'-diaminobencidina (DAB) y 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), que producen un color distintivo (marrón y rojo, respectivamente). Otros sustratos de oxidorreductasa calorimétricos que producen productos detectables incluyen, aunque sin limitarse a: ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiaz-olin-6-

15 sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPD), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, 4-cloro-1-naftol. Los sustratos fluorógenos incluyen, aunque sin limitarse a, ácido homovanílico o ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas, incluyendo reactivo Amplex Red y sus variantes (Patente de Estados Unidos N° 4.384.042) y dihidroxantenos reducidos, incluyendo dihidrofluoresceínas (Patente de Estados Unidos N° 6.162.931) y dihidrorrodaminas incluyendo dihidrorrodamina 123. Los sustratos de

20 peroxidasa que son tiramidas (Patentes de Estados Unidos N° 5.196.306; 5.583.001 y 5.731.158) representan una clase única de sustratos de peroxidasa, ya que pueden ser intrínsecamente detectables antes de la acción de la enzima pero están "fijados en su lugar" por la acción de una peroxidasa en el proceso descrito como amplificación de señales por tiramida (TSA). Estos sustratos se utilizan ampliamente para marcar dianas en muestras que son células, tejidos o matrices para su posterior detección mediante microscopía, citometría de flujo, barrido óptico y

25 fluorometría.

Una combinación adicional de sustrato calorimétrico (y en algunos casos fluorógeno) y enzima usa una enzima fosfatasa tal como una fosfatasa ácida, una fosfatasa alcalina o una versión recombinante de dicha fosfatasa en combinación con un sustrato calorimétrico tal como fosfato de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo (BCIP), fosfato de 6-cloro-3-

30 indolilo, fosfato de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo, fosfato de p-nitrofenilo o fosfato de o-nitrofenilo o con un sustrato fluorógeno tal como fosfato de 4-metilumbeliferilo, fosfato de 6,8-difluoro-7-hidroxi-4-metilcoumarinilo (DiFMUP, Patente de Estados Unidos N° 5.830.912) bifosfato de fluoresceína, fosfato de 3-O-metilfluoresceína, fosfato de resorufina, fosfato de 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona-7-ilo) (fosfato de DDAO), o ELF 97, ELF 39 o fosfatos relacionados (Patentes de Estados Unidos N° 5.316.906 y 5.443.986).

35 Las glucosidasas, en particular beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa y beta-glucosidasa, son enzimas adecuadas adicionales. Los sustratos colorimétricos apropiados incluyen, aunque sin limitarse a, 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-galactopiranosido (X-gal) e indolil galactósidos similares, glucósidos y glucurónidos, o-nitrofenil beta-D-galactopiranosido (ONPG) y p-nitrofenil beta-D-galactopiranosido. Los sustratos fluorógenos preferidos incluyen

40 resorufina beta-D-galactopiranosido, fluoresceína digalactósido (FDG), fluoresceína diglucurónido y sus variantes estructurales (Patentes de Estados Unidos N° 5.208.148; 5.242.805; 5.362.628; 5.576.424 y 5.773.236), 4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil beta-D-galactopiranosido y coumarin beta-D-galactopiranosidos fluorados (Patente de Estados Unidos N° 5.830.912).

45 Enzimas adicionales incluyen, aunque sin limitarse a, hidrolasas tales como colinesterasas y peptidasas, oxidasas tales como glucosa oxidasa y citocromo oxidasas, y reductasas para las que se conocen sustratos adecuados.

Se prefieren enzimas y sus sustratos apropiados que producen quimioluminiscencia para algunos ensayos. Éstas incluyen, aunque sin limitarse a, formas naturales y recombinantes de luciferasas y aequorinas. Sustratos que producen quimioluminiscencia para fosfatasas, glucosidasas y oxidasas tales como aquellos que contienen dioxetanos estables, luminol, isoluminol y ésteres de acridinio son adicionalmente útiles. Por ejemplo, la enzima es luciferasa o aequorina. Los sustratos son luciferina, ATP, Ca⁺⁺ y coelenterazina.

50

Además de enzimas, haptenos tales como biotina son restos detectables útiles. La biotina es útil porque puede funcionar en un sistema enzimático para amplificar adicionalmente la señal detectable, y puede funcionar como una etiqueta para usarla en cromatografía de afinidad para fines de aislamiento. Para fines de detección, se usa un conjugado enzimático que tiene afinidad por biotina, tal como avidina-HRP. Posteriormente se añade un sustrato de peroxidasa para producir una señal detectable.

55

60 Los haptenos también incluyen hormonas, fármacos de origen natural y sintéticos, contaminantes, alérgenos, moléculas afectoras, factores de crecimiento, quimoquinas, citoquinas, linfoquinas, aminoácidos, péptidos, intermedios químicos o nucleótidos.

Un resto detectable es una proteína fluorescente. Las proteínas fluorescentes ejemplares incluyen la proteína verde fluorescente (GFP) las ficobiliproteínas y los derivados de las mismas, luciferasa o aequorina. Las proteínas fluorescentes, especialmente ficobiliproteína, son particularmente útiles para crear colorante marcado en tándem y

65

reactivos de marcado. Estos colorantes en tándem comprenden una proteína fluorescente y un fluoróforo para los fines de obtener un mayor desplazamiento de Stokes en el que los espectros de emisión están mucho más desplazados de la longitud de onda de los espectros de absorción de la proteína fluorescente. Esto es particularmente ventajoso para detectar una baja cantidad de una diana en una muestra en la que la luz fluorescente emitida está optimizada al máximo, en otras palabras, poca o ninguna de la luz emitida es reabsorbida por la proteína fluorescente. Para que esto funcione, la proteína fluorescente y el fluoróforo funcionan como un par de transferencia de energía en el que la proteína fluorescente emite a la longitud de onda a la que absorbe el fluoróforo y el fluoróforo emite a continuación a una longitud de onda más alejada de las proteínas fluorescentes de la que podría haberse obtenido con solamente la proteína fluorescente. Una combinación particularmente útil es las ficobiliproteínas desveladas en las Patentes de Estados Unidos N° 4.520.110; 4.859.582; 5.055.556 y los fluoróforos de sulforrodamina desvelados en la Patente N° 5.798.276, o los fluoróforos de cianina sulfonada desvelados en los documentos estadounidenses de N° de serie 09/968401 y 09/969853; los derivados de xanteno sulfonados desvelados en la Patente N° 6.130.101 y aquellas combinaciones desveladas en la Patente de Estados Unidos 4.542.104. Como alternativa, el fluoróforo funciona como donador de energía y la proteína fluorescente es el aceptor de energía.

La preparación de un reactivo de marcado usando colorantes reactivos de bajo peso molecular es conocida por los expertos en la materia y está bien documentada, por ejemplo, por Richard P. Haugland, *Molecular Probes Handbook Of Fluorescent Probes And Research Chemicals*, Capítulos 1-3 (1996) y por Brinkley, *Bioconjugate Chem.* 3, 2 (1992). Las proteínas de marcado normalmente son el resultado de mezclar colorantes reactivos apropiados y la proteína a conjugar en un disolvente adecuados en el que ambos son solubles. La mayoría de los colorantes preferidos de la invención son fácilmente solubles en soluciones acuosas, facilitando reacciones de conjugación con la mayoría de los materiales biológicos. Para aquellos colorantes reactivos que están fotoactivados, la conjugación requiere iluminación de la mezcla de reacción para activar el colorante reactivo.

Los métodos de visualización del resto de detección dependen de la marca.

En cualquier momento después de la adición del complejo inmunomarcado a la muestra, la muestra se ilumina con una longitud de onda de luz seleccionada para dar una respuesta óptica detectable, y se observa con un medio para detectar la respuesta óptica. El equipo que es útil para iluminar los compuestos fluorescentes de la presente invención incluye, aunque sin limitarse a, lámparas ultravioleta de mano, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenón, láseres y diodos láser. Estas fuentes de iluminación están ópticamente integradas en escáneres láser, lectores o patrones de microplacas fluorescentes o microfluorómetros. El grado y/o la ubicación de la señal, en comparación con un respuesta patrón o esperada, indica si y en qué grado posee la muestra una característica dada, es decir la diana deseada.

La respuesta óptica es detectada opcionalmente mediante inspección visual, o mediante el uso de cualquiera de los siguientes dispositivos: cámara CCD, videocámara, película fotográfica, dispositivos de barrido con láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, citómetros de flujo, lectores de microplacas de fluorescencia o mediante medios para amplificar la señal tales como tubos fotomultiplicadores. Donde la muestra es examinada usando un citómetro de flujo, el examen de la muestra opcionalmente incluye clasificar partes de la misma de acuerdo con su respuesta de fluorescencia.

Cuando se usa una marca detectable de forma indirecta, entonces la etapa de iluminación normalmente incluye la adición de un reactivo que facilita una señal detectable tal como un sustrato enzimático colorimétrico. Los radioisótopos también se consideran indirectamente detectables en los que no se requiere un reactivo adicional sino que en su lugar el radioisótopo debe ser expuesto a una película de rayos X o algún otro mecanismo para registrar y medir la señal del radioisótopo. Esto también puede ser cierto para algunas señales quimioluminiscentes que se observan mejor después de la exposición a la película.

Aplicación

Una realización de la invención se refiere a un método inmunohistoquímico de detección de al menos tres epítomos diana en una muestra biológica. El epítopo puede ser cualquier epítopo en un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno tisular incluyendo, por ejemplo, un antígeno nuclear, un antígeno citoplasmático o un antígeno unido a la membrana. El método comprende las siguientes etapas

(a) realizar recuperación de antígenos en la muestra biológica, en el que dicha recuperación de antígenos comprende las etapas:

- i. desparafinar y rehidratar la muestra biológica; y
- ii. llevar a ebullición en tampón de recuperación de antígenos;

(b) realizar eliminación de autofluorescencia en la muestra biológica antes de la etapa (a), la etapa (c) o la etapa (d), en el que dicha eliminación de autofluorescencia comprende incubar dicha muestra biológica en una

solución que comprende ácido clorhídrico al 1 % y etanol al 70 %;

(c) poner en contacto a la muestra biológica con un primer anticuerpo específico para una diana, un primer reactivo de marcado en el que dicho primer reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho primer anticuerpo y un primer resto de detección, un segundo anticuerpo específico para una segunda diana, un segundo reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho segundo anticuerpo y un segundo resto de detección, un tercer anticuerpo específico para una tercera diana, y un tercer reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho tercer anticuerpo y un tercer resto de detección; y

(d) detectar cada uno de dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado, respectivamente, en dicha muestra biológica con lo que la presencia de dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado, respectivamente, indica la presencia de la diana en dicha muestra biológica y la ausencia de dicho reactivo de marcado indica la ausencia de dicha diana en dicha muestra biológica, indica la presencia de dichas primera, segunda o tercera dianas, respectivamente, en dicha muestra biológica y la ausencia de dichos primer, segundo o tercer reactivos de marcado indica la ausencia de dichas primera, segunda o tercera dianas, respectivamente, en dicha muestra biológica.

La puesta en contacto (etapa (c)) puede implicar, por ejemplo, incubar la muestra en PBS y añadir un primer anticuerpo, suspendido en PBS, a la muestra. Dado que el primer anticuerpo es específico para el primer epítipo diana, éste se unirá solamente en la ubicación en la que el epítipo está presente. La muestra biológica es una sección de tejido humano incluida en un agente solidificante que es parafina. Después de un periodo de incubación apropiado que puede incluir una incubación con agitación (por ejemplo, sacudiendo o volteando), los primer, segundo y tercer anticuerpos no unidos pueden eliminarse de la sección de tejido lavando la sección con PBS u otro tampón apropiado (una primera etapa de lavado). El lavado puede realizarse, por ejemplo, incubando (sacudiendo o volteando) la sección de tejido en recipientes con PBS.

Después de la eliminación de primeros anticuerpos no unidos, la muestra biológica unida al primer anticuerpo se pone en contacto con un fragmento Fab (proteína de marcado) de segundos anticuerpos dirigidos contra sus regiones Fc del primer anticuerpo. El fragmento Fab está marcado con una marca detectable. En una realización preferida, el fragmento Fab es un reactivo Zenon™ (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Por ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG de ratón, el segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón. El fragmento Fab se unirá al primer anticuerpo para producir un primer anticuerpo unido a Fab.

La marca en el fragmento Fab puede ser detectada directamente sin una etapa de lavado. La distribución de la marca corresponderá a la distribución del epítipo. Si la marca detectable es un resto fluorescente, la marca puede detectarse usando un microscopio de fluorescencia. El uso de un microscopio de fluorescencia para la detección de una sección de tejido marcada es bien conocido.

Opcionalmente, la sección de tejido puede lavarse para eliminar fragmentos Fab no unidos antes de que se detecte la marca. La etapa de lavado puede comprender las mismas etapas que la primera etapa de lavado descrita anteriormente.

El epítipo diana puede ser cualquier epítipo en una célula, incluyendo, por ejemplo un epítipo en un antígeno. El antígeno puede ser una oncoproteína (por ejemplo bcl-2, c-erbB-2) o una proteína que es indicativa de heterogeneidad de células tumorales (p53). Los antígenos útiles incluyen, por ejemplo, epítopos para el receptor de andrógenos (AR), Citoqueratina 18 o PTEN.

En una realización preferida, el primer anticuerpo penetra en la sección de tejido y está unido a un epítipo en el interior de la sección. La adición del fragmento Fab permite la formación de un complejo primer anticuerpo-Fab dentro de la sección de tejido.

Aplicación Multiplex

Los métodos de la invención se usan para detectar una pluralidad de (al menos tres) dianas (epítopos) en una muestra biológica usando las siguientes etapas:

Etapa A Un primer anticuerpo específico para una primera diana se satura con proteína de marcado para crear un complejo formado previamente.

Etapa B El exceso de proteína de marcado se elimina después de la formación del complejo formado previamente (por ejemplo, mediante filtración en gel).

Etapa C El complejo formado previamente se pone en contacto con una muestra biológica.

Etapa D Un segundo anticuerpo específico para una segunda diana se pone en contacto con la misma muestra biológica. El segundo anticuerpo no está marcado y no está complejoado con una proteína de marcado. La etapa D puede realizarse antes, después o simultáneamente con la etapa C.

Etapa E El exceso de anticuerpo y el exceso de complejo formado previamente pueden eliminarse en una etapa de lavado opcional.

Etapa F Una segunda proteína de marcado que es al menos específica para el segundo anticuerpo, se aplica a

la muestra biológica.

En el método anterior, la segunda proteína de marcado que se añade en la etapa F solamente se unirá al segundo anticuerpo, dado que todos los potenciales sitios de unión en el primer anticuerpo ya estarán saturados con el fragmento Fab marcado de forma fluorescente (véase la figura 5).

Dado que el primer anticuerpo se aplica como un complejo formado previamente, se prefiere que el primer anticuerpo sea específico para un antígeno nuclear donde se ha descubierto que la penetración en el tejido es menos crítica para la detección.

Esta detección "multiplexada" (descrita en el ejemplo 1) está multiplexada adicionalmente para detectar al menos tres dianas mediante dos métodos alternativos. En el método alternativo 1, la etapa A puede implicar la producción de un "complejo primer anticuerpo/primer proteína de marcado" y un "complejo tercer anticuerpo/tercer marcado" preparados en recipientes de reacción diferentes. Tanto el primer complejo como el tercer complejo pueden aplicarse en la etapa C. El resultado sería una muestra biológica marcada con tres complejos diferentes de anticuerpo/proteínas de marcado (es decir, 1º anticuerpo/1ª proteína de marcado; 2º anticuerpo/2ª proteína de marcado; 3º anticuerpo/3ª proteína de marcado). Si la primera, segunda y tercera proteína de marcado comprende marcas detectables diferentes, entonces pueden detectarse un total de tres marcas diferentes en la muestra biológica.

En el método alternativo 2, un segundo anticuerpo y un tercer anticuerpo pueden añadirse en la etapa D, en el que el segundo anticuerpo y el tercer anticuerpo son específicos para diferentes dianas. En la etapa F, puede añadirse una segunda y una tercera proteína de marcado. La segunda proteína de marcado es específica para el segundo anticuerpo mientras que la tercera proteína de marcado es específica para el tercer anticuerpo. Por ejemplo, el segundo anticuerpo y el tercer anticuerpo pueden ser de diferentes subclases de IgG y la segunda y tercera proteínas de marcado pueden ser específicas para una subclase de IgG. Usando este método, pueden detectarse un total de tres marcas diferentes en la muestra biológica.

Aunque el método alternativo 1 y el método alternativo 2 descritos anteriormente describen el uso de dos complejos formados previamente (etapa B) o dos anticuerpos (etapa D), se entiende que el método de la invención no está limitado a dos complejos formados previamente o dos anticuerpos. Puede usarse cualquier número de complejos formados previamente o anticuerpos en el método de la invención. Además, el método alternativo 1 y el método alternativo 2 pueden combinarse. Por ejemplo, si el método alternativo 1 y el método alternativo 2 tal como se han descrito anteriormente se combinaron, puede detectarse un total de cuatro dianas diferentes en una muestra biológica. Adicionalmente si el método alternativo 1 y el método alternativo 2 se combinan, el método alternativo 2 puede repetirse para detectar un total de siete o más dianas diferentes en una muestra biológica.

Para todos los métodos de la invención, los complejos de inmunomarcado no unidos que no se unen a la diana pueden eliminarse opcionalmente de la muestra mediante métodos convencionales, tales como lavado. En una etapa opcional para todos los métodos de la invención, los complejos de inmunomarcado unidos que se unen a la diana pueden estar fijados en su lugar con los fijadores (por ejemplo formaldehído, glutaraldehído) y métodos de fijación habituales. La fijación puede utilizarse para mejorar la durabilidad de la muestra y para impedir la transferencia de la proteína de marcado complejada de forma no covalente a otros anticuerpos de dirección en la muestra que tienen la misma región de unión específica.

Otra realización de la invención se refiere a un método para determinar una diferencia en la cantidad de al menos tres dianas en una sección de tejido de un tejido a ensayar con respecto a la cantidad y distribución de dichas dianas en una sección de tejido de un tejido normal. Dicha comparación puede usarse para determinar si una muestra muestra una distribución anormal de epítomos o antígenos. En primer lugar, el método implica la etapa de detectar una distribución de al menos tres dianas en una primera muestra usando el método de la reivindicación 1. En segundo lugar, una distribución de dianas correspondientes en una muestra normal se detecta usando el método de la reivindicación 1. En tercer lugar, se compara la distribución de epítomos o antígenos de la primera muestra y la muestra normal para determinar si existe una diferencia de distribución entre las dos muestras.

También se desvela un método para análisis *in situ* de una muestra biológica. En primer lugar, un primer anticuerpo que es específico para un primer epítomo se pone en contacto con un primer Fab que es específico para la parte Fc del primer anticuerpo para producir un complejo primer anticuerpo-Fab. El exceso de Fab, no unido al primer anticuerpo puede eliminarse en una etapa opcional. La muestra biológica se pone en contacto a continuación con este complejo primer anticuerpo-Fab y un segundo anticuerpo que es específico para un segundo epítomo para generar una muestra biológica de anticuerpo. En una etapa opcional, el complejo primer anticuerpo-Fab no unido y el segundo anticuerpo no unido pueden eliminarse mediante lavado. Un segundo Fab, que comprende una segunda marca detectable distinguible de la primera marca detectable se pone en contacto a continuación con la muestra biológica. El segundo Fab es específico para la parte Fc del segundo anticuerpo y forma un complejo anticuerpo-Fab con el segundo anticuerpo.

En una etapa opcional, el exceso de segundo Fab puede eliminarse mediante lavado. En la etapa final, la primera y segunda marcas detectables se detectan para determinar la ubicación y distribución de los epítomos. Se entiende que cada marca detectable es detectable individualmente en presencia de todas las demás marcas detectables en la muestra biológica.

5 Aunque no de acuerdo con la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones, podría proporcionarse una plataforma para evaluación cuantitativa multiplexada de antígenos, que combina detección de inmunofluorescencia (IF) con análisis de imágenes asistido por ordenador. El equipo informático (hardware y/o software) podría medir la presencia, intensidad y/o distribución de marca o marcas fluorescentes en imágenes del tejido que resultan de
 10 detección de IF, donde cada marca en una imagen que indica la presencia de un antígeno diana. Este equipo informático podría incluir, por ejemplo, el paquete Definiens Cellenger Developer Studio (v. 4.0) disponible en el mercado adaptado para segmentar y clasificar las imágenes del tejido en objetos (por ejemplo, estroma, luz, núcleos, citoplasma, etc.) y/o para detectar las marcas fluorescentes (figuras 11A, 12A, 20 y 21). El producto Definiens Cellenger puede estar además diseñado y adaptado para ejecutar secuencias de comandos que miden la
 15 presencia, intensidad y/o distribución de las marcas fluorescentes localizadas dentro de compartimentos celulares del tejido específicos (por ejemplo, tales como, las marcas fluorescentes dentro de núcleos o células epiteliales). Estas mediciones (en solitario o en combinación con otras observaciones tales como observaciones clínicas, moleculares y/o morfométricas) pueden estar sujetas a enfoques matemáticos supervisados, incluyendo métodos de aprendizaje automáticos tales como regresión de vector de soporte para datos censurados (SVRc), para generar
 20 modelos para (por ejemplo) diagnóstico y pronóstico de una enfermedad. Los métodos y sistemas para generar modelos y para extraer mediciones a partir de imágenes tisulares se describen en la Publicación estadounidense de propiedad común N° 20050262031.

25 Aunque no de acuerdo con la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones, muestras de tejido procesadas con los métodos de detección de IF descritos en el presente documento podrían colocarse en un microscopio de fluorescencia automatizado Nikon 90i. Se adquieren imágenes fluorescentes usando una cámara multispectral CRI Nuance (Cambridge Research & Instrumentation, Inc.) montada en el microscopio y controlada por el software en línea MetaMorph. También podría usarse otro equipo adecuado para adquisición de imágenes. La siguiente descripción ilustra el uso de adquisición y análisis de imágenes de IF para detectar la presencia del
 30 Receptor de Andrógenos (AR) en el tejido. Un foco del estudio era identificar factores vinculados al crecimiento y el avance del cáncer de próstata.

DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol), acoplado con los anticuerpos para Citoqueratina18 (CK) (DAPI para núcleos y CK18 para células epiteliales), y el receptor de andrógenos se aplicaron a tejido en portaobjetos de micromatriz
 35 tisular (TMA). Se adquirieron imágenes fluorescentes que representaban a cada uno de los núcleos de TMA usando el equipo descrito anteriormente. Más particularmente, se capturaron imágenes de DAPI de 12 bits con la cámara ajustada a 480 nm usando un ajuste de saturación al 50 %. CK 18, marcada con Alexa 488, se adquirió usando un filtro pasabanda FITC (Chroma). Se capturaron imágenes de 12 bits en incrementos de 10 nm partiendo de 520 nm. AR, marcado con Alexa 568 se capturó usando un filtro de paso de onda larga (Chroma). Se capturaron imágenes
 40 de 12 bits en incrementos de 10 nm partiendo a 570 nm. Las pilas de imágenes se desmezclaron usando el software de análisis CRI. Se usaron colorantes Alexa 488 y 568 puros como espectros de referencia para el proceso de desmezclado. Regiones típicas de autofluorescencia y otros objetos fluorescentes (por ejemplo eritrocitos) se asignaron a los perfiles espectrales. Una vez completado el proceso de desmezclado, se almacenaron imágenes cuantitativas en escala de grises en formato tiff para el análisis. Después del desmezclado, las imágenes en escala
 45 de grises se combinan para producir una imagen compuesta para análisis mediante las secuencias de comandos del Definiens Cellenger. Cuando se combinan las imágenes, se usan ID del fragmento y el donador únicos que asocian las imágenes con un paciente.

50 Las secuencias de comandos del Definiens Cellenger segmentan y clasifican las imágenes para detectar y cuantificar la señal de AR presente dentro de núcleos de células epiteliales. También se tomaron mediciones basándose en intensidades del biomarcador y áreas nucleares definidas por segmentación con DAPI, donde las mediciones reflejaban la intensidad global y la distribución de AR presente en tipos celulares específicos. La tabla a continuación incluye una lista de las mediciones derivadas de las imágenes se proporciona en la tabla a continuación.

55

Características cuantitativas inmunofluorescentes del receptor de andrógenos

Características	Definición
averageip0001	Intensidad promedio del marcador AR en núcleos epiteliales
averageip0002	Intensidad promedio de AR en núcleos epiteliales y del estroma
averageipstroma0003	Intensidad promedio del marcador AR en núcleos del estroma
maxip0007	Intensidad máxima de AR en núcleos epiteliales
maxip0008	Intensidad máxima de AR en núcleos epiteliales y de estroma
objetos	
maxipstroma0009	Intensidad máxima de AR en núcleos del estroma
minip0010	Intensidad mínima de AR en núcleos epiteliales

Características

minip0011
minipstroma0012

ratioareaepithnucversusepith0013

correlaobject10005

Definición

Intensidad mínima de AR en núcleos del estroma y epiteliales

AR mínimo en núcleo del estroma

Área de núcleos epiteliales con AR positivo/ Área de núcleos epiteliales con AR negativo

Coefficiente de correlación lineal entre DAPI e imágenes de AR

A partir de la lista de mediciones derivadas para AR, se determinó mediante estrategias matemáticas supervisadas que la característica "ratioareaepithnucversusepith0013" estaba asociada de forma independiente con la recurrencia de PSA cuando se analizaba de forma univariada. Esta característica representa la relación de las áreas de núcleos epiteliales expresados positiva y negativamente con AR. Por lo tanto, estos datos sugieren (por ejemplo) que la cantidad total de AR presente en elementos tanto tumorales como no tumorales es un factor importante en el crecimiento y el avance del cáncer de próstata.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

K.D. BAUER et al.: "Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in diffuse large cell lymphomas", *CANCER RES*, vol. 46, 1986, páginas 3173-3178,

K.D. BAUER et al.: "Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic denocarcinomas", *LAB INVEST*, vol. 57, 1987, páginas 329-335,

H.B. BEVERLOO et al.: "Immunochemical detection of proteins and nucleic acids on filters using small luminescent inorganic crystals as markers". *ANAL. BIOCHEM.*, vol. 203, 1992, páginas 326-334.

R. C. BRAYLAN et al.: "Percentage of cells in the S phase of the cell cycle in human lymphoma determined by flow cytometry: Correlation with labelling index and patient survival", *CYTOMETRY*, vol. 1, 1980, páginas 171-174,

J.K. Brown et al. (2004) Primary antibody- Fab fragment complexes: a flexible alternative to traditional direct and indirect immunolabeling techniques. *J Histochem Cytochem.* 52: 1219-30.

P. CHAN ET AL: "Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization.", *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 2005, vol. 33, no. 18, 13 de octubre de 2005 (13-10-2005), páginas E161-1-E161-8, XP002418825, Oxford UK ISSN: 1362-4962

G.M. CLARK et al.: "Predictions of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry", *N. ENGL J MED*, vol. 320, 1989, páginas 627-633,

R. P. HAUGLAND: "Molecular Probes Handbook Of fluorescent Probes And Research Chemicals", Eugene, OR USA, Molecular Probes Inc., 1996

S.A. PILERI ET AL.: "Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods.", *JOURNAL OF PATHOLOGY*, vol. 183, 9 de octubre de 2011 (09-10-2011), páginas 116-123, Nueva York, NY estados Unidos

M. SEMAR ET AL: "Quantitative comparative immunohistology", *CLINICAL CHEMISTRY*, vol. 15, no. 6, 1 de enero de 1969 (01-01-1969), Winston-Salem NC Estados Unidos

R. SILVESTRINI et al.: "Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer", *CANCER*, vol. 56, 1985, páginas 1982-1987,

H. SIGURDSSON et al.: "Indicators of prognosis in node-negative breast cancer", *N ENGL J MED*, vol. 322, 1990, páginas 1045-1053,

J.R. Tuson et al. (1990) A novel immunohistochemical technique for demonstration of specific binding of human monoclonal antibodies to human cryostat tissue sections. *J Histochem Cytochem* 38: 923-6.

D. Visscher et al. Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometric DNA analysis in carcinoma of the breast. *Pathol Ann* 1990, 25 (Parte I), 171-210.

D.S. Weinberg. Proliferation indices in solid tumors. *Adv Pathol Lab Med* 1992, 5(1), 163-191.

D.S. Weinberg. Relative applicability of image analysis and flow cytometry in clinical medicine. en: D. Baer et al. *Flow cytometry: principles and applications*. Baltimore MD, Williams and Wilkens, 1992, 359-372.

G. M. Wessel & D.R. McClay: "Two embryonic tissue-specific molecules identified by a double-label

immunofluorescence technique for monoclonal antibodies", Journal of Histochem & Cytochem, HISTOCHEMICAL SOCIETY, NUEVA YORK, NY, estados Unidos, vol. 34, no. 6, 1 de enero de 1986 (01-01-1986), páginas 703-706, XP002387587,USA ISSN: 0022-1554

5 REFERENCIAS DE PATENTES

- EP 1065 250
- 10 US 4520110
- US 4859582
- US 5055556
- US 5208148
- US 5242805
- 15 US 5362628
- US 5576424
- US 5773236
- US 5830912
- US 5316906
- US 5443986
- 20 US 5132432
- US 4981977
- US 5268486
- US 5569587
- US 5569587
- 25 US 5569766
- US 5486616
- US 5627027
- US 5808044
- US 5877310
- 30 US 6002003
- US 6004536
- US 6008373
- US 6043025
- US 6127134
- 35 US 6130094
- US 6133445
- US 4774339
- US 5187288
- US 5248782
- 40 US 5274113
- US 5433896
- US 6162931
- US 6130101
- US 6229055
- 45 US 6339392
- US 5451343
- US 4714763
- US 4810636
- 50 US 5696157
- US 5459276
- US 5501980
- US 5830912
- US 4603209
- 55 US 4849362
- US 4812409
- US 5242805
- US 5227487
- US 5442045
- 60 US 5798276
- US 5846737
- US 4945171
- 65 US 09/968401
- US 09/968401
- US 09/557275

US 09/557275
 US 09/969853
 US 09/968401
 US 09/922333
 5 US 09/129015
 US 09/968401
 US 09/ 969853

10 US 2005/262031

WO 03/030817
 WO 02/26891
 WO 02/26891
 WO 97/40104
 15 WO99/51702
 WO 01/21624

Ejemplos

20 **EJEMPLO 1: MÉTODOS GENERALES DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Los siguientes métodos se usan generalmente durante los métodos de detección Multiplex de acuerdo con la invención

25 Recuperación de antígenos:

1. Desparafinar y rehidratar las muestras de tejido según el Leica 5020 SOP convencional.
2. Precalentar 250 ml de solución de recuperación de antígenos Reveal 1X a ebullición en un baño de agua en microondas (calentar la solución durante siete (7) minutos al nivel de potencia siete (7)).
- 30 3. Colocar portaobjetos en el recipiente de la solución Reveal 1X en ebullición. Permitir la ebullición durante 8,0 minutos tal como se ha descrito anteriormente.
4. Una vez completado, retirar el recipiente del baño de agua de microondas y dejar enfriar durante 20 minutos.
5. Aclarar los portaobjetos en PBS brevemente seguido por 1 x 5 minutos a temperatura ambiente.
- 35 6. Colocar los portaobjetos en el aparato Nemesis 7200 y comenzar el programa de autotinción.

Permeabilización del tejido:

40 Incubar portaobjetos en PBT (PBS con Triton-X al 0,2 %) durante 30 minutos. El PBT se prepara de la siguiente manera:

Reactivo	Proveedor	Nº de catálogo	Dilución / [Conc.]	Cantidad	Volumen final
Tampón Difco FA	Fisher	223142	1X	1,0 g	
Triton-X 100	Fisher	BP151-500	0,2 %	2,0 ml	
Tween 20 al 20 %	BioCar e	TWN20H	1,0 %	50,0 ml	
ddH2O	---	---	---	948,0 ml	1000 ml

Eliminación de la autofluorescencia:

45 Incubar portaobjetos en ácido-alcohol (HCL al 1 % en EtOH al 70 %) durante 20 minutos. El ácido-alcohol se prepara de la siguiente manera:

Reactivo	Proveedor	Nº de catálogo	Dilución / [Conc.]	Cantidad	Volumen final
EtOH de grado 200	Sigma	E7023-4L	grado 140	7,28 ml	
HCl	Fisher	A144S-500	1,0 %	0,1 ml	
Tween 20 al 20 %	BioCar e	TWN20H	1,0 %	0,52 ml	
ddH2O	---	---	---	2,5 ml	10,4 ml

Etapas de tratamiento previas al anticuerpo

50 Para ayudar a penetrar en las estructuras celulares del tejido, las muestras se incubaron en PBS que contenía Triton-X 100 al 0,2 % (PBT) a temperatura ambiente durante treinta minutos, seguido por tres aclarados de tres minutos cada uno en PBS. Para ayudar a reducir la autofluorescencia en el tejido, las muestras se incubaron en HCl

al 1 % en etanol al 70 % a temperatura ambiente durante veinte minutos, seguidos por tres aclarados de tres minutos cada uno en PBS. El bloqueo de sitios de unión no específicos se realizó incubando los portaobjetos en reactivo de bloqueo al 1 % (10,0 mg/ml de BSA en PBS) a temperatura ambiente durante veinte minutos. No se realizaron lavados entre la etapa de bloqueo y la posterior etapa de hibridación.

5

Hibridación de anticuerpos específicos de diana con muestras biológicas

Los anticuerpos específicos para una diana se hibridan, por ejemplo, de la siguiente manera:

10 Un cóctel de anticuerpo anti-citoqueratina 18 (CK18) (Calbiochem) diluido a 1:7000 y anticuerpo receptor de andrógenos (AR) (clon AR441, LabVision) diluido a dilución 1:5 se preparó en reactivo de bloqueo al 1 %. Aproximadamente 100 µl de este cóctel del anticuerpos se aplicó a la muestra de tejido, y se permitió hibridar a los anticuerpos y las muestras de tejido en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. A la hibridación le siguieron dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS y un aclarado de tres minutos en PBS.

15

Marcado de anticuerpos específicos de diana hibridados

Anticuerpos específicos de diana hibridados se marcan de forma fluorescente, por ejemplo, de la siguiente manera:

20

Un cóctel de fragmento Fab de IgG anti-conejo Zenon Alexa Fluor 488 y fragmento Fab de igG1 anti-ratón Zenon Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA) se preparó en reactivo de boqueo al 1 % a dos veces las concentraciones recomendadas por el fabricante (dilución 1:50 para cada fragmento Fab). Aproximadamente 100 µl de este cóctel de marcado se aplicaron a las muestras de tejido, que se incubaron a continuación en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la reacción de marcado le seguían dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS y un aclarado de tres minutos en PBS.

25

Detección Multiplex

30 Múltiples dianas en una única muestra se detectan usando, por ejemplo, el siguiente protocolo. Para identificar 5 dianas en una única sección de próstata usando el siguiente protocolo: Se preparó un cóctel de anti-racemasa (AMACR; clon 13H4, Zeta Corporation) a una dilución 1:50 con anticuerpo sin diluir contra citoqueratina de alto peso molecular + p63 (HMW CK + p63; BioCare Medical). Aproximadamente 100 µl de este cóctel de anticuerpos se aplicaron a la muestra de tejido, y se dejó que los anticuerpos se unieran en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. A la incubación le seguían dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS y un aclarado de tres minutos en PBS.

35

Para la etapa de marcado, un cóctel de fragmento Fab de IgG anti-conejo Zenon Alexa Fluor 488, fragmento Fab de IgG1 anti-ratón Zenon Alexa Fluor 555, y fragmento Fab de IgG2a anti-ratón Zenon Alexa Fluor 594 se preparó en reactivo de boqueo al 1 % a dos veces las concentraciones recomendadas por el fabricante (dilución 1:50 para cada fragmento Fab). Aproximadamente 100 µl de este cóctel de marcado se aplicaron a las muestras de tejido, y las muestras de tejido se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la reacción de marcado le seguían dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS y un aclarado de tres minutos en PBS.

45

Las muestras de tejido se trataron a continuación con una segunda ronda de unión a anticuerpo y marcado. Un cóctel de anti-CK-18 a una dilución 1:6000 y anti-AR a una dilución 1:5 se preparó en reactivo de boqueo al 1 %. Aproximadamente 100 µl de este cóctel de anticuerpos se aplicaron a la muestra de tejido, y se dejó que los anticuerpos se unieran en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. A la hibridación le siguieron dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS y un aclarado de tres minutos en PBS.

50

Para la segunda etapa de marcado, un cóctel de fragmento Fab de IgG anti-conejo Zenon Alexa Fluor 647 y fragmento Fab de IgG1 anti-ratón Zenon Alexa Fluor 568 se preparó en reactivo de boqueo al 1 % a la concentración recomendada por el fabricante (dilución 1:100 para cada fragmento Fab). Aproximadamente 100 µl de este cóctel de marcado se aplicaron a las muestras de tejido, y las muestras de tejido se incubaron y se aclararon tal como se ha descrito para la primera etapa de marcado.

55

EJEMPLO 2: DETECCIÓN MULTIPLEX DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS, CITOQUERATINA Y AMACR

60

Se ha descubierto que el receptor de andrógenos (AR), Citoqueratina 18 y AMACR son importantes biomarcadores para la evaluación del tejido con cáncer de próstata. La distribución cualitativa y cuantitativa de estos marcadores en secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas con formalina o micromatrices tisulares se detectaron tal como se describe a continuación. En este estudio se usaron muestras de hasta 16 años de antigüedad.

65

1.) Recuperación de antígenos (en solución Reveal, tampón citrato o proteinasa K)

Para la recuperación de antígenos, secciones de tejido o TMA se calentaron en solución Reveal 1X (BioCare Medical) en una cámara de recuperación “*decloaking chamber*” de acuerdo con un protocolo convencional y a continuación se les deja enfriar durante 15 minutos. Métodos alternativos de recuperación de antígenos incluyen: 1) calentar secciones de tejido o TMA en tampón citrato 10 mM, pH 6,0, durante 15 minutos en un microondas calibrado seguido por refrigeración durante 15 minutos o 2) digerir enzimáticamente secciones de tejido o TMA en una solución de proteinasa K (disponible en el mercado de Fisher como reactivo listo para usar para recuperación de antígenos durante 12 - 15 minutos. Después de aclarar en agua destilada durante 15 minutos (esta etapa se salta para recuperación de antígenos con proteinasa K), los portaobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos en solución salina tamponada por fosfato (PBS).

2.) Eliminación de autofluorescencia

La autofluorescencia se redujo incubando los portaobjetos en HCl al 1 %/ EtOH al 70 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon a continuación 3 veces durante 5 minutos en PBS.

3.) Permeabilización del tejido

El tejido se permeabilizó posteriormente en PBS que contenía Triton X al 0,2 % (PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4.) Bloqueo con IgG inespecífica

La unión no específica de anticuerpo o fragmento Fab se bloqueó mediante incubación con 0,5 µg/ul de BSA en PBT durante 20 minutos en una cámara húmeda. Los portaobjetos se aclararon posteriormente en PBT durante 5 minutos.

5.) Preparación del complejo formado previamente para Citoqueratina 18 y Fab

Se incubó Citoqueratina 18 monoclonal de ratón con fragmento Fab específico de ratón marcado con Alexa 488 para preparar un complejo formado previamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, ese Fab no unido se neutralizó añadiendo una IgG de ratón no específica IgG en exceso.

6.) Incubación de anticuerpos primarios no tratados y el complejo formado previamente en tejido

El complejo de Citoqueratina 18-Fab formado previamente y CD34 policlonal de conejo no tratado y anticuerpo pTEN monoclonal de ratón se incubaron en el tejido durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

7.) Eliminación de anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguido por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

8.) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

Un fragmento Fab específico de ratón y de conejo marcados con Alexa 555 y Alexa 594 respectivamente se añadieron al portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

9.) Eliminación de Fab no unido

El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguido por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

10.) Fijación

El tejido se fijó en formalina al 10 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se aclararon 2 veces durante 5 minutos en PBS.

11.) Montaje

Después de añadir 100 µl de solución AntiFade que contenía contratinción nuclear, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se prepararon para la captura de imágenes.

12.) Adquisición de imágenes

Las muestras se colocaron en un microscopio de fluorescencia automatizado 90i. Las regiones de interés se

5 identificaron moviendo los ejes y-x de la platina del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó al nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquirieron con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa podría usarse una cámara de imaginología espectral para separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardaron en formato tiff y se sometieron a análisis cuantitativo de la imagen.

EJEMPLO 3: DETECCIÓN MULTIPLEX DE EGFR, FOSFO-EGFR Y CITOQUERATINA 18

10 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y miembros de señalización cadena abajo han demostrado recientemente estar sobreexpresados en ciertos tipos de tumor. Como resultado, otro grupo de biomarcadores en análisis son EGFR, fosfo-EGFR y Citoqueratina 18. Para medir, la distribución cualitativa y cuantitativa de estos biomarcadores en secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas con formalina o micromatrices tisulares se detectaron de la siguiente manera:

15 Desparafinación y rehidratación de muestras de tejido realizada en la máquina de procesamiento de portaobjetos automatizada Discovery XT (Ventana Medical, Tuscan AZ).

1.) Recuperación de antígenos (Proteinasa K)

20 Para recuperación de antígenos, se incubaron secciones de tejido o TMA en una solución de proteinasa K (disponible en el mercado como un reactivo listo para usar para recuperación de antígenos) durante 12 - 15 minutos. Esto se aplicó a portaobjetos en la etapa de "pretratamiento 1" del protocolo de la máquina usando un dispensador rellenable por el usuario (pretratamiento 3).

2.) Permeabilización del tejido

Muestras de tejido se permeabilizaron posteriormente en PBS que contenía Triton X al 0,2 % (PBT) durante 28 minutos a temperatura ambiente, aplicado en la etapa de "pretratamiento 2" del protocolo usando un dispensador rellenable por el usuario (enzima 3).

3.) Eliminación de autofluorescencia

30 La autofluorescencia se redujo incubando los portaobjetos en HCl al 1 %/EtOH al 70 % durante 16 minutos a temperatura ambiente, aplicado en la etapa de pretratamiento 3 del protocolo usando un dispensador rellenable (pretratamiento 4).

4.) Bloqueo con IgG inespecífica

40 La unión no específica de anticuerpo o fragmentos Fab se bloqueó mediante incubación con 0,5 µg/ul de BSA en PBT durante 20 minutos en una cámara húmeda. Esto se aplicó a portaobjetos la etapa "Opción" del protocolo usando un dispensador rellenable por el usuario (opción 1).

5.) Incubación de anticuerpos primarios no tratados

45 Se diluyeron EGFR monoclonal de ratón y anticuerpo fosfo-EGFR policlonal de conejo juntos en su dilución de trabajo respectiva y se aplicaron manualmente a portaobjetos durante la etapa de valoración manual en el aparato Discovery XT (Ventana Medical, Tuscan AZ). El funcionamiento del Discovery XT se reinició durante un periodo de incubación de una hora.

6.) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

50 Fragmentos Fab específico de ratón y de conejo marcados con Alexa 594 y Alexa 555 respectivamente se añadieron de forma manual al portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos. El funcionamiento del Discovery XT se reinició y se le dejó funcionar hasta que se completó.

8.) Eliminación del anticuerpo no unido

60 Una vez completado el funcionamiento, los portaobjetos se retiraron del Discovery XT, se colocaron en una gradilla para portaobjetos 2 veces durante 6 minutos cada una en PBT a temperatura ambiente. A continuación los portaobjetos se aclararon de nuevo 2 veces durante 3 minutos en PBS.

7.) Incubación del tercer anticuerpo primario no tratado

65 Citoqueratina 18 monoclonal de ratón se diluyó a su dilución de trabajo y se añadió a los portaobjetos para incubación de una hora a temperatura ambiente.

8.) Incubación con el tercer Fab marcado de forma fluorescente

El fragmento Fab específico de ratón marcado con Alexa 488 se añadió al portaobjetos y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5

9.) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 6 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 3 minutos en PBS.

10

9.) Eliminación de Fab no unido

El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

15

10.) Fijación

Los tejidos se fijaron en formalina al 10 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se aclararon a continuación 2 veces durante 5 minutos en PBS.

20

11.) Montaje

Después de añadir 100 µl de solución AntiFade que contenía contratinción nuclear, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se prepararon para la captura de imágenes.

25

12.) Adquisición de imágenes

Las muestras se colocaron en un microscopio de fluorescencia automatizado 90i. Las regiones de interés se identificaron moviendo los ejes y-x de la platina del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó dentro de la cámara al nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquirieron con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa podría usarse una cámara de imaginología espectral para separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardaron en formato tiff y se sometieron a análisis cuantitativo de la imagen.

30

35 EJEMPLO 4: DETECCIÓN MULTIPLEX DE VEGF, KDR, P-KDR Y CD34

La angiogénesis es un proceso crítico para el crecimiento y la metástasis tumorales. Se ha descubierto que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor VEGFR-2 (KDR) junto con CD34 son importantes biomarcadores para la evaluación de la neovascularización y la angiogénesis. Para medir, la distribución cualitativa y cuantitativa de estos biomarcadores en secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas con formalina o micromatrices tisulares se detectaron de la siguiente manera;

40

1.) Recuperación de antígenos (en solución Reveal)

Para la recuperación de antígenos, secciones de tejido o TMA se calentaron en solución Reveal 1X (BioCare Medical) en una cámara de recuperación "decloaking chamber" de acuerdo con un protocolo convencional y a continuación se les deja enfriar durante 15 minutos. Métodos alternativos de recuperación de antígenos incluyen: 1) calentar secciones de tejido o TMA en tampón citrato 10 mM, pH 6,0, durante 15 minutos en un microondas calibrado seguido por refrigeración durante 15 minutos. Después de aclarar en agua destilada durante 15 minutos, los portaobjetos se lavarían 3 veces durante 5 minutos en solución salina tamponada por fosfato (PBS).

50

2.) Permeabilización del tejido

Muestras de tejido se permeabilizaron posteriormente en PBS que contenía Triton X al 0,2 % (PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

55

3.) Eliminación de autofluorescencia

La autofluorescencia se redujo incubando los portaobjetos en HCl al 1 %/EtOH al 70 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon a continuación 3 veces durante 5 minutos en PBS.

60

4.) Bloqueo con IgG inespecífica

La unión no específica de anticuerpo o fragmento Fab se bloqueó mediante incubación con 0,5 µg/ul de BSA en PBT durante 20 minutos en una cámara húmeda. Los portaobjetos se aclararon posteriormente en PBT durante 5 minutos.

65

5.) Incubación de anticuerpos primarios no tratados

VEGF monoclonal de ratón y KDR policlonal de conejo se diluyeron juntos a dilución de trabajo y se añadieron a portaobjetos para incubación de una hora en una cámara húmeda.

5

6.) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 6 minutos en PBT seguidas por 2 veces durante 3 minutos en PBS.

10

7.) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

Fragmentos Fab específico de ratón y de conejo marcados con Alexa 488 y Alexa 555 respectivamente se añadieron al portaobjetos y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos.

15

8.) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

20

9.) Incubación del segundo agrupamiento de anticuerpos primarios no tratados

CD34 monoclonal de ratón y fosfo-KDR policlonal de conejo se diluyeron juntos a dilución de trabajo y se añadieron a portaobjetos para incubación de una hora en una cámara húmeda.

25

10.) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 6 minutos en PBT seguidas por 2 veces durante 3 minutos en PBS

30

11.) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

Fragmentos Fab específico de ratón y de conejo marcados con Alexa 568 y Alexa 594 respectivamente se añadieron al portaobjetos y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos.

35

12.) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

40

10.) Fijación

El tejido se fijó en formalina al 10 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se aclararían a continuación 2 veces durante 5 minutos en PBS.

45

11.) Montaje

Después de añadir 100 µl de solución AntiFade que contenía contratinción nuclear, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se prepararon para la captura de imágenes.

50

12.) Adquisición de imágenes

Las muestras se colocaron en un microscopio de fluorescencia automatizado 90i. Las regiones de interés se identificaron moviendo los ejes y-x de la platina del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó dentro de la cámara al nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquirieron con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa podría usarse una cámara de imaginología espectral para separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardaron en formato tiff y se sometieron a análisis cuantitativo de la imagen.

55

60 EJEMPLO 5: DETECCIÓN MULTIPLEX DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS, CITOQUERATINAS, α -METILACILCOA-RACEMASA, P63, CD34 Y NFKB

Se ha descubierto que el receptor de andrógenos (AR, IgG1 de ratón), Citoqueratina-18 (IgG de conejo), Metilacil-CoA Racemasa (AMACR, IgG de conejo), Citoqueratina de alto peso molecular (HMWCK, IgG1 de ratón), P63 (IgG2a de ratón), CD34 (IgG1 de ratón) y NFKB (IgG de conejo) son importantes biomarcadores para la evaluación de tejido con cáncer de próstata. La distribución cualitativa y cuantitativa de estos marcadores en secciones de tejido

65

incluidas en parafina, fijadas con formalina o micromatrices tisulares, se detectaron de la siguiente manera:

1.) Recuperación de antígenos (en solución Reveal, tampón citrato o proteinasa K)

5 Para la recuperación de antígenos, secciones de tejido o TMA se calentaron en solución Reveal 1X (BioCare Medical) en una cámara de recuperación "decloaking chamber" de acuerdo con un protocolo convencional y a continuación se les deja enfriar durante 15 minutos. Métodos alternativos de recuperación de antígenos incluyen: 1) calentar secciones de tejido o TMA en tampón citrato 10 mM, pH 6,0, durante 15 minutos en un microondas calibrado seguido por refrigeración durante 15 minutos o 2) digerir enzimáticamente secciones de tejido o TMA en una solución de proteinasa K (disponible en el mercado como un reactivo listo para usar para recuperación de antígenos) durante 12 -15 minutos. Después de aclarar en agua destilada durante 15 (esta etapa se salta para recuperación de antígenos con proteinasa K), los portaobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos en solución salina tamponada por fosfato (PBS).

15 2.) Eliminación de autofluorescencia

La autofluorescencia se redujo incubando los portaobjetos en HCl al 1 %/EtOH al 70 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon a continuación 3 veces durante 5 minutos en PBS.

20 3.) Permeabilización del tejido

El tejido se permeabilizó posteriormente en PBS que contenía Triton X al 0,2 % (PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

25 4.) Bloqueo con IgG inespecífica

La unión no específica de anticuerpo o fragmento Fab se bloqueó mediante incubación con 0,5 µg/ul de BSA en PBT durante 20 minutos en una cámara húmeda. Los portaobjetos se aclararon posteriormente en PBT durante 5 minutos.

30 5.) Preparación del complejo formado previamente para cóctel de Citoqueratina de alto peso molecular/p63 y AMACR.

35 Anticuerpos citoqueratina de alto peso molecular monoclonal de ratón/P63 y AMACR policlonal de conejo se valoraron con el mismo anticuerpo de unión no específico y se incubaron en tejido durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

6.) Eliminación del anticuerpo no unido

40 El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS, 5 y 3 minutos respectivamente.

7.) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

45 Fragmentos Fab específicos de ratón y de conejo marcados con Alexa 488, Alexa 555 y Alexa 594 respectivamente se añadieron al portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

8.) Eliminación de Fab no unido

50 El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS 5 y 3 minutos respectivamente.

9.) Preparación del complejo formado previamente para Citoqueratina 18 y el receptor de andrógenos

55 Anticuerpos Receptor de andrógenos (AR) monoclonal de ratón y Citoqueratina 18 policlonal de conejo se valoraron con el mismo anticuerpo de unión no específico y se incubaron en tejido durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda

60 10) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS, 5 y 3 minutos respectivamente.

65 11) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

Fragmentos Fab específico de ratón y de conejo marcados con Alexa 680 y Alexa 568 respectivamente se añadieron

al portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

12) Eliminación de Fab no unido

- 5 El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS 5 y 3 minutos respectivamente.

13) Preparación para una aplicación durante una noche de anticuerpo CD34

- 10 Anticuerpo CD34 monoclonal de ratón se valoró con el mismo anticuerpo de unión no específico y se incubó durante una noche a 4 grados en una cámara húmeda cerrada.

14) Recuperación de portaobjetos refrigerados

- 15 Después de retirar los portaobjetos del refrigerador, los portaobjetos se dejaron a temperatura ambiente dentro de la cámara húmeda cerrada durante 1 h.

15) Eliminación del anticuerpo no unido

- 20 El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS, 5 y 3 minutos respectivamente.

16) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

- 25 Fragmento Fab específico de ratón y de conejo marcado con Alexa 647 se añadió al portaobjetos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

17) Eliminación de Fab no unido

- 30 El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS 5 y 3 minutos respectivamente.

18) Preparación para una aplicación de anticuerpo NFkB

- 35 NFkB policlonal de conejo se valoró con el mismo anticuerpo de unión no específico y se incubó en tejido durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

19) Eliminación del anticuerpo no unido

- 40 El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidos por 2 en PBS, 5 y 3 minutos respectivamente.

20) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

- 45 Se añadió fragmento Fab específico de conejo marcado con Alexa 660 al portaobjetos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

21) Eliminación de Fab no unido

- 50 El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en PBT seguidas por 2 en PBS 5 y 3 minutos respectivamente.

22) Fijación

- 55 El tejido se fijó en formalina al 10 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se aclararon 2 veces durante 5 minutos en PBS. 20

23) Montaje

- 60 Después de añadir 100 µl de solución AntiFade que contenía contratinción nuclear, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se prepararon para la captura de imágenes.

24) Adquisición de imágenes

- 65 Las muestras se colocaron en un microscopio de fluorescencia automatizado 90i. Las regiones de interés se identificaron moviendo los ejes y-x de la platina del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó al

nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquirieron con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa podría usarse una cámara de imaginología espectral para separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardaron en formato tiff y se sometieron a análisis cuantitativo de la imagen.

5 EJEMPLO 6: DETECCIÓN MULTIPLEX DE CITOQUERATINA 18, AMACR RACEMASA, RECEPTOR DE ANDRÓGENOS, QUERATINA DE ALTO PESO MOLECULAR Y P63 EN TEJIDO DE PRÓSTATA

10 Se usó el ensayo MultiPlex convencional para detectar 5 marcadores incluyendo CK18 (Citoqueratina 18), AMACR (Racemasa), AR (Receptor de andrógenos), HMWK (Queratina de alto peso molecular), p63 (células basales) y DAPI para identificar núcleos en secciones de tejido de próstata incluidas en parafina, fijadas con formalina.

15 Se estudiaron una sección teñida con H&E (Hematoxilina y Eosina) y cinco secciones en parafina no teñidas de 6 pacientes individuales. Las secciones de H&E fueron evaluadas por dos patólogos para la calidad global y el contenido tumoral. Utilizando un protocolo multiplex convencional descrito en los EJEMPLOS 1-4 anteriores, se realizó un ensayo quintplex que incluía una evaluación de CK18, AMACR, AR, HMWK y p63 en un único portaobjetos de cada paciente. Se utilizó una tinción con DAPI para identificar núcleos. Se realizaron en paralelo muestras de tejido de próstata de control positivas y negativas a partir de una micromatriz tisular. Se adquirieron tres imágenes a partir de regiones seleccionadas, se procesaron y se analizaron posteriormente. Se exportaron datos y se asociaron medidas cuantitativas con imágenes individuales.

25 Todas las muestras de los seis pacientes contenían grados variables de tumor con elementos benignos y PIN asociados. La calidad global del material seccionado era aceptable y todas las muestras se ensayaron con el M-Plex quintplex. Se adquirieron imágenes por triplicado de cada sección de tejido de próstata. Se procesaron imágenes individuales en escala de grises en formato tiff usando software de imaginología espectral y a continuación se analizaron con los algoritmos inmunofluorescentes para generar características cuantitativas. Se generaron unas 90 características individuales usando las secuencias de comandos de análisis de imágenes. Las características representan diversas características fenotípicas de compartimentos celulares y su asociación con un biomarcador específico. Por ejemplo, los antígenos/biomarcador en cuestión son interrogados basándose en su distribución celular así como la media y la desviación estándar globales con respecto a su intensidad (cantidad) que se deriva de los niveles de píxel (px). Las secuencias de comandos individuales para el ensayo quintplex se han normalizado previamente para justificar variaciones con respecto a grosor del tejido, variabilidad en penetración de fijador y calidad/acceso de antígeno. Como medio de ilustración, dos de los seis pacientes se analizarán en las siguientes secciones.

35 Las imágenes adquiridas de las muestras de tejido de ensayo se evaluaron basándose en una revisión de las imágenes segmentadas (figura 11A; nótese la clave de color para clasificación específica) y de escala de grises para AR (figura 11B) y AMACR (figura 11C; NS se refiere a la unión no específica de AMACR al estroma).

40 Para el paciente ID 4754-2, la intensidad promedio de AR presente dentro de células epiteliales que son positivas para AMACR era de 0,45 frente a 0,43 para células negativas para AMACR, ilustrando que, incluso aunque hay más glándulas positivas para AMACR presentes, la intensidad promedio de AR dentro del grupo positivo para AMACR es baja cuando se compara con la población celular negativa para AMACR. Además, la cantidad promedio de intensidad de AR en el estroma era de 3,09, el área relativa de núcleos epiteliales que son positivos para AR y positivos para AMACR era de 0,20, el área relativa de todos los núcleos epiteliales que son positivos para AR era de 0,61 y finalmente la intensidad global de AMACR era de 324.849 píxeles. Los resultados de características de imaginología definen sutiles diferencias entre regiones de interés seleccionadas, tipos celulares y sus antígenos asociados; permitiendo que estas diferencias sean cuantificadas y a continuación incluidas dentro de modelos predictivos o evaluadas individualmente con respecto a resultado/respuesta. Para la construcción de modelos, se evalúan características específicas con respecto a un resultado y su nivel de precisión es evaluado mediante un intervalo de confianza. Las características son cribadas inicialmente dentro del contexto de un conjunto de formación y a continuación se validan en una cohorte externa para confirmación.

55 Este estudio confirma la capacidad para aplicar el ensayo multiplex quintplex en secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas con formalina externas. El ensayo tuvo éxito en las muestras de los 6 pacientes r, con completa adquisición de imágenes, procesamiento y generación de características cuantitativas que evalúan los niveles y la intensidad del receptor de andrógenos y AMACR en muestras de tejido individuales.

60 Además, el quintplex se realizó en LNCaP y PC3 fijadas con formalina e incluidas en parafina que se conoce de numerosas publicaciones que muestran niveles tanto altos (LNCaP) como bajos (PC3) de expresión de AR, respectivamente. La asociación de un valor cuantitativo al contenido de AR dentro de estas líneas celulares es el primer paso hacia el entendimiento de la modulación de AR y el impacto sobre moléculas efectoras aguas abajo tal como se demuestra mediante la reducción de AMACR dentro de las células PC3. Estas estrategias in vitro son el primer paso hacia el examen de la respuesta de AR a un fármaco (es decir terapia de privación de andrógenos (ADT), inhibidores de histona desacetilasa, HDAC)) y puede prolongarse fácilmente a muestras clínicas del paciente incluyendo aspirados con aguja, muestras de biopsia para determinar la respuesta (sobre la diana), la valoración y la

eficacia de un fármaco.

EJEMPLO 7: DETECCIÓN MULTIPLEX DE CD4, CD8, CD25, CD69 Y CD86

5 El objeto de este estudio era desarrollar los ensayos Multiplex (M-Plex) inmunofluorescentes necesarios para los CD4, CD8, CD25, CD69 y CD86 propuestos más CK18. La CK18 es retenida dentro de los dos ensayos m-plex finales para identificar compartimentos tisulares (epitelial frente a estroma) para desarrollo de una secuencia de comandos cuantitativa. Este proceso conlleva la identificación de fuentes comerciales apropiadas para todos los reactivos, desarrollo de ensayo incluyendo valoración, selección del fluoróforo Alex y análisis usando ambas
10 muestras de tejido de control no de próstata. El objetivo era completar el desarrollo de los ensayos tanto simplex como M-plex para cada uno de los marcadores y adquirir imágenes que puedan utilizarse posteriormente para desarrollo de una secuencia de comandos cuantitativa.

15 Varias fuentes comerciales para los antígenos/anticuerpos específicos que se incluyeron en el desarrollo de los ensayos M-plex (véase la tabla 1).

Tabla 1

Anticuerpo	Proveedor	Nº de catálogo	Clon	Isotipo	Dilución
CK-18 (R)	CalBiochem	AP1021	péptido sintético	RlgG	1:1250
CD4	Vector Labs	VP-C318	1F6	MIgG1	1:10
CD8	Vector Labs	VP-C325	1A5	MIgG1	1:10
CD25	LabVision	MS-203-P1	4C9	MIgG1	1:200
CD69	BioLegend	310902	FN50	MIgG1	1:10
CD86	GeneTex	74653	BU63	MIgG1	1:10

20 Utilizando una serie de muestras de tejido de control incluyendo amígdalas, ganglio linfático y bazo se valoraron cada uno de los anticuerpos individuales y fueron evaluados por el patólogo para fondo, y especificidad/sensibilidad de la señal basándose en la distribución y la localización celular. Los anticuerpos son ensayados, cada uno, individualmente en un formato simplex IF y a continuación se hicieron avanzar rápidamente al ensayo m-plex de acuerdo con los métodos perfilados a continuación.

25 **Inmunofluorescencia cuantitativa**

Se realizaron desparafinación y rehidratación de muestras de tejido mediante procedimientos convencionales en un aparato para autotinción Leica 5020. Se realizó recuperación de antígenos llevando a ebullición los portaobjetos en un horno microondas durante 7,0 minutos en solución Reveal 1X. Se dejó enfriar a los portaobjetos durante 20
30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se lavaron dos veces durante tres minutos en PBS.

Todas las muestras de tejido se tiñeron a temperatura ambiente en un aparato para tinción de portaobjetos automatizado Nemesis 7200 de BioCare Medical. Las muestras de tejido se sometieron a las siguientes etapas de tratamiento prehibridación. Para ayudar a penetrar en las estructuras celulares del tejido, las muestras se incubaron en PBT (PBS + Triton-X 100 al 0,2 %) durante treinta minutos, seguidos por un aclarado de tres minutos en TBS. Para ayudar a reducir la autofluorescencia en el tejido, las muestras se incubaron en HCl al 1 % en EtOH al 70 %
35 durante veinte minutos, seguidos por un aclarado de tres minutos en TBS. El bloqueo de sitios de unión no específicos se realizó incubando los portaobjetos en reactivo de bloqueo (PBT que contenía 1,0 mg/ml de BSA) durante veinte minutos. No se realizaron lavados entre la etapa de bloqueo y la posterior etapa de hibridación.

40 Para el multiplex triplex I final, se preparó una dilución 1:200 de CD25 (4C9) en reactivo de bloqueo. Para el multiplex duplex final, una dilución 1:10 de CD8 (1A5) se preparó en reactivo de bloqueo. Aproximadamente 400,0 µl del anticuerpo apropiado se aplicaron a la muestra de tejido, y se permitió hibridar a los anticuerpos y las muestras de tejido durante una hora. A la hibridación le seguía un aclarado de tres minutos en TBS.

45 El multiplex triplex se marcó con Zenon Alexa Fluor de ratón 532, diluido en reactivo de bloqueo a dos veces las concentraciones recomendadas por el fabricante (dilución 1:50). El multiplex duplex se marcó con Zenon Alexa Fluor de ratón 594, diluido tal como se ha descrito. Aproximadamente 400,0 µl de la marca apropiada se aplicaron a las muestras de tejido, y las muestras de tejido se incubaron durante treinta minutos. A la reacción de marcado le seguía un aclarado de tres minutos en TBS.
50

Las muestras de tejido para ambos ensayos multiplex se trataron a continuación con una segunda ronda de hibridación y marcado. Para el triplex, se preparó una dilución 1:10 de CD69 (FN50) en reactivo de bloqueo. Para el duplex, se preparó un cóctel de Citoqueratina 18 (CK-18) a una dilución 1:1.000 y CD86 (BU63) a una dilución 1:10
55 en reactivo de bloqueo. Aproximadamente 400,0 µl del cóctel de anticuerpos apropiado se aplicaron a la muestra de

tejido, y se permitió hibridar a los anticuerpos y las muestras de tejido durante una hora. A la hibridación le seguía un aclarado de tres minutos en TBS.

5 Para la segunda etapa de marcado, el triplex se marcó con Zenon Alexa Fluor de ratón 555, diluido tal como se ha descrito. El duplex se marcó con un cóctel de Zenon Alexa Fluor de ratón 555 y Zenon Alex Fluor de conejo 647, diluido tal como se ha descrito. Aproximadamente 400,0 µl de la marca o marcas apropiadas se aplicaron a las muestras de tejido, y las muestras de tejido se incubaron durante treinta minutos. A la reacción de marcado le seguía un aclarado de tres minutos en TBS.

10 Las muestras de tejido para el triplex se trataron a continuación con una tercera ronda de hibridación y marcado. El duplex se hizo avanzar a la etapa de fijación descrita a continuación. Para el triplex, se preparó un cóctel de Citoqueratina 18 (CK-18) a una dilución 1:1.000 y CD4 (1F6) a una dilución 1:10 en reactivo de bloqueo. Aproximadamente 400,0 µl del cóctel de anticuerpos se aplicaron a la muestra de tejido, y se permitió hibridar a los anticuerpos y las muestras de tejido durante una hora. A la hibridación le seguía un aclarado de tres minutos en TBS.

15 Para el tercer marcado, el triplex se marcó con un cóctel de Zenon Alexa Fluor de ratón 594 y Zenon Alex Fluor de conejo 647, diluido tal como se ha descrito. Aproximadamente 400,0 µl del cóctel de marcas se aplicó a las muestras de tejido, y las muestras de tejido se incubaron durante treinta minutos. A la reacción de marcado le seguían dos aclarados de tres minutos en TBS.

20 Se realizó una etapa de fijación incubando las muestras en formalina al 10 % durante 10 minutos, seguidos por dos aclarados de tres minutos cada uno en TBS. Los portaobjetos se retiraron a continuación del aparato para tinción de portaobjetos automatizado Nemesys 7200 de BioCare Medical.

25 El reactivo montante de fluorescencia *SlowFade* Gold de Molecular Probe con DAPI (aproximadamente 25,0 µl) se aplicó a las muestras, que a continuación se cubrieron con cubreobjetos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta que podía realizarse el análisis.

30 Los cinco anticuerpos se dividieron entre dos ensayos M-plex debido al isotipo común de reactivos disponibles. Los anticuerpos se desarrollaron y analizaron en primer lugar en un ensayo inmunofluorescente simplex usando muestras de tejido linfoide (es decir bazo, amígdala, ganglio linfático) donde se anticipó que todos los marcadores estarían presentes. Los resultados del ensayo simplex tuvieron éxito en que cada uno de los marcadores identificaba subconjuntos de linfocitos que coincidían con el compartimento celular (es decir membrana celular) y se identificaron dentro de folículos intermedios y/o centros germinales. Los experimentos simplex originales se agruparon a continuación en formatos M-plex que se aplicaron en tejidos de control similares así como en muestras de tejido de próstata domésticas donde infiltrados linfocíticos fueron identificados por evaluación de H&E. Los ejemplos de los datos derivados de estos ensayos M-plex originales se ilustran en la figura 13A y 13B. Tal como se demostró, se desarrollaron dos ensayos M-plex. M-plex I es un duplex que contenía CD4 y CD8 (+ CK18) mientras que un segundo M-plex II era un triplex que contenía CD25, 69 y 86 (+CK18).

35 Posteriores al desarrollo de los anteriores formatos M-plex, se generaron dos combinaciones M-plex adicionales para evaluar subconjuntos seleccionados de células T dentro de secciones de tejido dadas (por ejemplo células T activadas - CD4+CD69+ y células T mixtas: CD4+ y CD25+). Los nuevos formatos M-plex estaban constituidos por un duplex que contenía CD8 y 86 y un triplex que contenía CD4, 25 y 69. Estos nuevos ensayos M-plex se ensayaron en muestras de tejido esplénico y la amígdala y se ilustran en la figura 14A y 14B. Estos son los formatos m-plex que se aplicarán en las muestras de prostatectomía tratadas del paciente cuando lleguen a Aureon.

45 Para cada experimento M-plex, se evalúa un perfil espectral que identifica el perfil de emisión de Alexa Fluor individual para la calidad de la señal, diferenciación de otros perfiles, intensidad, y evaluación de la calidad inicial para cuantificación para el desarrollo de secuencia de comandos (señal/ruido). Los fluoró cromos de Alexa se seleccionan basándose en sus perfiles espectrales para conservar la pureza de la señal con la mínima cantidad de solapamiento. Tal como se ilustra en la figura 14B, los perfiles espectrales para el M-plex duplex identifican antígenos/anticuerpos individuales, así como autofluorescencia del tejido. También se realizó un análisis similar para el m-plex triplex.

50 A través de una evaluación de la localización dentro de folículos linfoides y tipos de tejido linfoide individuales, los presentes anticuerpos dentro de estos formatos de M-plex fueron capaces de identificar de forma selectiva poblaciones de linfocitos. Las imágenes en escala de grises (tal como se perfila en las figuras) se utilizarán para el desarrollo de algoritmos y secuencias de comandos para cuantificar con éxito estos antígenos en secciones de tejido.

55 El desarrollo de ensayos tanto IF simplex como IF M-plex para la evaluación de los 5 anticuerpos/antígenos - CD4, CD8, CD25, CD69 y CD86 se ha completado con éxito. Estos 5 anticuerpos se han acoplado (en formatos M-plex específicos) para maximizar la superposición para el desarrollo de secuencias de comandos de modo que subconjuntos de poblaciones de células linfocíticas activadas.

EJEMPLO 8: MICROMATRIZ DE PÉPTIDOS PARA MEDIR EL INTERVALO DINÁMICO Y LA CUANTIFICACIÓN DE LA DETECCIÓN DE LA DIANA.

5 Los péptidos son cortas secuencias de aminoácidos (normalmente de 10 a 30 residuos) que se usan a menudo como inmunógenos para la producción de anticuerpos. Dado que pueden ser sintetizados in vitro, pueden producirse péptidos purificados en grandes cantidades. Normalmente, las micromatrices de péptidos están constituidas por péptidos unidos covalentemente a una superficie de vidrio. Si un anticuerpo reconoce una secuencia peptídica específica, una matriz de péptidos puede utilizarse de este modo para medir el intervalo dinámico (el intervalo entre la menor y la mayor concentración de la diana) que puede detectarse con dicho método. Adicionalmente, dado que una concentración de péptido dada en la micromatriz está vinculada a una intensidad fluorescente específica, la concentración de diana desconocida puede evaluarse de forma cuantitativa.

15 Se diseñó una micromatriz de péptidos que contenía un péptido que es reconocido específicamente por NeoMarkers (Lab Vision Corp.) anticuerpo anti-receptor de andrógenos NM-MS443 (Secuencia peptídica: STEDTAEYSPFKGGYTK). Adicionalmente, la micromatriz contenía un péptido de control positivo (Secuencia: NFLMDNA(pY)FCEADAKKK) que es detectado específicamente por un anticuerpo anti-fosfo-Tirosina (Sigma) y un péptido de control negativo que no está relacionado con ninguna proteína conocida (Secuencia: SFYGATGESYDPTTKEK). Todos los péptidos se localizaron por triplicado en las siguientes concentraciones: 100, 20 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91 y 1,95 micromolar. La micromatriz fue fabricada por JPT Peptide Technologies, Alemania.

La tinción de la micromatriz de péptidos se realizó de la siguiente manera:

25 1.) Unir la cámara al portaobjetos de la micromatriz de péptidos

Cada marco adhesivo se intercaló entre una lámina de poliéster fina y una gruesa (mientras que la lámina fina cubre el marco adhesivo completamente, la lámina gruesa tiene una parte central retirada). El poliéster grueso se retiró, dejando el marco adhesivo unido a la lámina fina. A continuación, el marco adhesivo azul en la lámina fina de poliéster se colocó en el portaobjetos de vidrio mientras se evitaba el contacto con la superficie que presentaba el péptido. El marco azul se presionó firmemente hacia abajo sin atrapar aire debajo del adhesivo. La segunda lámina fina de poliéster se retiró a continuación de la parte superior del marco azul adhesivo. El marco azul en solitario permanecía unido al portaobjetos.

35 2.) Preparar la solución de ensayo con primario

Un volumen de 1,0 µg del anticuerpo AR monoclonal de ratón (NeoMarkers, Lab Vision Corp.) se ajustó a 20 µl de 1x tampón PBS en un tubo Eppendorf. Para experimentar marcado con anticuerpo primario con un fluoróforo, 5 µl de IgG1 de ratón Zenon 555 Alexa Flour se añadieron a continuación. La solución se pipeteó arriba y abajo para mezclar e incubar durante 10 minutos. Como control, 7 µg/ml de anticuerpo fosfo-Tirosina marcado con FITC- (Sigma) se diluyeron en el tubo junto con anticuerpo AR adicional a su dilución de trabajo para un volumen de solución de ensayo final de 330 µl. La solución se agitó en vórtice para garantizar el mezclado, y partiendo de un extremo del marcado adhesivo, todo el volumen se pipeteó por toda la superficie del portaobjetos.

45 3.) Incubación

La micromatriz de péptidos se incubó a continuación durante 4 horas a 4°C en una cámara húmeda protegida de la luz.

50 4.) Retirar la cámara de incubación

La solución de ensayo se decantó y la cámara de incubación se retira cuidadosamente sujetando el portaobjetos con una mano y tirando hacia arriba suavemente de un borde del marco azul adhesivo. El marco azul se levantó de los bordes del portaobjetos cuidadosamente para evitar que quede cualquier adhesivo, lo que alteraría los siguientes lavados.

55 5.) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando el portaobjetos 5 veces durante 5 minutos con agua filtrada doblemente destilada. El portaobjetos se lavó a continuación 5 veces durante 5 minutos en metanol.

60 6.) Montaje

Después de que el portaobjetos se secó al aire (libre de partículas de polvo) se añadieron 100 µl de solución AntiFade que contenía contratinción nuclear y a continuación se cubrió con un cubreobjetos y se preparó para la adquisición de imágenes.

7.) Adquisición de imágenes

5 Las matrices de péptidos se colocaron en un microscopio de fluorescencia automatizado 90i. Se localizaron los puntos moviendo los ejes y-x de la platina del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó dentro de la cámara al nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquirieron con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa podría usarse una cámara de imagenología espectral para separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardaron en formato tiff y se sometieron a análisis cuantitativo de la imagen. Finalmente, los valores de brillo se representaron gráficamente contra concentraciones de péptido para visualizar el intervalo dinámico de detección de la diana.

10 Algunos antígenos se expresan solamente en cantidades secundarias en el tejido de interés. Para conseguir la detección de esas dianas, dicho método puede modificarse de la siguiente manera: Después de añadir el anticuerpo primario y de la eliminación del anticuerpo no unido mediante una etapa de lavado, se añade un anticuerpo secundario específico de especie. Por ejemplo, si el anticuerpo primario es IgG de ratón, se añadiría un anticuerpo anti-ratón de cabra en la segunda etapa. Después de que el anticuerpo específico de especie se ha eliminado (en este caso la IgG anti-ratón de cabra), el anticuerpo secundario se detectaría con Fab marcado de forma fluorescente. Dado que más de un anticuerpo anti-ratón de cabra puede unirse a cada IgG de ratón, más fragmentos Fab fluorescentes se unirán al complejo de detección.

20 **EJEMPLO 9: AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL**

Algunos antígenos se expresan solamente en cantidades secundarias en el tejido de interés. Para conseguir la detección de esas dianas, los métodos simplex y multiplex de la invención se modifican de la siguiente manera: después de añadir el anticuerpo primario y de la eliminación del anticuerpo no unido mediante una etapa de lavado, se añade un anticuerpo secundario específico de especie. Por ejemplo, si el anticuerpo primario es IgG de ratón, se añadiría un anticuerpo anti-ratón de cabra en la segunda etapa. Después de que el anticuerpo específico de especie es eliminado (en este caso la IgG anti-ratón de cabra), el anticuerpo secundario se detectaría con Fab marcado de forma fluorescente. Dado que más de un anticuerpo anti-ratón de cabra puede unirse a cada IgG de ratón, más fragmentos Fab fluorescentes se unirán al complejo de detección.

30 Se ha descubierto que el receptor de andrógenos (AR) es un importante biomarcador para la evaluación de tejido con cáncer de próstata. Para incrementar la intensidad de la señal obtenida para medir la distribución cualitativa y cuantitativa de estos marcadores en secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas con formalina o tejido, se usó el siguiente método, se detectaron de la siguiente manera:

35 1) Recuperación de antígenos (en solución Reveal)

Para recuperación de antígenos, secciones de tejido o TMA se calentaron a ebullición en solución Reveal 1X (BioCare Medical) (10 cc) en un horno microondas de alta potencia calibrado durante 7 ½ minutos y a continuación se les deja enfriar durante 20 minutos. Después de enfriarse, los portaobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos en solución salina tamponada por fosfato (PBS).

2) Permeabilización del tejido

45 Muestras de tejido se permeabilizaron posteriormente en PBS que contenía Triton-X al 0,2 % (PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3) Eliminación de autofluorescencia

50 La autofluorescencia se redujo incubando los portaobjetos en HCl al 1 %/EtOH al 70 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon a continuación 3 veces durante 5 minutos en PBS.

4) Bloqueo con IgG inespecífica

55 La unión no específica de anticuerpo o fragmento Fab se bloqueó mediante incubación con 0,5 µg/ul de BSA en PBT durante 20 minutos en una cámara húmeda. Los portaobjetos no se aclararon antes de la adición del anticuerpo primario a la muestra de tejido.

5) Incubación de anticuerpo primario no tratado en el tejido

60 Anticuerpo receptor de andrógenos monoclonal de ratón no tratado se incubó en el tejido durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

6) Eliminación del anticuerpo no unido

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

7) Incubación con anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra

Se diluyó IgG anti-ratón de cabra en PBT y se incubó en el tejido durante 20 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

8) Eliminación de IgG anti-ratón de cabra no unida

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

9) Incubación con Fab marcado de forma fluorescente

Fragmento Fab específico de ratón marcado con Alexa 568 se añadió al portaobjetos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

9.) Eliminación de Fab no unido

El fragmento Fab no unido se eliminó lavando los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en PBT seguidas por 3 veces durante 5 minutos en PBS.

10) Fijación

El tejido se fijó en formalina al 10 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se aclararon 2 veces durante 5 minutos en PBS.

11) Montaje

Después de añadir 100 µl de solución AntiFade que contenía contratinción nuclear, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se prepararon para la adquisición de imágenes.

12) Adquisición de imágenes

Las muestras se colocaron en un microscopio de fluorescencia automatizado 90i. Las regiones de interés se identificaron moviendo los ejes y-x de la platina del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó dentro de la cámara al nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquirieron con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa podría usarse una cámara de imaginología espectral para separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardaron en formato tiff y se sometieron a análisis cuantitativo de la imagen.

EJEMPLO 10: REACTIVOS DE DETECCIÓN

La siguiente lista de anticuerpos se han marcado de forma inmunofluorescente con éxito con la técnica de marcado secundaria que emplea el marcado con Zenon™ Alexa Fluor de anticuerpos después de que el anticuerpo se ha hibridado con la fuente de tejido. Estos son anticuerpos adecuados para su uso en los métodos simplex / multiplex de la invención.

TABLA 2

ANTICUERPO	COMPAÑÍA FUENTE	Nº DE CATÁLOGO	ISOTIPO
Actina	Zymed Laboratories	18-0106	IgG2a de ratón
fosfo-AKT	Abcam Incorporated	ab4802	IgG de conejo
AMACR	Zeta Corporation	Z2001	IgG de conejo
Receptor de andrógenos	NeoMarkers (Lab Vision Corp.)	NM-MS443	IgG1 de ratón
Bax	Abcam Incorporated	ab7977	IgG de conejo
Bcl-2	DakoCytomation	M0887	IgG1 de ratón
Caspasa 3 (activada)	Chemicon International, Inc.	ab3623	IgG de conejo
CD-34	DakoCytomation	M7165	IgG1 de ratón
CD-45	DakoCytomation	M0855	IgG1 de ratón
Citoqueratina-14	Vector Laboratories	VP-C410	IgG1 de ratón
Citoqueratina-18	Vector Laboratories	VP-C414	IgG1 de ratón
Ciclina D1	BioCare Medicals	CP236B	IgG de conejo
Ciclina E	Vector Laboratories	VP-C396	IgG2a de ratón

ES 2 434 491 T3

e-caderina	Ventana Medical Systems, Inc.	760-2830	IgG1 de ratón
EGFR	DakoCytomation	K1492	IgG de ratón
pEGFR (Y1068)	Abcam Incorporated	ab5644	IgG de conejo
EMA	DakoCytomation	M0613	IgG1 de ratón
fosfo-ERK	Cell Signaling Technologies	ab4376	IgG de conejo
EZH2	Zymed Laboratories	18-7395	IgG de conejo
Her-2/Neu	DakoCytomation	A0485	IgG de conejo
KDR	Upstate	07-158	IgG de conejo
fopsfo-KDR	Upstate	07-374	IgG de conejo
Ki-67	Ventana Medical Systems, Inc.	290-2910	IgG1 de ratón
fosfo-mTOR	Cell Signaling Technologies	ab2971	IgG de conejo
p27	Vector Laboratories	VP-P951	IgG2a de ratón
p53	DakoCytomation	M7001	IgG2b de ratón
p70 S6 quinasa	Cell Signaling Technologies	ab9430	IgG de conejo
PI3 quinasa	Cell Signaling Technologies	ab3821	IgG de conejo
PSA	Ventana Medical Systems, Inc.	760-2506	IgG de conejo
PSMA	Anogen	Y-PSMA-1	IgG2a de ratón
pTEN	NeoMarkers (Lab Vision Corp.)	NM-MS1797	IgG1 de ratón
α -tubulina	Zymed Laboratories	18-0092	IgG1 de ratón
VEGF	Abcam Incorporated	ab1316	IgG1 de ratón

REIVINDICACIONES

1. Un método inmunohistoquímico para detectar simultáneamente la presencia o ausencia de al menos tres dianas en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- 5 (a) realizar recuperación de antígenos en la muestra biológica, en donde dicha recuperación de antígenos comprende las etapas:
- 10 i. desparafinar y rehidratar la muestra biológica; y
ii. llevar a ebullición en tampón de recuperación de antígenos;
- (b) realizar reducción de autofluorescencia en la muestra biológica antes de la etapa (a), la etapa (c) o la etapa (d), en donde dicha reducción de autofluorescencia comprende incubar dicha muestra biológica en una solución que comprende ácido clorhídrico al 1 % y etanol al 70 %;
- 15 (c) poner en contacto a la muestra biológica con (1) un primer anticuerpo específico para una primera diana, (2) un primer reactivo de marcado en donde dicho primer reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho primer anticuerpo y un primer resto de detección, (3) un segundo anticuerpo específico para una segunda diana, (4) un segundo reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho segundo anticuerpo y un segundo resto de detección, (5) un tercer anticuerpo específico para una
- 20 tercera diana, y (6) un tercer reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho tercer anticuerpo y un tercer resto de detección; y
- (d) detectar cada uno de dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado, respectivamente, en dicha muestra biológica con lo que la presencia de dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado, respectivamente, indica la presencia de dichas primera, segunda o tercera dianas, respectivamente, en dicha
- 25 muestra biológica y la ausencia de dichos primer, segundo o tercer reactivos de marcado indica la ausencia de dichas primera, segunda o tercera dianas, respectivamente, en dicha muestra biológica,
- en el que dicha muestra biológica es tejido humano incluido en parafina.
- 30 2. Un método inmunohistoquímico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende:
- poner en contacto dicha muestra biológica con
- 35 i. un primer complejo, que comprende el primer anticuerpo específico para la primera diana y el primer reactivo de marcado en el que dicho reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo específico para dicho primer anticuerpo y un resto de detección;
- ii. el segundo anticuerpo específico para la segunda diana y el segundo reactivo de marcado en donde dicho reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo específico para dicho segundo anticuerpo y un segundo resto de detección; y
- 40 iii. el tercer anticuerpo específico para la tercera diana, y el tercer reactivo de marcado que comprende un anticuerpo que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho tercer anticuerpo y un tercer resto de detección.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además la etapa de lavar dicha muestra biológica antes de la etapa (c) o antes de la etapa (d).
- 45 4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho resto de unión al anticuerpo de al menos uno de dichos primer, segundo o tercer reactivos de marcado es un fragmento de anticuerpo monovalente o una proteína no anticuerpo.
- 50 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho fragmento de anticuerpo monovalente es un fragmento Fab o Fab'.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho fragmento Fab o Fab' se selecciona entre el grupo constituido por un fragmento de anticuerpo anti-Fc, un fragmento de anticuerpo anti-cadena ligera kappa, un fragmento de anticuerpo anti-cadena ligera lambda y un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla.
- 55 7. El método de la reivindicación 4, en el que
- 60 (a) dicho fragmento de anticuerpo monovalente se deriva de un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal; o
(b) dicha proteína no anticuerpo se selecciona entre el grupo constituido por una proteína G, una proteína A, una proteína L y una lectina.
- 65 8. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha muestra biológica tiene al menos 10 años de antigüedad.

9. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos una de dichas dianas es una proteína nuclear o una oncoproteína.
- 5 10. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la presencia de al menos una de dichas dianas es indicativa de la heterogeneidad de las células tumorales.
11. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos una de dichas dianas es un receptor de andrógenos, una citoqueratina 18 o una proteína PTEN.
- 10 12. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo monoclonal.
13. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se forma al menos un complejo proteína de marcado-anticuerpo dentro de dicha sección de tejido.
- 15 14. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos uno de dichos restos de detección se selecciona entre el grupo constituido por un resto fluorescente, un resto radiactivo y una enzima.
- 20 15. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica está sustancialmente libre de ácidos nucleicos antes de dicha etapa de detección.
16. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de permeabilización del tejido antes de la etapa (c).
- 25 17. El método de la reivindicación 16, en el que dicha permeabilización del tejido comprende incubar dicha muestra biológica en solución salina tamponada por fosfato con Triton-X 100 al 0,2 %.
18. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha muestra biológica tiene al menos 20 años de antigüedad.
- 30 19. Un método de detección inmunohistoquímica para determinar simultáneamente la concentración o la cantidad de al menos tres dianas en una muestra biológica que comprende las etapas de:
- 35 (a) realizar recuperación de antígenos en la muestra biológica usando el método de la reivindicación 1;
- (b) realizar reducción de autofluorescencia en la muestra biológica usando el método de la reivindicación 1;
- (c) poner en contacto a la muestra biológica con (1) un primer anticuerpo específico para una primera diana, (2) un primer reactivo de marcado en donde dicho primer reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho primer anticuerpo y un primer resto de detección, (3) un segundo anticuerpo específico para una segunda diana, (4) un segundo reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho segundo anticuerpo y un segundo resto de detección, (5) un tercer anticuerpo específico para una tercera diana, y (6) un tercer reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho tercer anticuerpo y un tercer resto de detección;
- 40 (d) detectar dichos primer, segundo y tercer reactivos de marcado en dicha muestra biológica usando el método de la reivindicación 1;
- 45 (e) comparar la cantidad de reactivos de marcado detectados en la etapa (d) con una muestra de control,
- en el que dicha muestra biológica es una sección de tejido humano incluida en parafina y en el que si se ha de determinar la concentración de las dianas, la concentración de dichas primera, segunda y tercera dianas en dicha muestra de control es conocida de modo que la concentración de dicha diana en dicha muestra biológica se determina de este modo.
- 50 20. Un método de detección inmunohistoquímica de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende además determinar una diferencia en la cantidad de dichas al menos tres dianas en un tejido de muestra con respecto a la distribución de las respectivas dianas en un tejido normal en donde la etapa (e) comprende:
- 55 (i) detectar las cantidades de las dianas correspondientes en dicho tejido normal usando el método de la reivindicación 1; y
- (ii) comparar las cantidades en dicha muestra biológica con dicho tejido normal para determinar una diferencia de dichas dianas en la muestra biológica con respecto al tejido normal.
- 60 21. El método de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en el que al menos una de dichas dianas es un antígeno nuclear.
- 65 22. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además poner en contacto a dicha muestra biológica con un anticuerpo específico para una cuarta diana y un cuarto reactivo de marcado.

23. El método de la reivindicación 22, que comprende además poner en contacto a dicha muestra biológica con un anticuerpo específico para una quinta diana y un quinto reactivo de marcado.
- 5 24. El método de la reivindicación 23, que comprende además poner en contacto a dicha muestra biológica con un anticuerpo específico para una sexta diana y un sexto reactivo de marcado.
25. El método de la reivindicación 24, que comprende además poner en contacto a dicha muestra biológica con un anticuerpo específico para una séptima diana y un séptimo reactivo de marcado.
- 10 26. Un método de detección inmunohistoquímica para determinar la cantidad de al menos tres dianas en una muestra biológica de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha muestra de control es una micromatriz.
27. Un método para el diagnóstico o la monitorización del avance de una enfermedad que comprende:
- 15 (a) proporcionar una muestra biológica de un paciente, en donde dicha muestra biológica es una sección de tejido humano incluida en parafina;
- (b) realizar recuperación de antígenos en la muestra biológica usando el método de la reivindicación 1;
- (c) realizar reducción de autofluorescencia en la muestra biológica usando el método de la reivindicación 1;
- 20 (d) poner en contacto a la muestra biológica con (1) un primer anticuerpo específico para una primera diana, (2) un primer reactivo de marcado en donde dicho primer reactivo de marcado comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho primer anticuerpo y un primer resto de detección, (3) un segundo anticuerpo específico para una segunda diana, (4) un segundo reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho segundo anticuerpo y un segundo resto de detección, (5) un tercer anticuerpo específico para una tercera diana, y (6) un tercer reactivo de marcado que comprende un resto de unión al anticuerpo para dicho
- 25 tercer anticuerpo y un tercer resto de detección;
- (e) detectar simultáneamente una primera cantidad de cada una de al menos tres dianas en dicha muestra biológica usando el método de la reivindicación 1 en un primer momento puntual;
- (f) detectar simultáneamente una segunda cantidad de cada una de dichas al menos tres dianas en dicha muestra biológica usando el método de la reivindicación 1 en un segundo momento puntual;
- 30 (g) determinar una relación de las primeras cantidades y las segundas cantidades de dichas al menos tres dianas en dicha muestra biológica y relacionar las relaciones con un intervalo predeterminado como indicativo de un estado de dicha enfermedad.
28. El método de la reivindicación 27, en el que dicha enfermedad es enfermedad de Alzheimer, cáncer o una
- 35 enfermedad inflamatoria.
29. El método de la reivindicación 28, en el que dicho cáncer es un tumor sólido o en el que dicho cáncer es leucemia o linfoma.
- 40 30. El método de la reivindicación 28, en el que dicho trastorno inflamatorio es artritis reumatoide o un trastorno inflamatorio del intestino.
31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 19, 20 o 27, en el que dicha diana se selecciona entre
- 45 el grupo constituido por receptor de andrógenos, Ki67, Ciclina D1, P-PKC zeta, x-metilacil-CoA racemasa (AMACR), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), PI3 quinasa (PI3K), factor nuclear Kappa B (NFkB), receptor 2 del VEGF (P-KDR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD34, pAKT y Caspasa 3a.
32. El método de la reivindicación 27, en el que dicha diana es un antígeno nuclear.
- 50

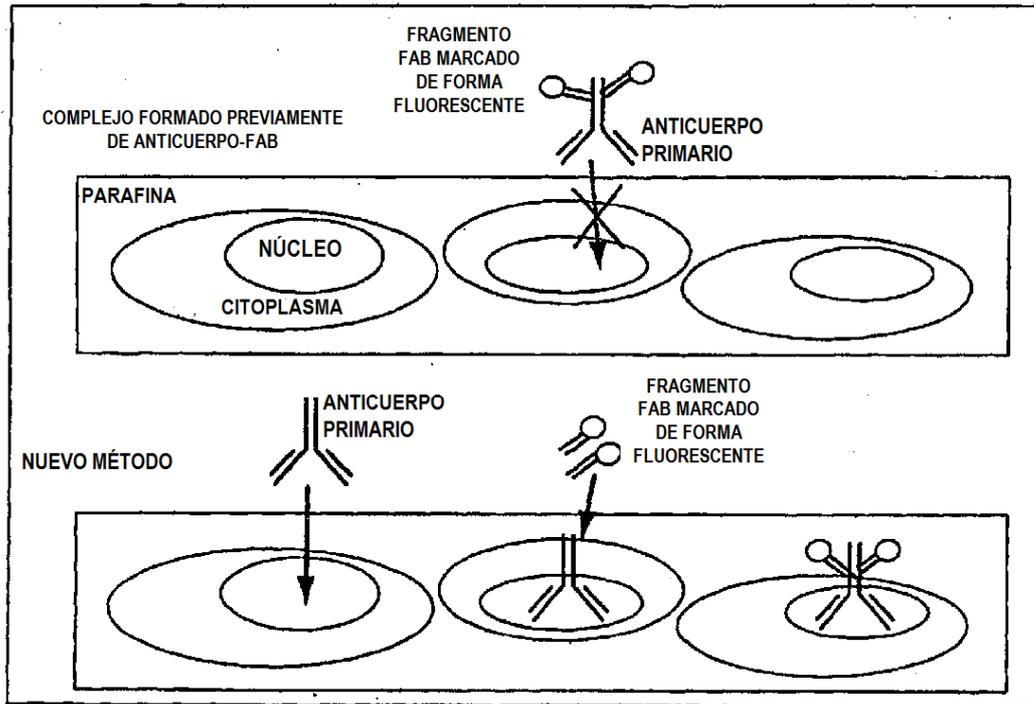


Fig. 1

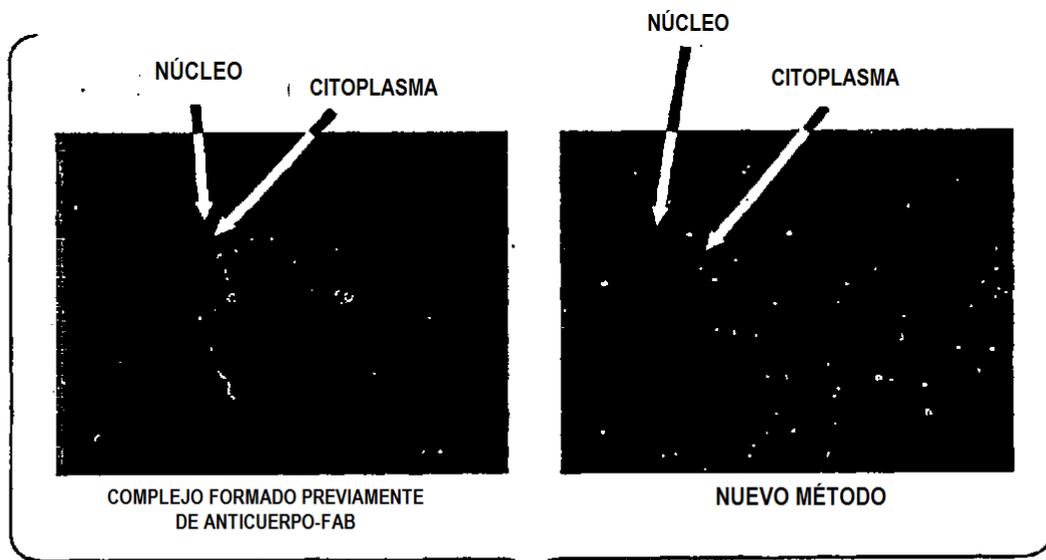


Fig. 2

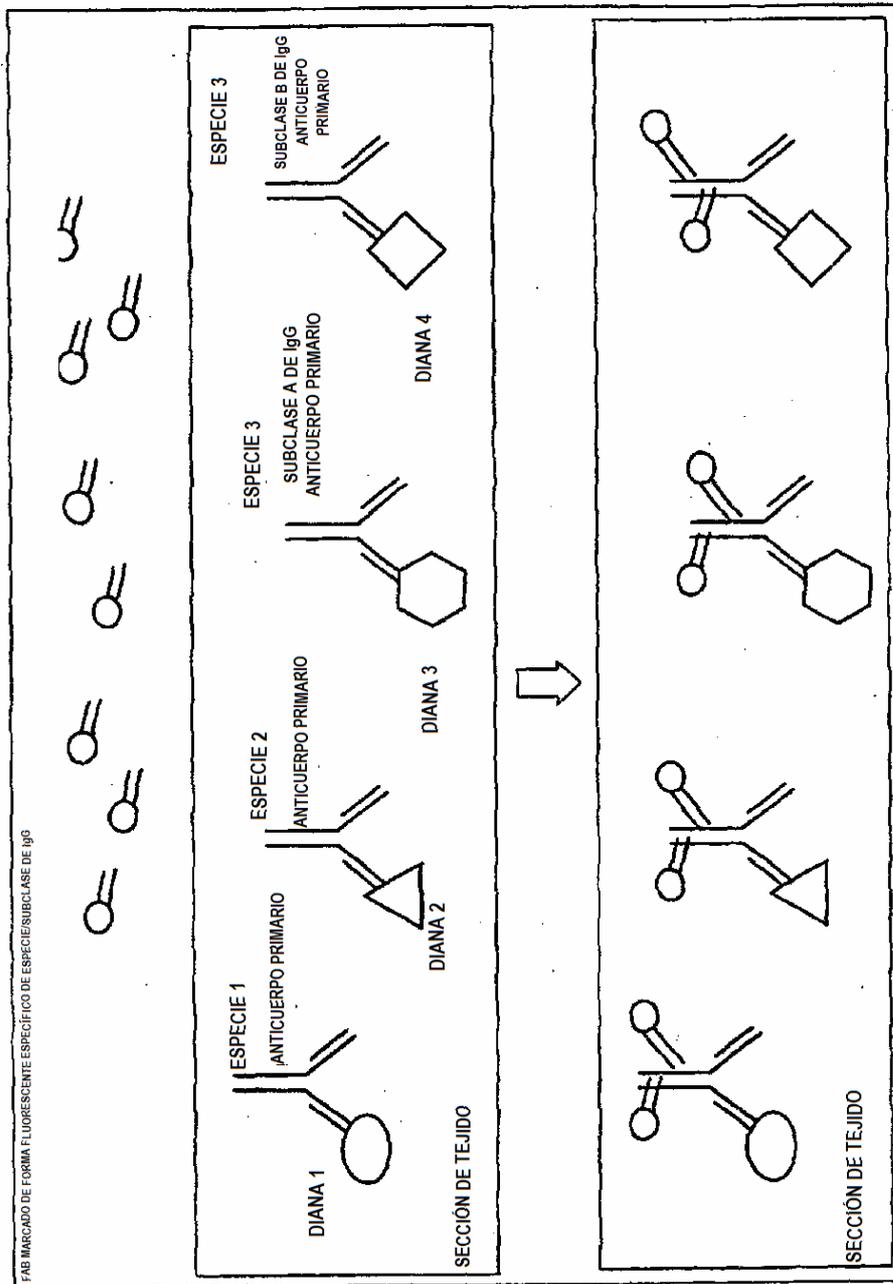


Fig.3

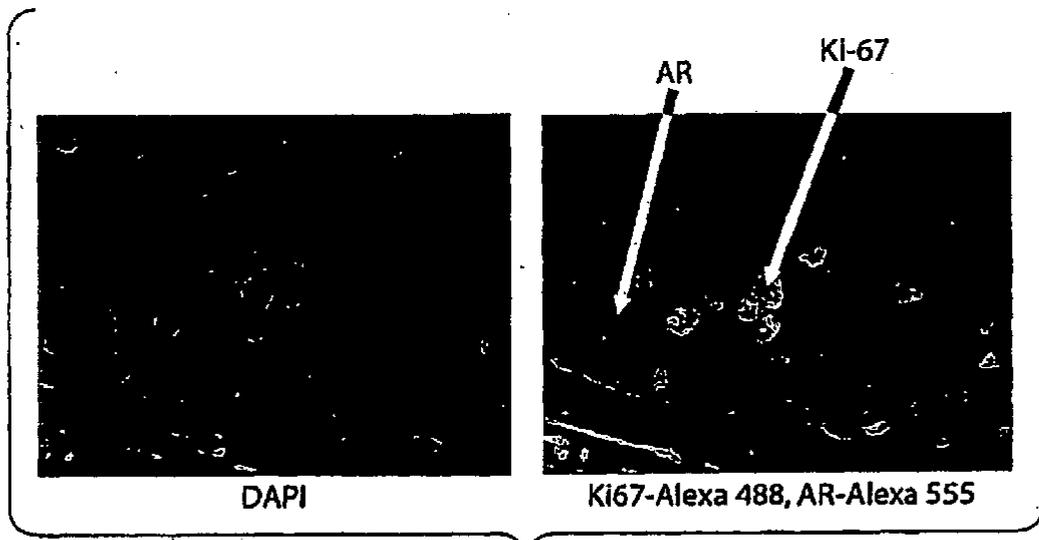


Fig. 4

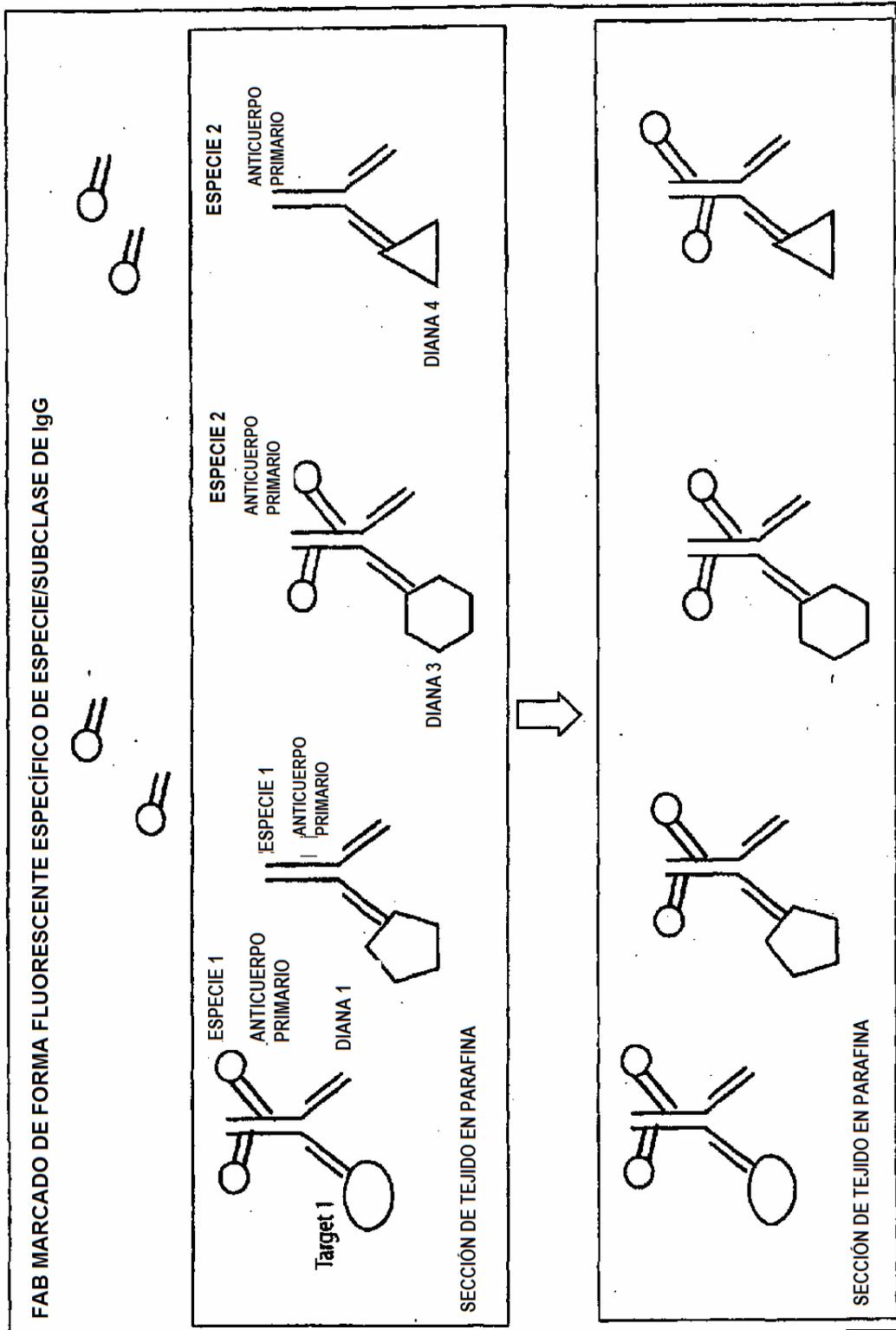


Fig. 5

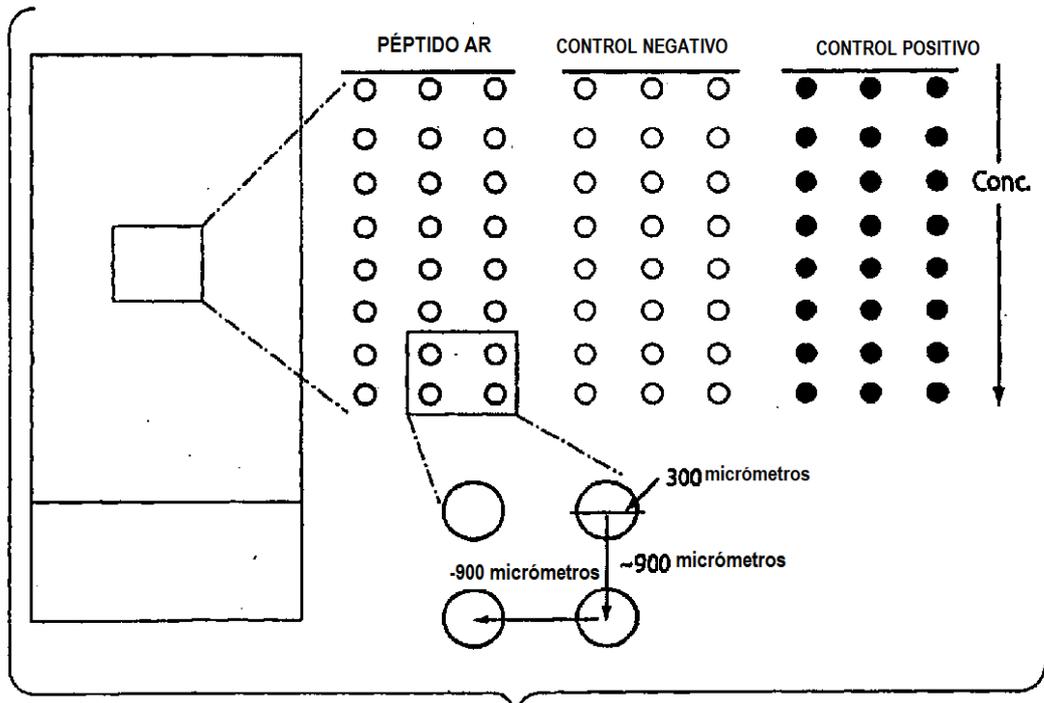


Fig.6

MATRIZ DE PÉPTIDOS: VERSIÓN 1.0

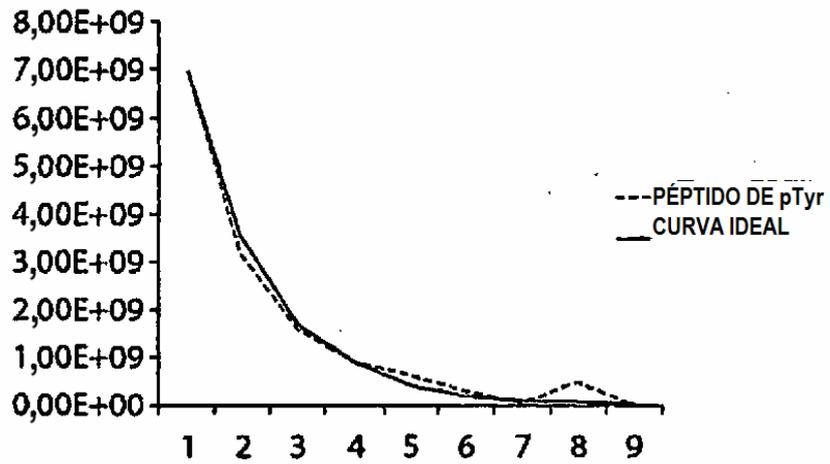


Fig. 7

MATRIZ DE PÉPTIDOS DE AR: CURVA PATRÓN

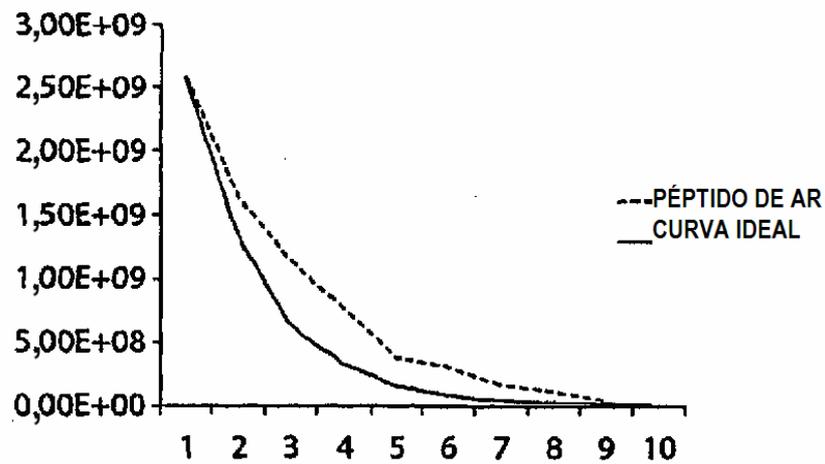


Fig. 8

VERSIÓN MODIFICADA CON AMPLIFICACIÓN ADICIONAL

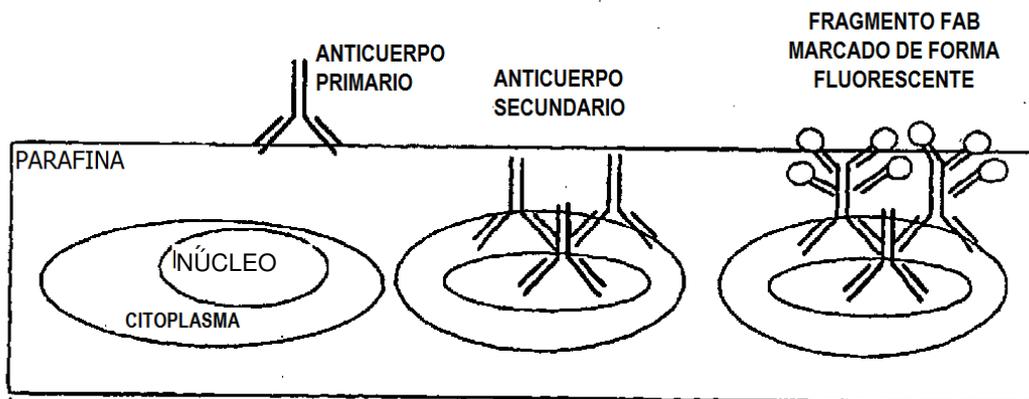


Fig. 9

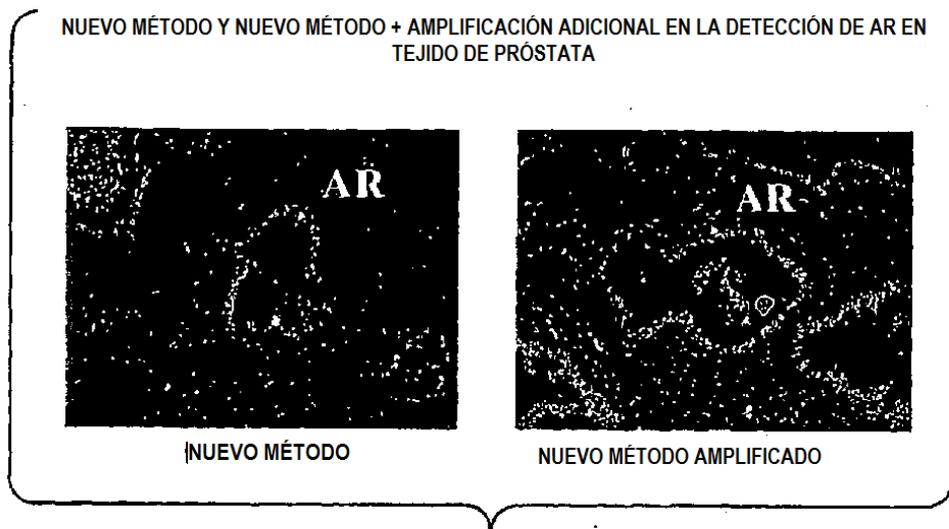
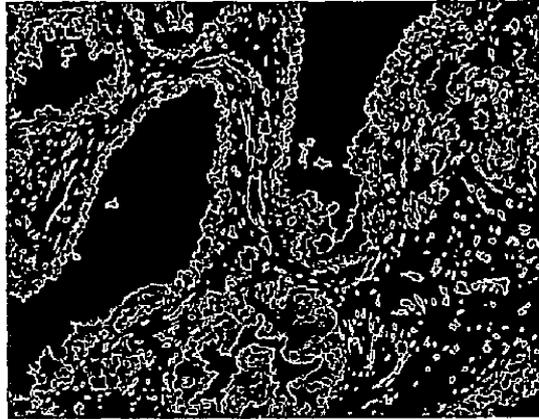


Fig. 10

- ...● Fondo
- ...⊙ Citoplasma_AMACR_Neg
- ...⊙ Citoplasma_AMACR_Pos
- ...● Epit_AR_Neg_AMACR_Neg
- ...⊙ Epit_AR_Neg_AMACR_Pos
- ...● Epit_AR_Pos_AMACR_Neg
- ...⊙ Epit_AR_Pos_AMACR_Pos
- ...⊙ Estroma_AR_Neg
- ...⊙ Estroma_AR_Pos
- ...■ Sin clasificar



→ A la figura 11B

→ A la figura 11C

Fig. 11A

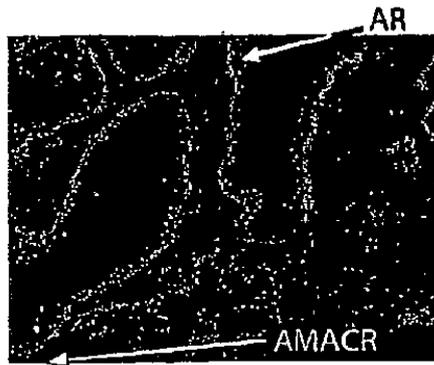


Fig. 11B

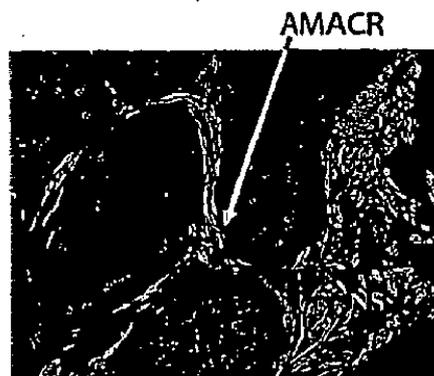
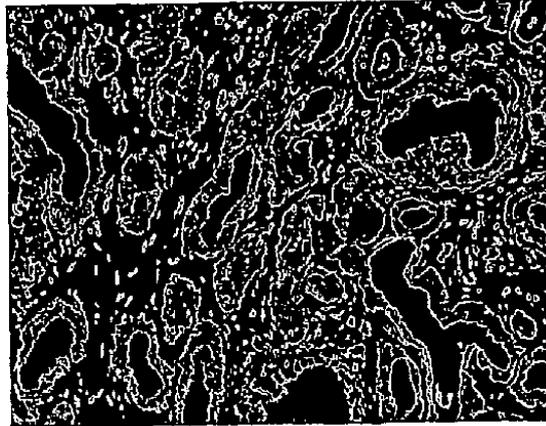


Fig. 11C

- Fondo
- ⊙ Citoplasma_AMACR_Neg
- ⊙ Citoplasma_AMACR_Pos
- Epit_AR_Neg_AMACR_Neg
- ⊙ Epit_AR_Neg_AMACR_Pos
- Epit_AR_Pos_AMACR_Neg
- ⊙ Epit_AR_Pos_AMACR_Pos
- Estroma_AR_Neg
- Estroma_AR_Pos
- Sin clasificar



→ A la figura 12B

→ A la figura 12C

Fig. 12A

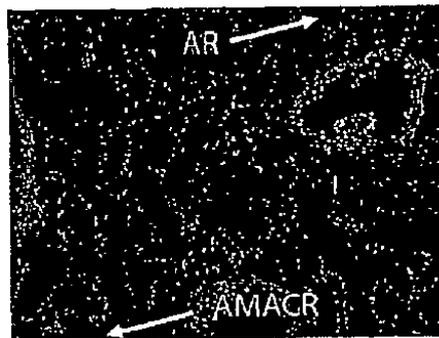


Fig. 12B

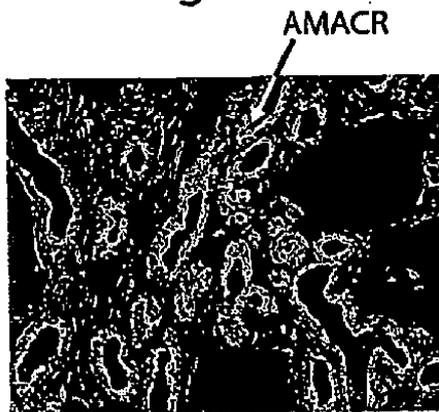


Fig. 12C

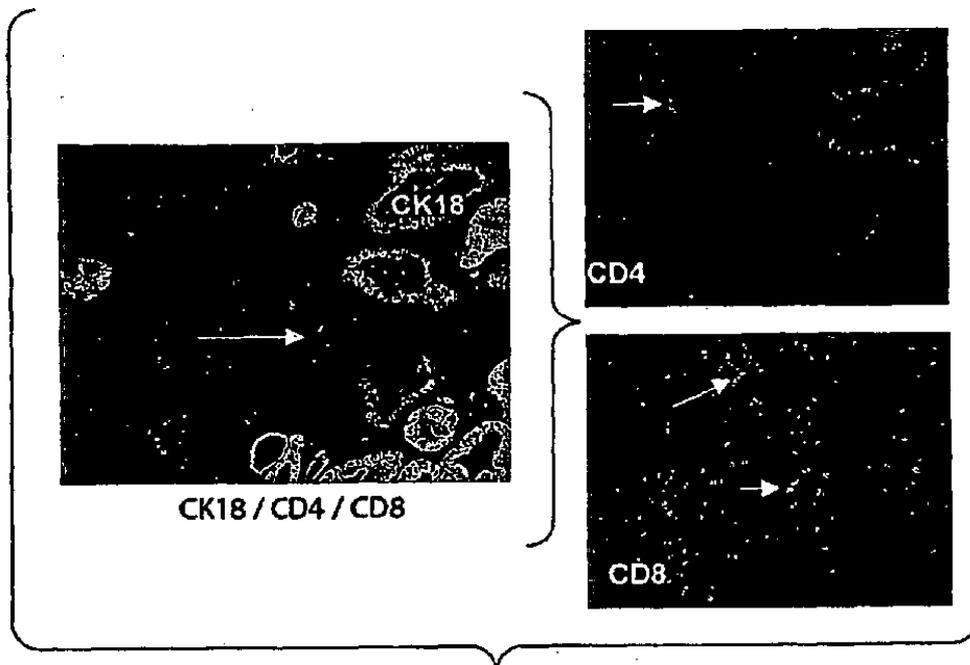


Fig. 13

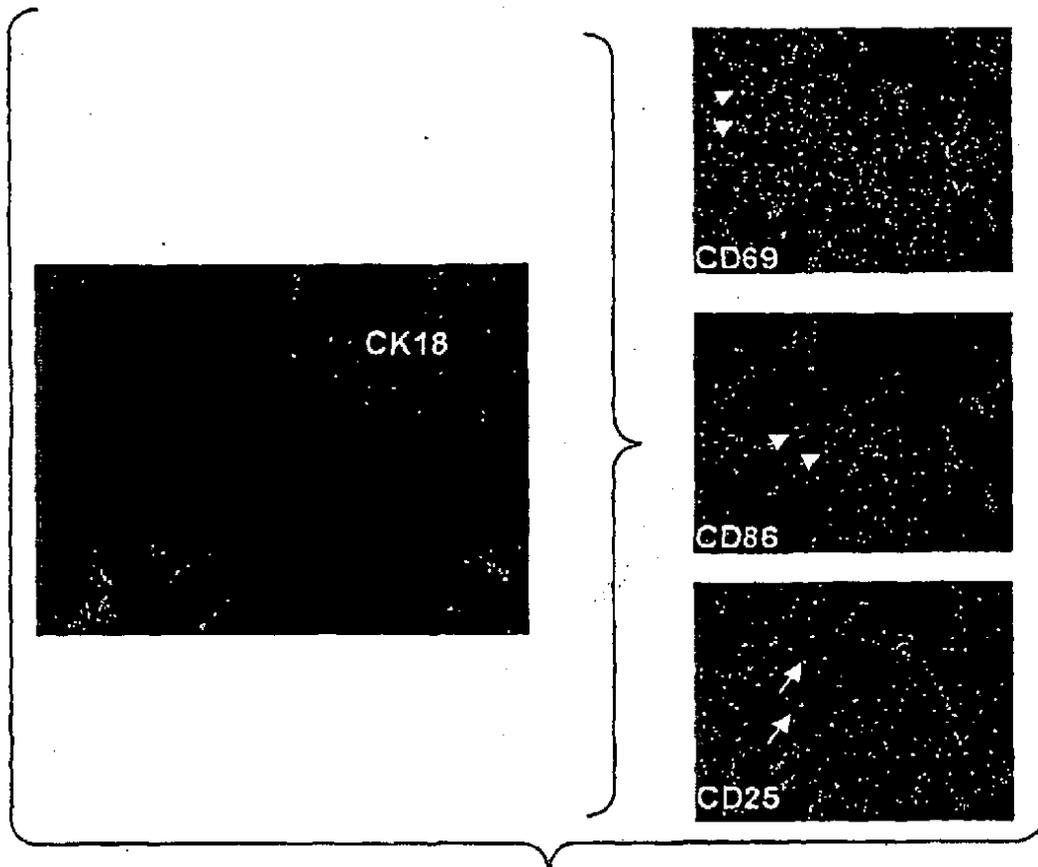


Fig. 14

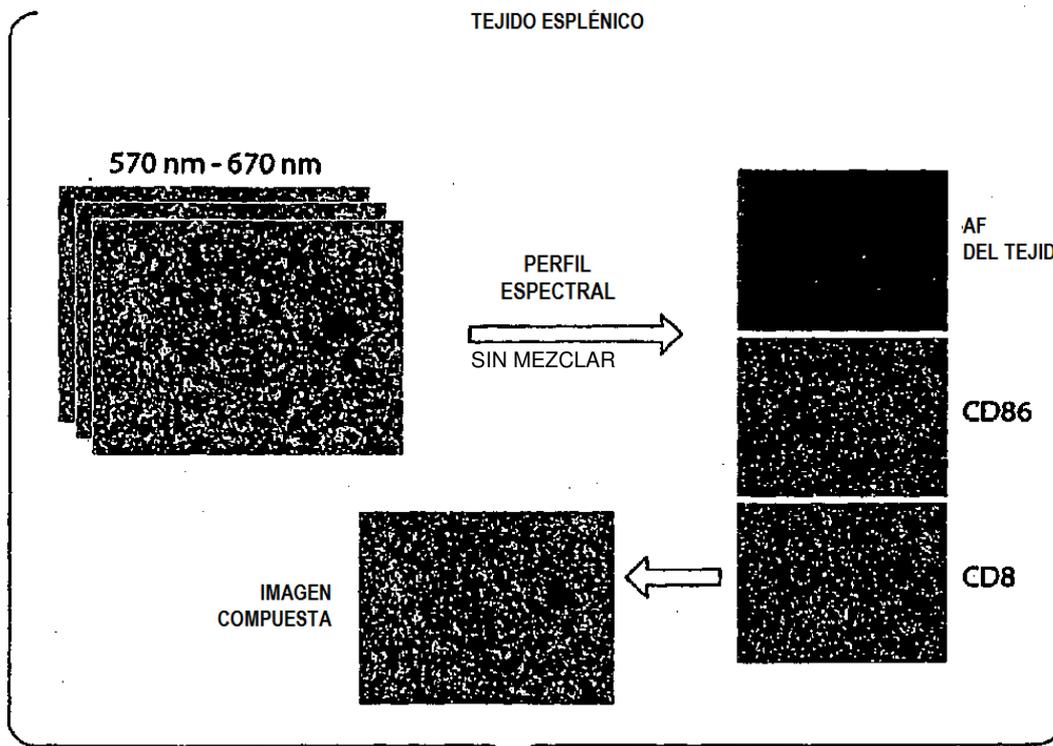


Fig. 15

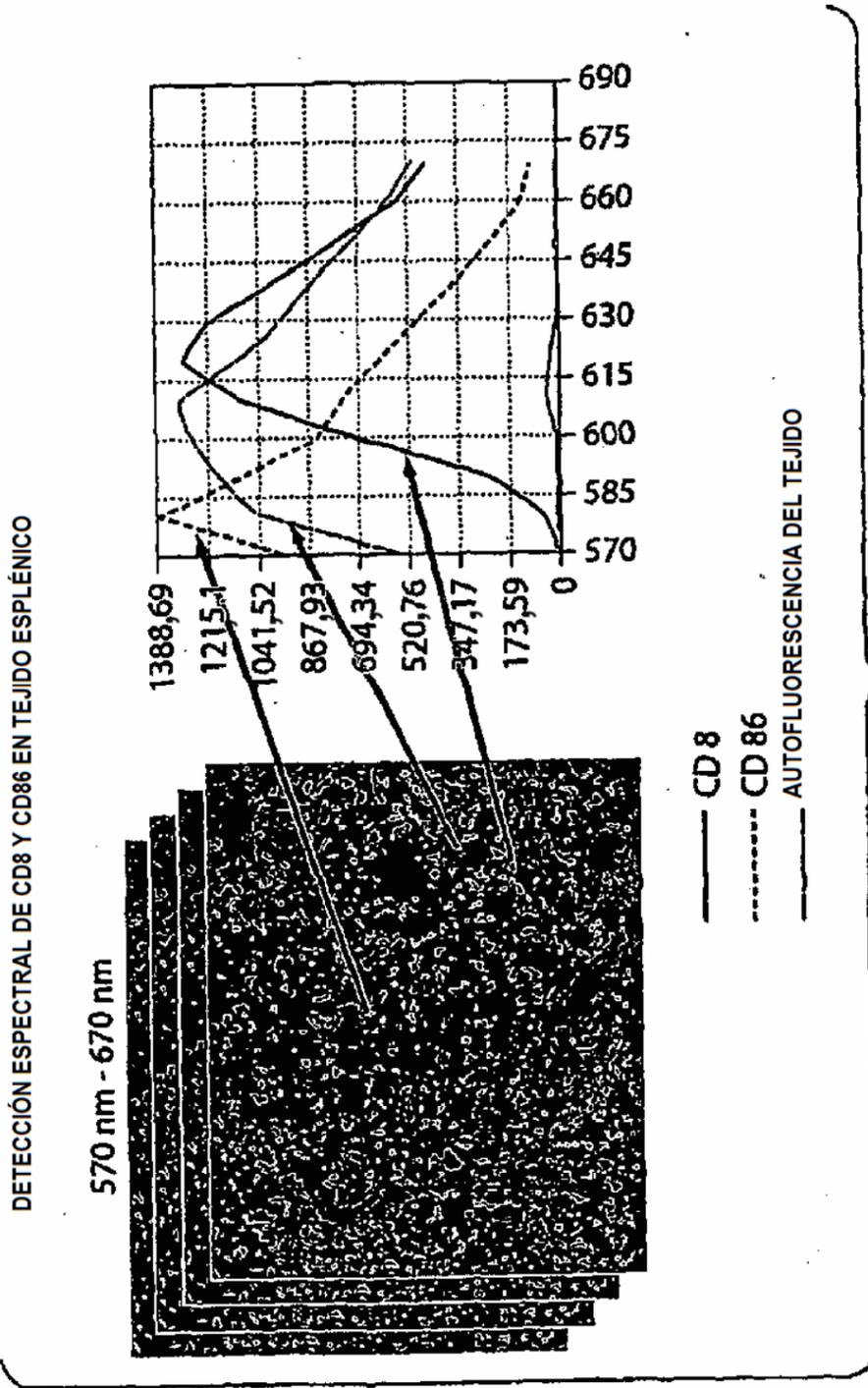


Fig.16

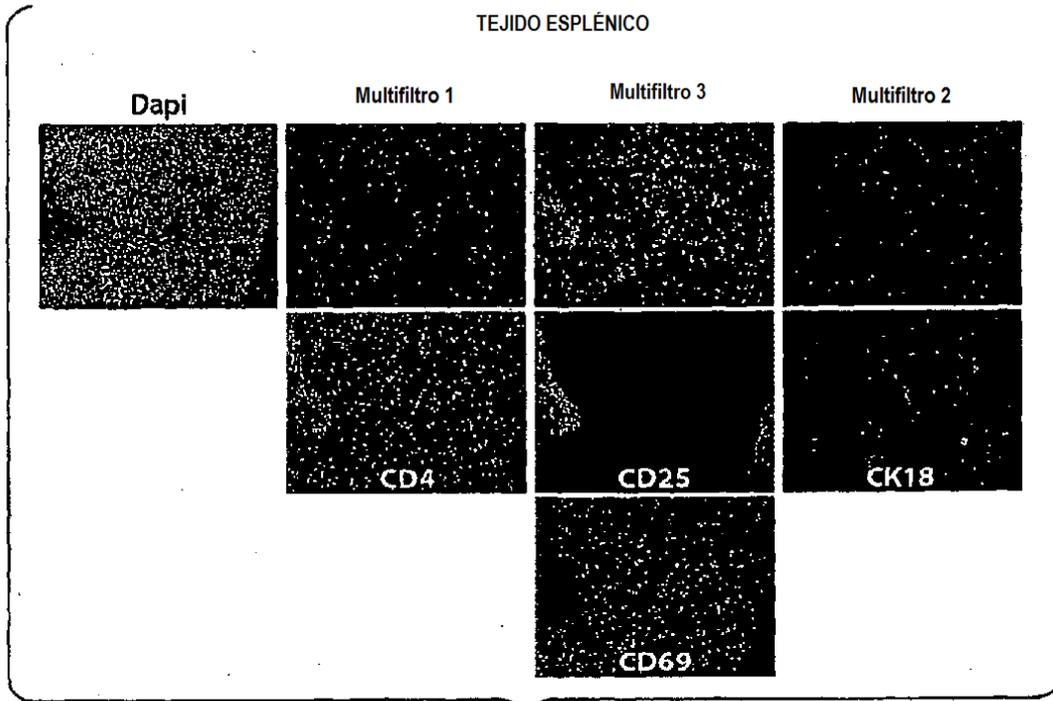


Fig. 17

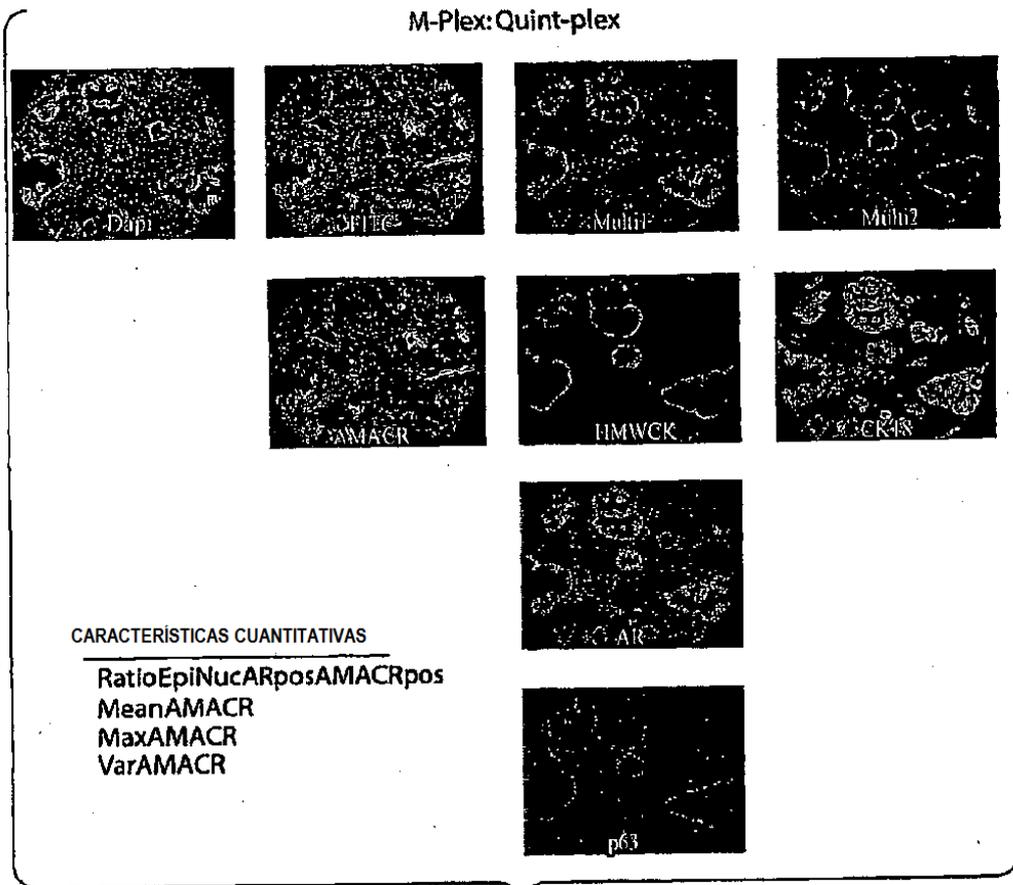


Fig. 18

MULTIPLEXADO EN CÁNCER DE PRÓSTATA - ESTADO DE LA TÉCNICA

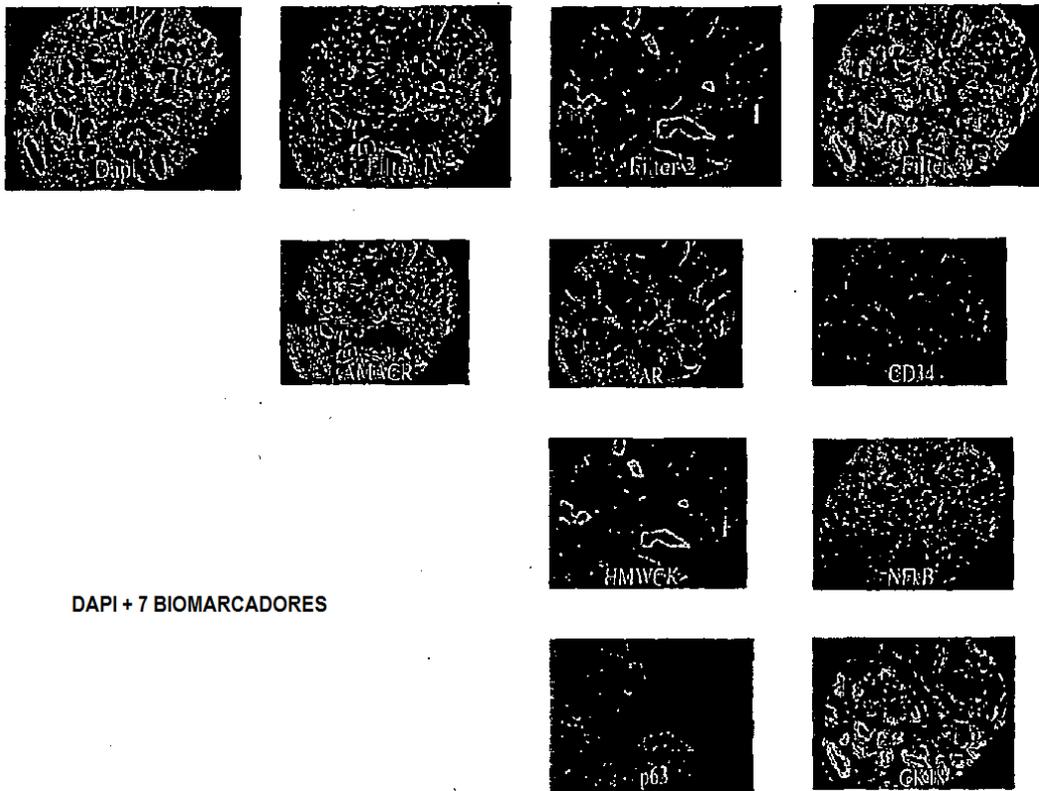


Fig. 19

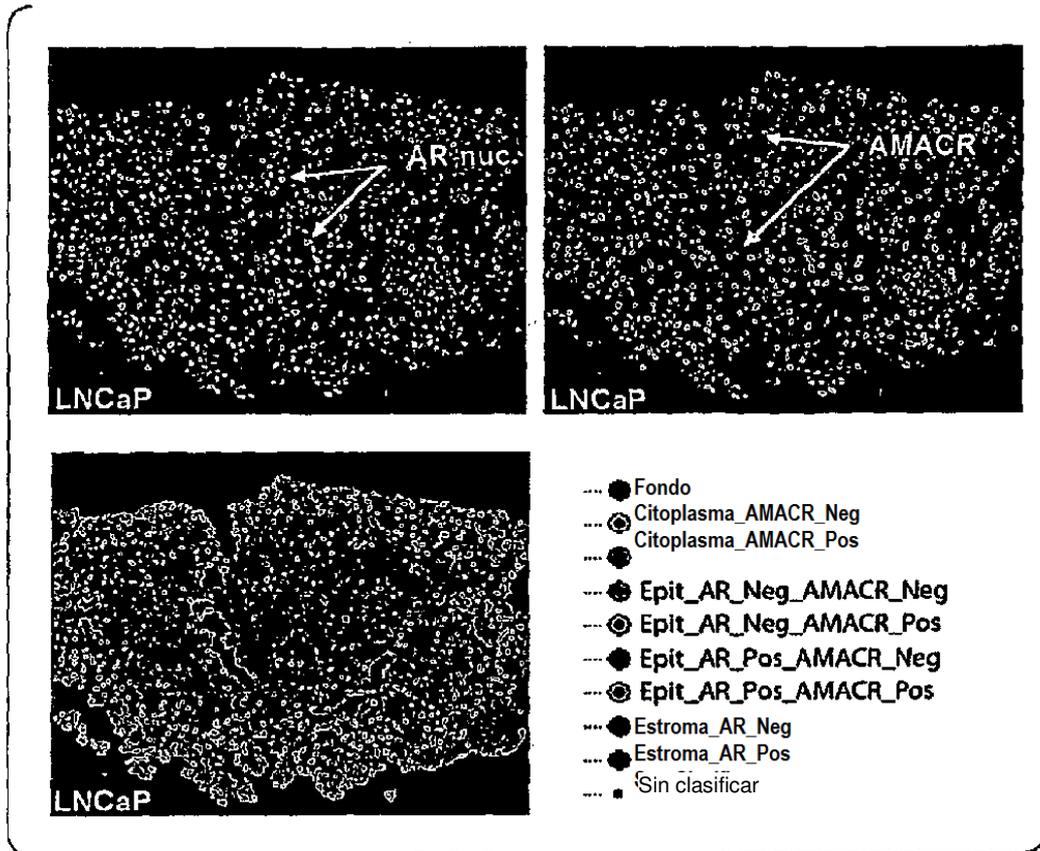


Fig. 20

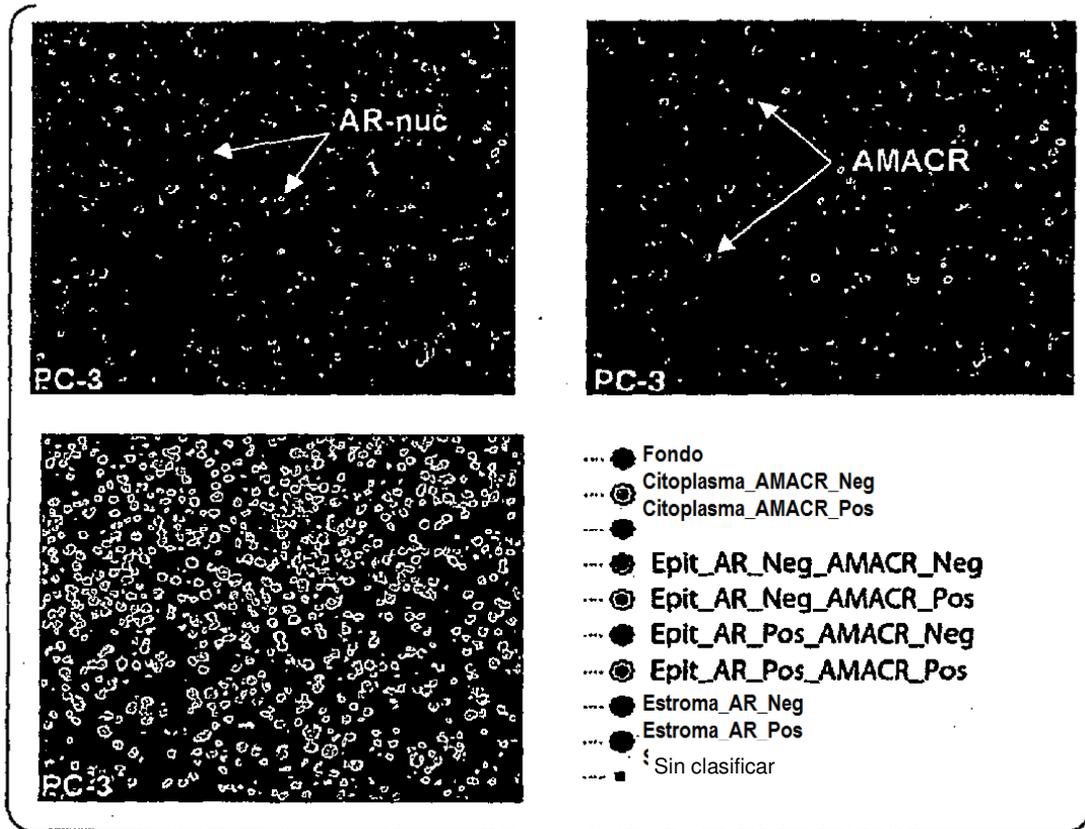


Fig.21