

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 350**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2005** **E 05723587 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014** **EP 1733437**

54 Título: **Reactivos de inmunoanálisis y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

24.02.2004 US 784163

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

22.12.2014

73 Titular/es:

BIOCARE MEDICAL, LLC (100.0%)
4040 Pike Lane
Concord, CA 94520, US

72 Inventor/es:

TACHA, DAVID

74 Agente/Representante:

POLO FLORES, Carlos

ES 2 525 350 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

Reactivos de inmunoanálisis y procedimientos de uso de los mismos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la detección de antígenos en una muestra usando reactivos de anticuerpos.

DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

El campo de la inmunoquímica en evolución ha conducido a protocolos simplificados con tiempos de incubación más cortos y automatización. La capacidad de teñir dos o más anticuerpos en una sección de tejido también ha evolucionado.

Así, Suzuki y col. (2000) *Differentiation* 66:106-115 describen un procedimiento de detección de antígenos inmunoquímico múltiple simultáneo de dos capas, en el que los anticuerpos secundarios están conjugados con fluoróforos. Tsurui y col. (2000) *J. Histochem. Cytochem.* 48:653-662 describen un procedimiento de detección de antígenos inmunoquímico múltiple simultáneo de una capa o dos capas, en el que los marcadores detectables son fluoróforos. Mason y col. (2000) *J. Pathol.* 191:452-461 describen un procedimiento de detección de antígenos inmunoquímico múltiple simultáneo de dos capas, en el que los anticuerpos secundarios están conjugados con fluoróforos. Van Noorden (2002) *Folia Histochemica Cytobiologica* 40:121-124 describe procedimientos de detección de antígenos inmunoquímicos múltiples simultáneo de dos capas. Van Noorden y col. (2003) *Biomedical Scientist* 808-811 describen un procedimiento de detección de antígenos inmunoquímico múltiple secuencial de tres capas. La solicitud de patente de EE.UU. n° 2002/0173053 describe un procedimiento de detección de antígenos inmunoquímico múltiple secuencial de una capa, en el que los antígeno-anticuerpos específicos están conjugados a un marcador enzimático. Shi y col. (1999) *Applied Immunohistochem. Mol. Morphol.* 7:2010-208, describen un procedimiento de detección de antígeno único inmunoquímico de dos capas (véase la página 203, columna derecha).

Un ensayo de tinción doble o triple sería mucho más práctico tanto para el patólogo como para el histotecnólogo, reduciendo el error, reduciendo los reactivos, reduciendo la cantidad de tejido necesaria, y lo que es más importante el tiempo. Además, esta tecnología conduce a un procedimiento más práctico para que un patólogo haga un diagnóstico con anticuerpos que tienen que ser teñidos al unísono, así como en situaciones donde el tejido está limitado.

En el pasado, las tinciones dobles o triples se llevaban a cabo principalmente en el marco de la investigación. Sin embargo, los procedimientos de tinción dobles y triples previos requerían personal entrenado, eran técnicamente difíciles, consumían tiempo, y en la mayoría de los casos no se usaban en un sistema de inmunotinción automático. Por lo tanto, el uso de técnicas de tinción doble o triple no se usa a menudo en el marco clínico.

Previamente se usó un sistema típico de 3 etapas de avidina-biotina de peroxidasa de rábano picante (HRP) para la primera secuencia de anticuerpo, seguido de una etapa de elución (desnaturalización) y después una segunda secuencia de anticuerpo con un sistema de fosfatasa alcalina (AP). Esto produce un precipitado de color marrón (DAB) y rojo (Fast Red) para cada antígeno, produciendo así una tinción doble. Si el tejido contenía biotina endógena, era necesaria una etapa de avidina-biotina. Una tinción doble podría requerir de 30 a 40 etapas y una tinción triple podría requerir de 40 a 50 etapas, dependiendo de la complejidad del ensayo. La mayoría de los dispositivos de tinción inmunohistoquímica automáticos no estaban diseñados para hacer estos ensayos de tinción doble complicados. También requería un técnico altamente capacitado para valorar adecuadamente cada secuencia de anticuerpos.

Recientemente se han introducido kits de detección poliméricos sin biotina tanto para el sistema de detección de HRP como de AP (DakoCytomation; Zymed Laboratories). Estos kits eliminan las etapas de bloqueo de avidina-biotina y requieren una etapa para la detección frente a dos. Sin embargo, dependiendo del dispositivo de inmunotinción y el número de lavados requeridos, estos kits todavía requieren una experiencia

técnica significativa y la programación de la tinción IHC no está adecuadamente diseñada para las tinciones dobles y en especial las tinciones triples. También se ha descrito la falta de sensibilidad con antígenos nucleares con este tipo de kit polimérico. Esta nueva tecnología ha sido popular en el campo de la investigación, pero no se ha usado mucho en el marco clínico, debido a estas dificultades.

5 El uso de cócteles de anticuerpos se ha usado en el marco clínico durante una serie de años. LCA, AE1/AE3, CMV, y más recientemente, CD15, Pan Melanoma (HMB45 + MART-1 + Tirosinasa) y PIN-4 (P504S + HMWCK + p63) son varios cócteles que se han usado de forma rutinaria en el marco clínico. También se han usado kits de detección universales tanto dirigidos contra ratón como dirigidos contra conejo desde finales de
10 los 80.

También se ha usado durante muchos años la tecnología de tinción doble y triple usando inmunohistoquímica en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina. Las tinciones dobles se llevan a cabo aplicando anticuerpos primarios y detección en una secuencia de etapas para lograr el marcaje múltiple en el mismo
15 tejido. Diferentes procedimientos usados para la detección incluyen procedimientos de fluorescencia, inmunoperoxidasa, inmuno-oro y procedimientos in situ.

En vista de lo anterior, se han hecho evidentes las desventajas de la tecnología de tinción doble previa. Es ilustrativo de estas desventajas el procedimiento típico de la tecnología previa para llevar a cabo un
20 inmunoensayo de tinción doble. Por ejemplo, la muestra se trata con peróxido de hidrógeno durante 5 min, seguido de bloqueo con dos proteínas opcionales (de 5 a 10 min) y bloqueo con avidina-biotina (de 20 a 40 min). Después, se aplica el anticuerpo primario durante 30 a 60 min, se une durante 10 a 20 min, se marca, p. ej., con HRP durante 10 a 20 min, se trata con DAB durante 5 min, y después se desnaturaliza durante 5 min. Posteriormente, se aplica el segundo anticuerpo primario durante 30 a 60 min, seguido de un bloqueo de
25 proteína opcional de 5 a 10 min, unión durante 10 a 20 min, y después marcaje del segundo anticuerpo primario, por ejemplo, con AP, durante 10 a 20 min. La reactividad se detecta aplicando Fast Red durante 10 a 20 min seguido de contratinción (más azulado) durante 30 y 60 segundos y se aplica cubreobjetos, lo cual requiere un medio de montaje basado en agua. El tiempo total para este procedimiento de tinción doble es aproximadamente de 3 a 4 horas con un total de 11-15 etapas manuales; más de 12 a 14 lavados (32 etapas
30 máximo). Además, para una tinción triple habría que añadir 5 etapas más (40+ etapas máximo) y requeriría un tiempo total de 4 a 5 horas.

En general, a pesar de que se conoce la dilución de anticuerpos en un tampón y el almacenamiento de anticuerpos, esas diluciones típicamente se llevaban a cabo en disolución salina tamponada con fosfato y
35 otra disolución isotónica y también puede tener cantidades pequeñas de albúmina de suero bovino y en algunos casos, cantidades relativamente pequeñas de detergentes tales como Triton X-100 o NP-40 (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col (eds.), John Wiley and Sons, Inc. N.Y., 2001). Sin embargo, la combinación de reactivos en un cóctel de anticuerpos primarios no se ha
40 descrito previamente. Además, no se sabía que estos cócteles estabilizarían los anticuerpos y permitirían la tinción rápida y eficaz con dos o más anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona reactivos que contienen anticuerpos primarios y un sistema de detección, que cumplen estos objetivos. Por lo tanto, la presente invención proporciona un medio para reducir notablemente la cantidad de etapas requeridas y proporciona la capacidad para llevar a cabo inmunoanálisis automáticos.

50 La presente invención se define en las siguientes reivindicaciones.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden dos o más anticuerpos mezclados con diferentes reactivos.

55 En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden reactivos adecuados para la detección del anticuerpo que contiene los reactivos.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para detectar dos o más antígenos en una sola muestra, usando composiciones de la invención. En una realización, el procedimiento se puede

llevar a cabo en un dispositivo automático que puede teñir y detectar antígenos en la muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 Salvo que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por un experto en la técnica. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, en el presente documento se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones.
- 10 Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

- Se hace referencia a libros de texto estándar de biología molecular que contienen definiciones y procedimientos y medios para llevar a cabo técnicas básicas, abarcadas por la presente invención. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (2001), Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col (eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York (2001), y las diferentes referencias citadas en los mismos.
- 15

Composiciones de anticuerpos primarios

- 20 La presente invención proporciona anticuerpos primarios en cócteles, es decir, una composición de anticuerpos, que están listos para usar o concentrados. Las ventajas de proporcionar dichos cócteles incluyen de la mitad a una tercera parte del número total de etapas primarias para llevar a cabo un procedimiento de tinción doble, es decir, tinción con dos anticuerpos; cuando se usa un cóctel de anticuerpos primarios de ratón y conejo, se puede omitir la etapa de desnaturalización; una tinción triple, es decir, tinción con tres
- 25 anticuerpos, se puede llevar a cabo con 8 a 10 etapas frente a 16 a 24 etapas en procedimientos previos, es decir, de 2 a 2 1/2 h para la presente invención frente a 4 a 5 horas en procedimientos previos; se pueden automatizar completamente tanto los procedimientos de tinción doble como triple; permite la reducción del número de portaobjetos a procesar; permite un nivel más alto de control de calidad, por ejemplo, cuando las muestras teñidas son vistas por un patólogo. En general, la presente invención también reduce los costes
- 30 totales, lo cual es un factor significativo en el procesamiento de muestras en el marco clínico.

- La presente invención se puede aplicar donde se use de forma convencional la tinción de anticuerpos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo tinción doble, triple y cuádruple en inmunocitoquímica; inmunohistoquímica; secciones congeladas; tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina; cultivos celulares; micromatrices
- 35 de cultivo tisular o celular; tejidos embebidos en parafina (cualquier protocolo de fijación); frotis celular; bloques celulares; frotis de PAP; frotis de sangre; e improntas ("Touch Preps"). En algunas realizaciones, la muestra se une a un soporte sólido, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio, placa ELISA, disco de cultivo, disco de vidrio, disco de plástico, pocillos de vidrio o pocillo de plástico.

- 40 Las composiciones o cócteles de anticuerpos de la presente invención comprenden dos o más anticuerpos en procedimientos de tinción doble, y por ejemplo, en procedimientos de tinción triple, las composiciones contendrían tres anticuerpos, etc. Los anticuerpos preferiblemente son diferentes en cuanto que los anticuerpos reaccionan con diferentes antígenos y/o diferentes isoformas o epítomos de una proteína/antígeno particular en una sola muestra. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y
- 45 se pueden obtener de acuerdo con tecnología de anticuerpos convencional conocida en la técnica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier especie, tal como de rata, caballo, cabra, conejo, ser humano, ratón, etc. En una realización preferida, los anticuerpos son de conejo, cabra y/o ratón. En otra realización preferida, los al menos dos de los anticuerpos en la composición son de diferentes fuentes o especies. En otra realización preferida, al menos uno de los anticuerpos en los cócteles de anticuerpos primarios es un anticuerpo de
- 50 conejo, y más preferiblemente un anticuerpo monoclonal de conejo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de conejo se pueden obtener de Lab Vision Corp; Fremont, CA.

- Los anticuerpos se pueden diluir en uno o más de los sistemas tampón descritos en el presente documento, por ejemplo al menos a 1:50 y preferiblemente de aproximadamente 1:50 a 1:6000, incluyendo 1:100, 1:150,
- 55 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:450, 1:500, 1:550, 1:600, 1:650, 1:700, 1:750, 1:800, 1:850, 1:900, 1:1000, 1:1100, 1:1200, 1:1300, 1:1400, 1:1500, 1:1600, 1:1700, 1:1800, 1:1900, 1:2000, 1:2100, 1:2200, 1:2300, 1:2400, 1:2500, 1:2600, 1:2700, 1:2800, 1:2900, 1:3000, 1:3100, 1:3200, 1:3300, 1:3400, 1:3500, 1:3600, 1:3700, 1:4000, 1:4100, 1:4200, 1:4300, 1:4400, 1:4500, 1:4600, 1:4700, 1:4800, 1:4900, 1:5000, 1:5100, 1:5200, 1:5300, 1:5400, 1:5500, 1:5600, 1:5700, 1:5800, 1:5900 y todos los intervalos y valores entre

ellos.

De acuerdo con la invención, los dos o más anticuerpos se preparan en una composición que comprende un sistema tampón que estabiliza los anticuerpos y facilita una detección más rápida después de que los anticuerpos se han unido al antígeno.

En una realización, la composición de los dos o más anticuerpos contiene, en una realización, fosfato sódico monobásico, monohidrato; fosfato potásico dibásico, trihidrato; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica, y agua y en donde el pH es aproximadamente de 5,5 a 6,5 y preferiblemente 6,0. En una realización preferida, esta composición contiene aproximadamente fosfato sódico monobásico, monohidrato de 1,5 a 3,0 g/l; fosfato potásico dibásico, trihidrato, de 0,5 a 0,6 g/l; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) de 0,5 a 1,5 ml/l, albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % de 50 a 100 ml/l, azida sódica de 0,5 a 1,5 g/l, y el resto agua. En una realización más preferida, esta composición contiene aproximadamente fosfato sódico monobásico, monohidrato 2,4 g/l; fosfato potásico dibásico, trihidrato, 0,56 g/l; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) 1 ml/l, albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % 100 ml/l, azida sódica 0,9 g/l, y el resto agua. En una realización, se puede añadir azul de bromotimol a estas composiciones en una cantidad de 0,0001 a 0,001 g/l, y preferiblemente 0,005 g/l.

En una segunda realización, la composición contiene PBS, azida sódica, monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20), BSA y el resto agua, y donde el pH es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 6,5 y preferiblemente aproximadamente 7,3. En una realización preferida, esta composición contiene 10x PBS de 40 a 60 ml/l, azida sódica de 0,75 a 1,25 g/l, monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) de 0,1 a 0,3 ml/l, BSA de 45 a 65 g/l, y el resto agua. En una realización preferida adicional, esta composición contiene 10x PBS 50 ml/l, azida sódica 0,9 g/l, monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) 0,2 ml/l, BSA 55 g/l, y el resto agua.

En una tercera realización, la composición contiene Tris-HCl, azida sódica, BSA, ácido clorhídrico y el resto agua a un pH de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5 y preferiblemente aproximadamente 6,2. En una realización preferida, esta composición contiene Tris-HCl de 3,0 a 4,0 g/l, azida sódica de 0,75 a 1,2 g/l, BSA de 7,5 a 12,5 g/l, ácido clorhídrico al 25 % de 0,2 a 0,3 ml/l y el resto agua. En una realización preferida adicional, esta composición contiene Tris-HCl 3,5 g/l, azida sódica 0,9 g/l, BSA 10 g/l, ácido clorhídrico al 25 % 0,25 ml/l y el resto agua.

En una cuarta realización, la composición contiene 1 parte de disolución A y 1 parte de disolución B, donde la disolución A contiene PBS, conservante (Proclin™ 950), monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20), caseína purificada, Prionex (gelatina de tipo A purificada), y agua, y la disolución B contiene fosfato sódico monobásico, monohidrato; fosfato potásico dibásico, trihidrato; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica, y agua y en la que el pH es aproximadamente de 5,75 a 6,25 y preferiblemente un pH de 6,0. En una realización preferida de esta composición, la disolución A contiene 10X PBS de 75 a 125 ml/l, conservante (Proclin™ 950) 2,5 ml/l, monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) al 50 % de 0,25 to 0,75 ml/l, caseína purificada de 2,5 a 7 g/l, Prionex (gelatina de tipo A purificada) de 2,0 a 3,0 ml/l, y agua; y la disolución B contiene fosfato sódico monobásico, monohidrato de 2,0 a 3,0 g/l; fosfato potásico dibásico, trihidrato de 0,5 a 0,6 g/l; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) de 0,75 a 1,25 ml/l, albúmina de suero bovino (BSA) de 2,5 a 7,5 % de 75 a 125 ml/l, azida sódica de 0,7 a 1,1 g/l, y el resto agua. En una realización preferida adicional de esta composición, la disolución A contiene 10 X PBS 100 ml/l, conservante (Proclin™ 950) 2,5 ml/l, monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) al 50 % 0,5 ml/l, caseína purificada 5 g/l, Prionex (gelatina de tipo A purificada) 2,5 ml/l, y agua, y la disolución B contiene aproximadamente fosfato sódico monobásico, monohidrato 2,4 g/l; fosfato potásico dibásico, trihidrato 0,56 g/l; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) 1 ml/l, albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % 100 ml/l, azida sódica 0,9 g/l, y el resto agua. En una realización preferida adicional, la disolución B también contiene azul de bromotimol de 0,0001 a 0,001 g/l, preferiblemente azul de bromotimol 0,005 g/l.

En una quinta realización, las composiciones de anticuerpos primarios comprenden fosfato sódico monobásico, monohidrato; fosfato potásico dibásico, trihidrato; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica y agua, y en las que el pH es aproximadamente de 5,5 a 6,5, y preferiblemente 6,0, y glicerol de 40 a 60 %, preferiblemente glicerol al 50 %. En una realización preferida, esta composición contiene aproximadamente fosfato sódico monobásico, monohidrato de 1,5 a 3,0 g/l; fosfato potásico dibásico, trihidrato de 0,5 a 0,6 g/l; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) de 0,5 a 1,5 ml/l, albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % de 50 a 100 ml/l, azida sódica de 0,5 a 1,5 g/l, 0,005 g/l,

y el resto agua. En una realización más preferida, esta composición contiene aproximadamente fosfato sódico monobásico, monohidrato 2,4 g/l; fosfato potásico dibásico, trihidrato 0,56 g/l; monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) 1 ml/l, albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % 100 ml/l, azida sódica 0,9 g/l, y el resto agua. En una realización, se puede añadir azul de bromotimol a estas composiciones en una cantidad de 0,0001 a 0,001 g/l, y preferiblemente 0,005 g/l.

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos primarios y combinaciones de anticuerpos útiles en la presente invención incluyen los listados a continuación (AP = fosfatasa alcalina, HRP = peroxidasa de rábano picante, Ms + ratón): marcador de linfocitos T y apoptosis (CD3 [PS1]; Caspasa-3 (Policlonal)); marcador de linfocitos B frente a linfocitos T (CD20 [L26]; CD3 (monoclonal de conejo) [SP11]); marcador de linfocitos B frente a linfocitos T (CD20 [L26]; CD3 [PS 1]); vasos sanguíneos y proliferación celular (CD31 [JC/70A]; Ki-67 (monoclonal de conejo) [SP6]); marcador de dermatopatología (CD34 [QBEnd/10]; Factor XIII Subunidad a (policlonal)); cáncer de colon frente a cáncer de mama o pulmón (CDX2 [CDX2-88]; CK7 [K72.7]); G.I frente a pulmón o mama (CK7 [K72.7]; CK20 [Ks20.8]); Kappa/Lambda (Kappa [KDB-1]; Lambda (policlonal));

15 marcador de proliferación celular y apoptosis (Ki-67 [MIB-1]; Caspasa-3 (policlonal)); marcador de proliferación celular y apoptosis (M30 (CM224A); i-67 (monoclonal de conejo) [SP6]); marcador de cribado (LCA [PD7/26/16] + 2B11; S-100 (policlonal)); marcador de cribado (LCA [PD7/26/16] + 2B11); S100 (Policlonal); CK8/18 [5D3]) proliferación de linfocitos B y celular (CD20 [L26]; Ki-67 (monoclonal de conejo) [SP6]; Pan-Melanoma; tirosinasa [T311]; S-100 (policlonal de conejo); MART-1 [M2-7C10 + M2-9E3] o A103);

20 cáncer de mama invasivo (p63 [BC4A4]; CK5 [XM26]; CK8/18 [5D3]); PIN Cotel-2 (p63 [BC4A4]; P504S (monoclonal de conejo) [P504S]); PIN Cotel-4 (p63 [BC4A4]; HMW CK [DE-SQ]; P504S (monoclonal de conejo)); marcador de mesotelioma [CK5/6] [CK5/6.007]; calretinina (monoclonal de conejo) [SP13]; marcador de pronóstico de cáncer de mama (receptor de estrógenos [6F11]; Ki-67 (monoclonal de conejo));

25 marcador de pronóstico de cáncer de mama (receptor de estrógenos (monoclonal de conejo) [SP1]; Ki-67 [MIB-1]); marcador de pronóstico de cáncer de mama (CK5 [XM26]; CK17 [Ks17.E3]; CK8/18 [5D3]); marcador de cáncer de hígado (CD10 [56C3]; antígeno prostático específico (PSA) (policlonal); antígeno hepático específico (HSA) [OCH1E5]; Pan neuroendocrina; cromogranina A [LK2H10 + PHE5]; sinaptofisina (monoclonal de conejo) [SP11]); adenocarcinoma frente a carcinoma de células escamosas (HMW CK [DE-SQ] o [34βE12]; LMW CK (CK8/18) [5D3]); marcador de linfocitos B y apoptosis (CD20 [L26]; Caspasa-3 (policlonal));

30 marcador de linfocitos T y proliferación celular (CD3 [PS1]; Ki-67 (monoclonal de conejo) [SP6]); leucemia linfocítica crónica (CD5 (monoclonal de conejo) [SP9]; PAX-5 [BC/24]); y marcador de linfocitos T (CD4 [1F6]; CD8 (policlonal)).

Se citan ejemplos adicionales no limitantes de cócteles (composiciones) de anticuerpos en la siguiente tabla (M = ratón; R = conejo):

LCA (M) + S100 (R)
LCA (M) + S100 (R) + CK8/18 (M) o Pan citoqueratina (tinción triple)
Kappa (M) y Lambda (R)

40 L26 (M) linfocitos B + CD3 (R) linfocitos T (linfoma)
L26 (M) + Ki-67 (R)
CD3 (M) + Ki67 (R)
Ki-67 (M) + Caspasa-3 (R)
HMWCK (M) + LMWCK (M)

45 CK7 (M) + CK20 (M)
CK7 (M) + CDX-2 (M)
ER (M) + Ki-67 (R)
P504S (R) + HMWCK + p63 (M) (PIN)
CK5 + p63 + CK8/18 (cáncer de mama)

50 CK5/6 (M) + Calretinina (R)
MART-1 + tirosinasa + S100 (R) (Melanoma)
CD34 (M) + Factor XIIIa (R)
apoptótico/CK18 (M) + Ki-67 (R)
CD31 (M) + Ki-67 (R)

55 CD10 + HSA + PSA (cáncer de hígado y metástasis) (tinción triple)
PAX-5 + CD 5 (leucemia)
CK/5 + CK17 + CK8/18
CK5/6 + Calretinina
ER + Ki-67

CDX2 + CK7

Composiciones de anticuerpos secundarios

5 El uso de anticuerpos secundarios para detectar la unión entre un anticuerpo primario y un antígeno es conocido (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausebel y col (eds.), John Wiley and Sons, Inc. N.Y., 2001). Sin embargo, en la presente invención, la formulación de una composición de anticuerpos secundarios capaz de detectar dos anticuerpos diferentes al mismo tiempo, no era conocida.

10 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición de anticuerpos secundarios acoplados con un polímero sin biotina conjugado con poli-HRP o un poli-ALP, como describen Shi y col ((1999) *Appl. Immuno & Mol. Morph.* 7(3):201-208). Los restos o sistemas enzimáticos detectables que se conjugan con anticuerpos secundarios son conocidos (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausebel y col (eds.), John Wiley and Sons, Inc. N.Y., 2001).

Los anticuerpos secundarios se desarrollan para que reaccionen con los anticuerpos primarios basándose en el origen de la especie del anticuerpo primario, p. ej., si el anticuerpo primario es un anticuerpo de ratón, entonces el anticuerpo secundario sería, por ejemplo, un anticuerpo de conejo dirigido contra Ig de ratón. En la presente invención, los dos o más anticuerpos secundarios para visualizar la unión entre los dos o más anticuerpos primarios y los dos o más antígenos, pueden ser de la misma especie o de especies diferentes.

De acuerdo con la presente invención, la composición de anticuerpos secundarios descrita antes, p. ej., que contiene dos o más anticuerpos secundarios específicos para la composición de anticuerpos primarios, está contenida en un sistema tampón adecuado para estabilizar la HRP y los restos de AP acoplados a los anticuerpos secundarios. En un aspecto de esta realización, el sistema tampón es un sistema tampón de Tris, que también puede contener un conservante que previene el crecimiento microbiano y no da como resultado ninguna degradación apreciable de los restos detectables. En una realización, el conservante es Proclon®.

30 En otra realización, el sistema tampón comprende una disolución de un tampón de Tris a un pH de 7,3 a 7,9, monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) y suero de cabra. En una realización preferida, la composición de anticuerpos secundarios comprende tampón de Tris de 0,8 a 1,2 M, pH de 7,3 a 7,9 con monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) de 0,025 a 0,075 % y suero de cabra de 2,5 a 3,5 %; y más preferiblemente, la composición de anticuerpos secundarios comprende tampón de Tris 0,1 M, pH 7,6 con monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) al 0,05 % y suero de cabra al 3 %. En una realización alternativa, la composición anterior puede contener también disolución salina tamponada con tris (TBS) en cantidades de 30 a 37 ml de 10 x TBS/l, preferiblemente 34 ml de 10 x TBS/l.

40 En una realización preferida, se usan un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de ratón conjugada con poli(fosfatasa alcalina) (ALP) y un anticuerpo de carpa dirigido contra Ig de ratón conjugada con poli(peroxidasa de rábano picante) (HRP) como anticuerpos secundarios y reaccionan tanto con las cadenas pesadas como ligeras de IgG de ratón y de conejo. La polimerización de ALP y HRP proporciona un aumento significativo de la sensibilidad a la tinción, comprado con otros anticuerpos secundarios conjugados con ALP o HRP convencionales. Los procedimientos de bloqueo de avidina-biotina no son necesarios cuando se usan los anticuerpos secundarios conjugados. Por lo tanto, obviamente, el cóctel de anticuerpos primarios contendrá un anticuerpo de conejo y uno de ratón.

50 En una realización de la presente invención, se usan cromógenos para detectar el complejo de anticuerpo-antígeno. Los cromógenos han mejorado espectacularmente en los últimos 5 años. En el pasado, varios cromógenos requerían un medio de montaje soluble en agua y/o se decoloraban a lo largo del tiempo. La nueva generación de cromógenos son permanentes y no se decoloran. Vienen en varios colores diferentes. Ahora es fácil lograr cuatro cromógenos diferentes en una sola sección. Por ejemplo, los cromógenos útiles en sistemas de HRP incluyen, DAB (que aparece marrón), ABC (que aparece rojo ladrillo) y púrpura de Bajoran (que aparece de lavanda a púrpura oscuro). Por ejemplo, los cromógenos útiles para el sistema de fosfatasa alcalina incluyen Fast Red (que aparece de rosa a fucsia) y Ferangi Blue (que aparece azul real).

El Bajoran Purple es un cromógeno permanente y es compatible con la estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. El Bajoran Purple no es soluble en alcohol o xileno y se puede cubrir con cubreobjetos al igual que

DAB. Cuando está en presencia de una enzima peroxidasa, el Bajoran produce tinción lavanda-púrpura.

La 3,3'-diaminobencidina (DAB) es un cromógeno ampliamente usado para la tinción inmunohistoquímica y la inmunotransferencia. Cuando está en presencia de enzima peroxidasa, DAB produce un precipitado marrón
5 que es insoluble en alcohol y xileno. En una realización preferida, DAB se usa con un potenciador para añadir contraste y aumentar la intensidad de la tinción, tal como, por ejemplo, DABENHANCER (BIOCARE Medical).

Fast Red es un cromógeno ampliamente usado para la tinción inmunohistoquímica. Cuando está en presencia de la enzima fosfatasa alcalina (AP), Vulcan Red Fast produce un precipitado rojo fucsina brillante
10 que es insoluble en disolventes orgánicos y se puede cubrir con cubreobjetos con un medio de montaje permanente. Cuando se usa un sistema de fosfatasa alcalina, se debe usar tampón de tris (pH 7,6) en lugar de PBS como tampón de aclarado.

Cuando está en presencia de la enzima fosfatasa alcalina (AP), el Ferangi Blue produce un precipitado azul
15 real que es insoluble en disolventes orgánicos, y se puede cubrir con cubreobjetos con un medio de montaje permanente. Cuando se usa un sistema de fosfatasa alcalina, se debe usar tampón de tris (pH 7,6) en lugar de PBS como tampón de aclarado.

En realizaciones preferidas, se usan contratinciones para visualizar los patrones de tinción del complejo de
20 anticuerpo-antígeno. Los ejemplos no limitantes de estas contratinciones incluyen hematoxilina, Nuclear Red Fast, verde de metilo y azul de metilo.

En un conjunto de realizaciones preferidas, los cócteles de anticuerpos primarios diluidos en diferentes tampones (denominados más adelante como 1-5 correspondiente de la primera a la quinta realizaciones de
25 los cócteles de anticuerpos primarios anteriores), combinados con diferentes cromógenos se describen a continuación:

Procedimientos para llevar a cabo un inmunoanálisis

30 Para llevar a cabo un inmunoanálisis usando las composiciones de la presente invención, una muestra se puede poner en contacto primero con una composición de anticuerpos primarios, es decir, que contiene dos o más anticuerpos primarios, y posteriormente con un reactivo de detección en cóctel, es decir, que contiene dos o más anticuerpos secundarios acoplados a poli(AP) y poli(HRP). El procedimiento de tinción de anticuerpos de la presente invención es diferente de los protocolos anteriores de tinción usados previamente,
35 porque antes de la presente invención, llevar a cabo la tinción de una muestra con dos o más anticuerpos requería la aplicación del primer anticuerpo primario seguido de detección de este anticuerpo, una posterior etapa de desnaturalización para preparar la muestra para recibir un segundo anticuerpo primario, y después aplicar un segundo anticuerpo primario seguido de detección de este anticuerpo, etc.

40 En una realización adicional del procedimiento de tinción de anticuerpos de la presente invención, una segunda composición de anticuerpos primarios, contenga un solo anticuerpo primario o sea un cóctel de 2 o más anticuerpos, se añade a la misma muestra seguido de detección de la primera composición de anticuerpos primarios en cóctel. Posteriormente, la segunda composición de anticuerpos primarios se detecta usando los reactivos de detección, anticuerpos secundarios y restos detectables como se describe en la
45 presente memoria.

En realizaciones adicionales para llevar a cabo una doble tinción (o un inmunoanálisis con dos anticuerpos diferentes) usando las composiciones de anticuerpos y los reactivos de detección de la presente invención, se puede usar el siguiente protocolo, y se usan etapas de lavado entre las diferentes etapas como se realiza
50 típicamente en un inmunoanálisis. En algunos casos, puede ser preferible pretratar la muestra con un peróxido para facilitar la recuperación de antígeno y/o digestión enzimática, sin embargo, como apreciará un experto en la materia, algunas disoluciones de recuperación bloquean la peroxidasa y por lo tanto no se llevaría a cabo el tratamiento con peroxidasa. Además, en algunos casos reconocidos por el experto en la materia, puede ser útil llevar a cabo una etapa de bloqueo de proteína para minimizar la unión no específica
55 de los anticuerpos a la muestra. Si se usa la etapa de bloqueo de proteína, típicamente se lleva a cabo durante aproximadamente 10 minutos.

El cóctel de anticuerpos primarios se aplica a la muestra que se va a ensayar, típicamente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 min, después de cuyo tiempo se aplica un cóctel de anticuerpos

- secundarios-polímero de HRP-ALP durante de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 min. Para visualizar los complejos de anticuerpo-antígeno se aplica un primer cromógeno, p. ej., DAB durante aproximadamente 5 min seguido de la aplicación de un segundo cromógeno, p. ej., Fast Red durante aproximadamente 10 min. En realizaciones preferidas de la presente invención, después se realiza la
- 5 contratinción de la muestra, p. ej., con hematoxilina progresiva, durante aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 min para facilitar la mejor visualización del antígeno teñido. La muestra, si está en un portaobjetos después se puede cubrir con un cubreobjetos para conservar la muestra teñida. Por lo tanto, este procedimiento se puede llevar a cabo en aproximadamente 2 a 2 ½ h, requiriendo solo aproximadamente de 5 a 7 etapas y de 6 a 8 etapas de lavado.
- 10 Para llevar a cabo una tinción triple (o un inmunoensayo con tres anticuerpos diferentes) usando las composiciones de anticuerpos y los reactivos de detección de la presente invención, se puede usar el siguiente protocolo, y se usan etapas de lavado entre las diferentes etapas como se realiza típicamente en un inmunoanálisis. En algunos casos, puede ser preferible pretratar la muestra con un peróxido para facilitar la recuperación de antígeno y/o digestión enzimática, sin embargo, como apreciará un experto en la materia,
- 15 algunas disoluciones de recuperación bloquean la peroxidasa y por lo tanto no se llevaría a cabo el tratamiento con peroxidasa. Además, en algunos casos reconocidos por el experto en la materia, puede ser útil llevar a cabo una etapa de bloqueo de proteínas para minimizar la unión no específica de los anticuerpos a la muestra. Si se usa la etapa de bloqueo de proteínas, típicamente se lleva a cabo durante aproximadamente 10 minutos.
- 20 El cóctel de anticuerpos primarios se aplica a la muestra que se va a ensayar, típicamente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 min, después de cuyo tiempo se aplica un cóctel de anticuerpos secundarios-polímero de HRP-ALP durante de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 min. Para visualizar los complejos de anticuerpo-antígeno se aplica un primer cromógeno, p. ej., DAB durante
- 25 aproximadamente 5 min seguido de la aplicación de un segundo cromógeno, p. ej., Fast Red durante aproximadamente 10 min. Después, la muestra se desnaturaliza usando la disolución de desnaturalización adecuada durante aproximadamente 2 a 10 min (en algunas realizaciones, se puede usar una dilución escalonada de la disolución de desnaturalización durante aproximadamente 5 min). Se aplica un tercer anticuerpo primario a la muestra durante aproximadamente 30 min y después se aplica un anticuerpo de
- 30 cabra dirigido contra Ig de ratón o conejo-polímero de HRP o AP, durante aproximadamente 20 a 30 min. Se aplica un cromógeno, que es púrpura o azul, durante 5 min. En realizaciones preferidas de la presente invención, después se realiza la contratinción de la muestra, p. ej., con hematoxilina progresiva, durante aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 min para facilitar la mejor visualización del antígeno teñido. La muestra, si está en un portaobjetos después se puede cubrir con un cubreobjetos para conservar la
- 35 muestra teñida. Por lo tanto, este procedimiento se puede llevar a cabo en aproximadamente 2 a 2 ½ h, requiriendo solo aproximadamente de 9 a 11 etapas y de 9 a 11 etapas de lavado.

- De una forma similar a la descrita antes, se pueden usar inmunoanálisis que usan 4, 5, 6, etc. anticuerpos para visualizar diferentes antígenos en una muestra dada. Cuando se llevan a cabo los protocolos anteriores
- 40 usando un sistema de detección de fosfatasa alcalina se prefiere usar un tampón de lavado de TBS en lugar de tampones de lavado basados en PBS. De una forma similar, cuando se llevan a cabo los inmunoanálisis de acuerdo con la invención, se tiene que tener en cuenta el pretratamiento de la muestra. En realizaciones preferidas, los dos o más anticuerpos requerirían el mismo pretratamiento de la muestra, por ejemplo, pretratamientos tales como nada, digestión y recuperación de antígeno (p. ej., usando disoluciones de pH
- 45 bajo y alto). En algunas realizaciones, se puede usar el procedimiento sin pretratamiento para la primera composición de anticuerpos (p. ej., que contiene dos o más anticuerpos) y después se puede usar un procedimiento de recuperación de antígeno para la etapa de desnaturalización y después la composición del tercer anticuerpo o segundo anticuerpo. En algunas realizaciones, se puede usar la recuperación del antígeno antes o después de la digestión enzimática. Si se usa la digestión después de la recuperación del
- 50 antígeno, preferiblemente se usa pepsina o tripsina durante 30 segundos; o se puede usar una tripsina muy diluida durante 5 min a temperatura ambiente en dispositivos de tinción automáticos.

- En realizaciones preferidas adicionales de la invención, se usa una etapa de desnaturalización cuando se usan dos anticuerpos secuenciales y sistemas de detección. La etapa de desnaturalización destruye (elución)
- 55 las etapas de IHC del bloqueo de proteínas, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y marcador desde la primera secuencia de anticuerpo. Esta etapa de desnaturalización facilita la tinción limpia, es decir, previene/minimiza la reacción cruzada de la segunda secuencia de anticuerpo con la primera secuencia de anticuerpo. Dependiendo del pretratamiento que se use (nada, digestión o recuperación de antígeno), el tiempo y/o la concentración de la disolución de desnaturalización deben variar. En el pasado, este

procedimiento no se comprendía totalmente. Esto causaba tinción inconsistente y tinción imprecisa. Típicamente en el pasado, los laboratorios usaban HCl del 0,5 al 1 % en agua o alcohol al 70 % durante 5 min.

- 5 También se proporciona una disolución de desnaturalización preferida que comprende 1 parte de disolución A a 3 partes de disolución B. La disolución A contiene ácido clorhídrico de 1,1 a 1,3 %, conservante (Proclin™ 300) de 0,020 a 0,030 % y el resto agua. La disolución B contiene monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) de 0,1 a 0,3 %, conservante (Proclin™ 20) aproximadamente de 0,2 a 0,3 % y el resto agua. En una realización preferida, la disolución A contiene ácido clorhídrico al 1,2 %, conservante (Proclin™ 300) al 0,025 % y el resto agua, y la disolución B contiene monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) al 0,2 %, conservante (Proclin™ 300) aproximadamente al 0,25 % y el resto agua. Un reactivo de bloqueo preferido contiene 10X PBS al 10 %, conservante (Proclin 950) al 0,25 %, disolución al 50 % de monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween® 20) al 0,01 %, 50 g de caseína purificada, Prionex (gelatina de tipo A purificada) al 0,25 % y el resto agua. En una realización de la tinción de anticuerpos con al menos dos anticuerpos, el procedimiento implica poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo, y posteriormente anticuerpo secundario y reactivos de detección, p. ej., cromógenos, añadir la disolución de desnaturalización a la muestra, y después poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo con el posterior anticuerpo secundario y reactivos de detección. Entonces se pueden visualizar los patrones de tinción. Este procedimiento se puede repetir para visualizar 3, 4, 5, etc. anticuerpos totales en una sola muestra.

Aplicaciones automáticas

- Las formulaciones únicas y la facilidad de uso del cóctel de anticuerpos y/o los reactivos de detección y/u otros reactivos útiles para el inmunoanálisis, facilitan llevar a cabo el inmunoanálisis en uno o más dispositivos automáticos diseñados para detectar patrones de tinción de anticuerpos en una muestra. En particular, las composiciones de la presente invención permiten la automatización de detecciones dobles, triples, cuádruples, etc., de anticuerpos que eran difíciles y en algunos casos incluso imposibles con reactivos previamente conocidos.

- 30 En otra realización de la invención, el procedimiento descrito en el presente documento se puede aplicar en el inmunoanálisis de micromatrices de tejidos. Las micromatrices de tejidos son conocidas en la materia, y típicamente contienen de 50 a 500 tejidos en un solo portaobjetos. La ventaja de la presente invención en el inmunoanálisis de matrices de tejidos, es que el análisis se puede llevar a cabo en numerosos portaobjetos, p. ej., de 36 a 60 portaobjetos, en un aparato de tinción automático y llevar a cabo tinciones dobles, triples, cuádruples etc. en cada portaobjetos. Otra ventaja de poder llevar a cabo dichas tinciones múltiples en un portaobjetos dado es el coste, puesto que los portaobjetos de micromatrices de tejidos típicamente cuestan hasta 500 dólares.

- 40 En una realización, se puede llevar a cabo un protocolo de recuperación de antígeno a baja temperatura. El protocolo de recuperación de antígeno a baja temperatura implica preparar la muestra de tejido para el sustrato, p. ej., portaobjetos de vidrio antes de tinción. El procedimiento a baja temperatura producía morfología superior así como ayuda a asegurar los tejidos valiosos al sustrato. Por lo tanto, en esta realización, la muestra se trata antes de la tinción, a una temperatura de 65 °C a 80 °C y preferiblemente a 45 aproximadamente 75 °C. Típicamente, la muestra se trata durante la noche. En una realización particularmente preferida, la muestra se trata con un dispositivo de acuerdo con la descripción en la patente de EE.UU. n° 6.580.056.

- Los ejemplos de dichos dispositivos automáticos útiles de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a BioGenex 16000™ (Biogenex), Dako Autostainer (DakoCytomation) Nemesis™ (BIO CARE), y los de Ventana Medical Systems (dispositivo de tinción capilar basada en huecos, NexES y Benchmark).

- Por ejemplo, un procedimiento de tinción doble automático que usa uno de los anteriores, p. ej., el dispositivo de autotinción Dako, es como sigue. La muestra se puede bloquear opcionalmente en peróxido de hidrógeno durante 5 min, la muestra se trata en un Biocare Decloaker para HIER, el bloqueo base se puede lograr añadiendo Background Sniper (Biocare Medical) durante 7 min y después purgado. Se añade un cóctel de anticuerpos primarios de tinción doble a la muestra durante 30 a 45 min y después se aclara; se añade una composición de anticuerpos secundarios durante 25 min y después se aclara. Cromógeno DAB durante 5 min, aclarado y cromógeno Fast Red durante 20 min. Después la muestra está lista para la visualización y

análisis.

Kits

- 5 La presente memoria descriptiva también proporciona kits para el inmunoanálisis de una muestra que contiene el cóctel de anticuerpos y/o reactivos de detección y/u otros reactivos útiles para el inmunoensayo. En una realización preferida, el kit también viene con instrucciones para usar los reactivos del inmunoanálisis.

Ejemplos

10

Ejemplo 1

Un protocolo de tinción doble para el cóctel PIN-4 (P504S + HMW CK + p63)

15

1. Después de montar la muestra en el portaobjetos, se desparafina en agua

2. Los antígenos se recuperan con calor en Reveal o BORG DECLOAKER (Biocare Medical) usando un vaporizador durante 60 min, o alternativamente en una cámara Digital Decloaking Chamber (Biocare Medical) durante 30 s a 5 min.

20

3. Se aplica un bloqueo de proteínas en 4 gotas (aproximadamente 150 ul) usando BACKGROUND SNIPER (Biocare Medical) a la muestra durante 5-10 min. La muestra se lava bien.

4. El cóctel de anticuerpos primarios PIN-4 se aplica durante 30 a 60 min.

25

5. La muestra se lava en dos cambios de 1X TBS Immunocare (Biocare Medical) durante 2 min cada vez.

6. Se añaden 4 gotas de cóctel de anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de ratón (ALP) y de cabra dirigido contra Ig de conejo (HRP). Se incuba durante 30 min. Drenar los portaobjetos.

30

7. Lavar con dos cambios de 1X tampón de lavado de TBS Immunocare (Biocare Medical) durante 2 min cada vez. Drenar los portaobjetos.

8. Preparar el sustrato cromógeno DAB añadiendo 1 gota del cromógeno DAB a 1,0 ml de tampón de sustrato y mezclar bien. Aplicar 4 gotas del sustrato cromógeno DAB a la muestra y revelar durante 2-3 min a temperatura ambiente (se puede usar DAB Sparkle (Biocare Medical) para potenciar).

35

9. La muestra se lava en agua desionizada. Se comprueba la muestra con el microscopio. Si está poco revelada se puede aplicar de nuevo sustrato cromógeno DAB durante otros 2 min. Aclarar en agua desionizada.

40

10. Lavar con dos cambios de 1X tampón de lavado de TBS Immunocare (Biocare Medical) durante 2 min cada vez. Drenar los portaobjetos.

11. Aplicar 4 gotas de sustrato cromógeno Vulcan Fast Red™ (Biocare Medical) durante 5-10 min. Lavar en agua desionizada. Poner la muestra en el microscopio y comprobar la tinción débil. Solo si la tinción es demasiado débil, aplicar Vulcan Fast Red™ (Biocare Medical) durante otros 5 min y lavar de nuevo en agua desionizada.

45

12. Añadir 4 gotas de hematoxilina Cat (Biocare Medical) durante 30-60 segundos. Lavar en agua corriente.

50

13. Azular los núcleos en 1X tampón de lavado de PBS durante 1 min. Drenar los portaobjetos

14. Lavar en agua corriente y aclarar en agua desionizada.

55

15. Deshidratar con 3 cambios de alcohol al 100 % y limpiar con 3 cambios de xileno.

16. Montar y cubrir con el cubreobjetos.

Ejemplo 2

CK5 +p63 + CK8

- 5 Aplicación de CK5 + P63 con un anticuerpo secundario-polímero HRP/DAB
1. Desparafinar en agua.
 2. Recuperar con calor en cámara Decloaking Chamber (Biocare Medical) durante 2-5 min.
 - 10 3. Volver con un aclarado en 1X tampón de lavado de TBS IMMUNOCARE (Biocare Medical)
 4. Bloquear proteína durante 10 min con BACKGROUNDSNIPEP (Biocare Medical). Drenar bloqueador de proteína.
 - 15 5. Diluir CK5 1:200 y p63 1:500 en Van Gogh Yellow (Biocare Medical). Incubar durante 30 min.
 6. Lavar con dos cambios de 1 X tampón de lavado de TBS durante 2 min cada vez. Drenar los portaobjetos.
 - 20 7. Aplicar 4 gotas de anticuerpo cabra dirigido contra Ig de ratón-HRP (polímero) e incubar durante 25 min. Lavar con dos cambios de 1 x tampón de lavado de TBS durante 2 min cada vez. Drenar los portaobjetos
 8. Preparar el sustrato cromógeno DAB Cardassain (Biocare Medical): añadir 1 gota de disoluciones A y B de cromógeno DAB a 1,0 ml de tampón de sustrato. Mezclar bien. Aplicar 4 gotas del sustrato cromógeno DAB.
 - 25 Revelar durante 2-5 minutos a temperatura ambiente.
 9. Lavar en agua desionizada. Comprobar la muestra al microscopio (procedimiento manual solo). Si está poco revelada se puede volver a aplicar sustrato cromógeno DAB durante otros 2-4 min. Aclarar en agua desionizada.
 - 30 10. Sumergir la sección en HCl al 0,5 % en alcohol al 70 % de 2 a 5 min. Aclarar bien con tampón de lavado de TBS.
- Aplicar CK8/18 con un polímero-segundo anticuerpos con un kit de ALP/Fast Red
- 35 1. Diluir CK 8/18 1:100 en Van Gogh Yellow (Biocare Medical). Incubar durante 30 min.
2. Lavar con dos cambios de 1X TBS Immunocare (Biocare Medical) durante 2 min cada vez.
- 40 3. Aplicar 4 gotas de anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de ratón-ALP (polímero). Incubar durante 20 min.
4. Lavar con dos cambios de 1X tampón de lavado de TBS Immunocare (Biocare Medical) durante 2 min cada vez. Drenar los portaobjetos.
- 45 5. Aplicar 4 gotas de sustrato cromógeno Vulcan Fast Red (Biocare Medical) durante 10 min. Aclarar en agua desionizada. Poner la muestra en el microscopio y comprobar la tinción débil (procedimiento manual solo). Si la tinción es demasiado débil aplicar sustrato Vulcan Fast Red durante otros 5 min y aclarar otra vez en agua desionizada.
- 50 6. Añadir 4 gotas de hematoxilina CAT durante 30-60 segundos. Lavar en agua corriente.
7. Azular los núcleos en 1 X tampón de lavado de PBS durante 1 min. Drenar los portaobjetos.
8. Lavar en agua corriente y aclarar en agua desionizada.
- 55 9. Deshidratar con 3 cambios de alcohol al 100 % y limpiar con 3 cambios de xileno.
10. Montar y cubrir con cubreobjetos.

Ejemplo 3

Preparación tisular

- 5 Todos los tejidos se embebieron en parafina y fijaron en formalina y se hicieron secciones de 4 micrómetros. Las secciones se secaron a 37 °C durante 30 min y después se secaron a 60 °C durante 30 min. Las secciones se sacaron inmediatamente del horno y se desparafinaron en Slide Brite, (BIOCARE) y después se hidrataron mediante una serie escalonada de alcohol. Todos los tejidos se pusieron en una solución en masa de peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 min para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Los siguientes tejidos se usaron para tinciones dobles y triples: amígdala, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de mama, dermatofibroma, mesotelioma y melanoma.

Reactivos y equipamiento

- 15 La recuperación de antígeno se llevó a cabo usando Reveal (RV) (pH 6,0) y BORG Decloaker (BD) (pH, 9,5) en una cámara Decloaking Chamber (olla a presión) durante 30 segundos a 125°C y 1,4 kg/cm² (20 p.s.i.) (BIOCARE Medical). Para los tejidos de micromatrices, la recuperación de antígeno se llevó a cabo durante la noche a 75°C y se puso en RV o Nuclear Decloaker (pH 9,5) (BIOCARE Medical). Los cócteles de anticuerpos se listan en la tabla 1. Todos los anticuerpos se diluyeron para la valoración óptima, seguido de kits y reactivos de detección poliméricos sin biotina (tabla 2). Se usó tampón de lavado de TBS en los siguientes dispositivos de tinción automáticos: AutoStainer (Dako), i6000 BioGenex, Nemesis (BIOCARE Medical).

Tabla 1

Cóctel de anticuerpos	Hospedante	Clon
ApoptóticoCK18	Ratón	BC/M30
Ki-67	Conejo	SP91
CD34	Ratón	Biocare
Factor XIIIa	Conejo	Policlonal
L26	Ratón	L26
CD3	Conejo	Policlonal
Kappa	Ratón	KDB-1
Lambda	Conejo	Policlonal
CK5	Ratón	XM26
P63	Ratón	BC4A4
CK8/18	Ratón	5D3
CK5	Ratón	XM26
CK17	Ratón	Ks 17 E3
CK8/18	Ratón	5D3
HMW CK	Ratón	DE-SQ
p63	Ratón	BC4A4
P504S	Conejo	P504S
MART-1	Ratón	M2-7C10 + MZ-9E3
Tyrosinase	Ratón	T311
S100	Conejo	Policlonal
Ki-67	Ratón	DVB-1
Caspasa-3	Conejo	Policlonal
CK5/6	Ratón	CK5/6.007
Calretinina	Conejo	SP19
CD10	Ratón	56C6 (HSA)
PSA	Conejo	Policlonal
HSA	Ratón	OCH1E5
Los cócteles de anticuerpos se obtuvieron de Biocare Medical		

25

Tabla 2

Nombre	Kit o reactivos secundarios
Kit de detección de tinción doble nº 1	de cabra contra Ig de ratón - fosfatasa alcalina (AP) de cabra contra Ig de conejo - peroxidasa de rábano picante (HRP)
Kit de detección de tinción doble nº 2	de cabra contra Ig de ratón HRP de cabra contra Ig de conejo AP
MACH 2™ Mouse-HRP	de cabra contra Ig de ratón (HRP)
MACH 2™ Mouse-AP	de cabra contra Ig de ratón (AP)
MACH 2™ Rabbit-HRP	de cabra contra Ig de conejo (HRP)
MACH 2™ Rabbit AP	de cabra contra Ig de conejo (AP)
Los kits de tinción doble, reactivos y cromógenos se obtuvieron de Biocare Medical	

Tabla 3

Cóctel de anticuerpos	Pretratamiento	Detección	Cromógenos
Apoptótico/CK18 + Ki-67	BORG Decloaker™	DS Kit nº 1	DAB y Fast Red
CD34 + Factor XIIIa	Tripsina	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
L26 + CD3	Reveal	DS Kit nº 1	DAB y Fast Red
Kappa + Lambda	Reveal	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
CK5 + CK17 + CK8/18	Reveal	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
CK5 + p63 + CK8/18	Reveal	DS kit nº 2 + MACH2-HRP	DAB y Fast Red
HMW CK + p63 + P504S	BORG Decloaker	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
MART-1 + Tirosinasa + S100	Reveal	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
Ki-67 + Caspasa-3	BORG Decloaker	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
CK5/6 + Calretinina	Reveal	DS Kit nº 2	DAB y Fast Red
CD10+PSA+HSA	Reveal	DS Kit nº 2 + M2 Mouse -HRP	B. Purple y Fast Red DAB
LCA + S100 + CK8/18	Reveal	DS Kit nº 2 + M2 Rabbit -HRP	DAB y Fast Red Bajoran Purple
* Los kits de tinción doble, reactivos, anticuerpos y cromógenos se obtuvieron de Biocare Medical			

5

Todos los reactivos anteriores se ensayaron en tejidos montados en portaobjetos y presentaron buenos patrones de tinción doble y triple.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de dos o más antígenos en una muestra, que comprende:
 - 5 (i) poner en contacto simultáneamente una muestra, que previamente se ha puesto en contacto simultáneamente con un cóctel de anticuerpos primarios que comprende al menos un primer anticuerpo primario y al menos un segundo anticuerpo primario en una disolución acuosa tamponada para el cóctel de anticuerpos primarios, con una composición que comprende al menos un primer anticuerpo secundario y al menos un segundo anticuerpo secundario para formar al menos dos complejos de antígeno-anticuerpo en la
10 muestra, en el que el al menos un primer anticuerpo secundario se acopla con un resto de poli(fosfatasa alcalina) (poli-ALP) y el al menos un segundo anticuerpo secundario se acopla con un resto de poli(peroxidasa de rábano picante) (poli-HRP), y en el que la composición comprende un tampón para el primer y segundo anticuerpos secundarios; y
 - 15 (ii) detectar los al menos dos complejos de antígeno-anticuerpo en la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
el al menos un primer anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de ratón y el al
20 menos un segundo anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de conejo; o
el al menos un primer anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de conejo y el al menos un segundo anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de ratón.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección comprende aplicar DAB y Fast Red a la muestra.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende detectar al menos 3 antígenos en una muestra, en el que el cóctel de anticuerpos primarios comprende además al menos un tercer anticuerpo
30 primario; y el procedimiento comprende además poner en contacto simultáneamente la muestra con al menos un tercer anticuerpo secundario para formar al menos un tercer complejo de antígeno-anticuerpo en la muestra y detectar el al menos un tercer complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra está contenida en un dispositivo
35 de tinción automático y en el que el contacto se produce en un dispositivo de tinción automático.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los anticuerpos en el cóctel de anticuerpos primarios es un anticuerpo monoclonal de conejo.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución acuosa tamponada para el cóctel de anticuerpos primarios comprende 2-metil-4-isotiazolin-3-ona como conservante.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el al menos primer anticuerpo secundario es un anticuerpo conjugado con una pluralidad de restos de fosfatasa alcalina y el al menos segundo anticuerpo
45 secundario es un anticuerpo conjugado con una pluralidad de restos de peroxidasa de rábano picante.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende, después de (i) y antes de (ii), aplicar al menos dos cromógenos diferentes que dan como resultado al menos dos colores diferentes.
- 50 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer anticuerpo primario es un anticuerpo de ratón y el segundo anticuerpo primario es un anticuerpo de conejo, y en el que el primer anticuerpo secundario está acoplado a poli-ALP y el segundo anticuerpo secundario está acoplado a poli-HRP.
11. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que al menos uno de los anticuerpos primarios es
55 un anticuerpo de ratón y uno de los anticuerpos primarios es un anticuerpo de conejo, y en el que los anticuerpos secundarios que se unen a los anticuerpos primarios de ratón están acoplados a poli-ALP y el anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario de conejo está acoplado a poli-HRP, o los anticuerpos secundarios que se unen a los anticuerpos primarios de ratón están acoplados a poli-HRP y el anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario de conejo está acoplado a poli-ALP.