

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 123**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09791784 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2334827**

54 Título: **Método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra**

30 Prioridad:

**22.08.2008 US 189752 P**

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

**17.06.2015**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**GNIEWEK, RICHARD;  
FARRELL, MICHAEL;  
NITTA, HIROAKI;  
LEHRKAMP, MEGAN;  
KOSMEDER, JEROME;  
BIENIARZ, CHRISTOPHER;  
KELLY, BRIAN, DANIEL;  
GROGAN, THOMAS;  
GAIRE, FABIEN, DR. y  
PADILLA, MARY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 538 123 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

Método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra

**Campo**

5 [002] Esta invención se refiere a la inmunohistoquímica (IHC) y a la hibridación *in situ* (ISH), y, específicamente, a realizaciones de un método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra.

**Antecedentes**

10 [003] La inmunohistoquímica (IHC) utiliza agentes de unión específica, como anticuerpos, para la detección de un antígeno de interés que puede encontrarse presente en una muestra de tejido. La IHC se utiliza ampliamente en aplicaciones clínicas y de diagnóstico, como el diagnóstico de estados o condiciones patológicas particulares. Por ejemplo, algunos tipos particulares de cáncer pueden diagnosticarse en base a la presencia de una molécula marcadora particular en una muestra obtenida de un sujeto. La IHC también se utiliza ampliamente en la investigación básica para comprender la distribución y localización de biomarcadores en diferentes tejidos.

15 [004] Las muestras biológicas también pueden examinarse mediante técnicas de hibridación *in situ* (ISH), como la hibridación *in situ* (SISH) con plata, la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), denominadas colectivamente ISH. La ISH se diferencia de la IHC, en que la ISH detecta ácidos nucleicos en secciones de tejidos mientras que la IHC detecta proteínas.

20 [005] A medida que los métodos de IHC e ISH van adquiriendo cada vez más importancia en el terreno clínico y de la investigación, también lo va haciendo la capacidad de detectar múltiples dianas a la vez, como la doble detección de una secuencia de ácido nucleico y una proteína o múltiples proteínas o ácidos nucleicos en una sola muestra. Por ejemplo, un sistema de doble detección de genes/proteínas permitiría la detección de genes y proteínas en el mismo portaobjetos en un solo proceso automatizado en lugar de en dos procesos separados. No obstante, los sistemas de detección actuales no prevén convenientemente la detección de múltiples dianas, tal como la doble detección de genes/proteínas, en el mismo portaobjetos dado que los métodos de IHC e ISH normalmente son incompatibles entre sí.

**Resumen**

En la Patente WO 94/02830 A1 se presenta un proceso para el fenotipado y genotipado de una célula que incluye un paso que consiste en poner la célula en contacto con una sonda de ADN marcada.

30 En la Patente WO 98/02577 A1 se presenta un método para la detección conjunta de genes introducidos y sus productos. En la Patente WO 00/20641 A1 se presentan métodos para el análisis de una muestra de tejido y kits para su uso en dichos métodos. En la Patente WO 2008/063378 A2 se presentan haptenos, conjugados de haptenos, composiciones y un método para su preparación y uso. Ambretti et. al. (2007) BR.J. Dermatol. 156, 38-44 presenta una evaluación de la presencia del virus del papiloma humano de tipo mucoso en melanomas malignos mediante la hibridación *in situ* fluorescente y la inmunohistoquímica quimioluminiscente combinadas.

35 [006] La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, establece métodos y kits para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra. Otras disposiciones de la presente invención abordan la tinción de fondo no específica que tiene lugar al realizar un método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido. Así, la presente invención se refiere particularmente a cualquier proceso y/o composición capaz de facilitar la doble detección al tiempo que reduce la tinción de fondo no específica. Esto se consigue a base de reducir o prevenir sustancialmente la unión no específica de un compuesto aromático deficiente en electrones (DNP) a un complejo cromógeno rico en electrones durante la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra. Los métodos aquí descritos pueden realizarse de manera automatizada o manual.

45 [007] En una realización de la invención, un método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido consiste en poner en contacto la muestra de tejido con una primera fracción de unión específica que se une específicamente a una primera molécula diana. En un ejemplo, la primera fracción de unión específica es un anticuerpo primario y la primera molécula diana es una proteína. Por ejemplo, el anticuerpo primario puede ser un anticuerpo que detecta una proteína asociada al cáncer, tal como un anticuerpo primario HER2/neu (o proteína HER2), c-Myc, n-Myc, Ab1, proteína EGFR, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53 o c-Met.

50 [008] La realización particular de la invención para la detección cromogénica también consiste en detectar la primera molécula diana en la muestra de tejido a base de depositar un producto cromógeno aromático, insoluble, rico en electrones, en o cerca del punto en el que la primera fracción de unión específica se une a la primera molécula diana. En un ejemplo, el compuesto aromático insoluble, rico en electrones es un colorante azoico. En algunos ejemplos, la deposición de un producto cromógeno consiste en hacer reaccionar un

sustrato con un catalizador para formar el compuesto aromático insoluble, rico en electrones. Por ejemplo, el catalizador puede ser una enzima, como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano. Además, el sustrato es diaminobenzidina (DAB).

5 [009] Algunas realizaciones presentadas de un método de la invención para la detección cromogénica de dos o más moléculas en una sola muestra de tejido también pueden consistir en poner en contacto la muestra de tejido con una segunda fracción de unión específica marcada con DNP que se une específicamente a una segunda molécula diana.

10 [010] Realizaciones de la invención incluyen el tratamiento de la muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, antes de poner o al mismo tiempo que la muestra de tejido se pone en contacto con una fracción de unión específica marcada con DNP. En un ejemplo de la invención, el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, se realiza antes de poner en contacto la muestra de tejido con la segunda fracción de unión específica marcada con DNP. En otro ejemplo de la invención, el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, se realiza de forma concomitante con la puesta en contacto de la segunda fracción de unión específica marcada con DNP con la muestra de tejido. En la invención, el compuesto aromático soluble, rico en electrones, que contiene naftol fosfato.

20 [011] Realizaciones de la invención para la detección cromogénica de dos o más moléculas también incluyen la detección de la segunda molécula diana a base de depositar un segundo producto cromógeno insoluble distinguible (por ejemplo, distinguible visualmente) del compuesto aromático insoluble, rico en electrones, depositado para detectar la primera molécula diana. El tratamiento de la muestra de tejido con una solución conteniendo el compuesto aromático soluble, rico en electrones que incluye naftol fosfato reduce la tinción de fondo debido a la unión no específica de la fracción de unión específica marcada con DNP con el compuesto insoluble, rico en electrones, depositado cerca de la primera molécula diana.

25 [012] Por ejemplo, en la invención, la segunda fracción de unión específica, marcada con DNP puede ser una sonda de ácido nucleico marcada con DNP, tal como una sonda de ADN marcada con DNP. En algunos ejemplos, la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP es suficiente para prevenir o reducir la tinción de fondo que ocurre cuando la sonda de ácido nucleico marcada con DNP se une de manera no específica a un producto cromógeno asociado a una primera molécula diana. En algunos ejemplos, la concentración de la sonda marcada con DNP es superior a 1 y, normalmente, de 5 µg/ml como mínimo. Por ejemplo, la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP varía de 10 µg/ml a 15 µg/ml.

35 [013] En un ejemplo de la invención, la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la primera molécula diana. La primera molécula diana y la segunda molécula diana pueden estar asociadas a un trastorno o enfermedad, incluido el cáncer, tal como una proteína HER2, proteína c-Myc, proteína n-Mye, proteína Ab1, proteína EGFR, proteína TOP2A, proteína Bc12, proteína Bc16, proteína Rb1, proteína p53 o proteína c-Met o un ácido nucleico que codifica una de estas proteínas. En un ejemplo, la detección de la primera molécula diana incluye la realización de la inmunohistoquímica (IHC) y la detección de la segunda molécula diana incluye la realización de la hibridación *in situ* (ISH). La realización de la IHC puede consistir en detectar la primera molécula diana mediante un sistema mediado por enzimas, como un sistema de detección complejo cromógeno de fosfatasa alcalina-color rojo o un sistema de detección complejo cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB. La realización de la ISH puede consistir en detectar la segunda molécula diana con el mismo sistema mediado por enzimas o uno diferente, como un sistema de detección ISH de tinción de peroxidasa de rábano-plata o un sistema de detección de fosfatasa alcalina color rojo-plata. El método puede ser automatizado o manual.

45 [014] En realizaciones particulares de la invención, se presenta un método de detección de ácido nucleico/proteínas automatizado que permite la doble detección de ácidos nucleicos/proteínas en la misma muestra de tejido mediante un solo proceso automatizado. Una realización presentada del método consiste en dispensar automáticamente un anticuerpo primario sobre una muestra de tejido bajo condiciones suficientes como para que el anticuerpo primario se una específicamente a una primera molécula diana dentro de la muestra de tejido. Esta realización también consiste en detectar la primera molécula diana en la muestra de tejido con el anticuerpo primario por IHC. Esta realización presentada también consiste en dispensar automáticamente una sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido bajo condiciones suficientes como para que dicha sonda se una específicamente a una segunda molécula diana. En algunos ejemplos, la sonda de ácido nucleico marcada con DNP comprende un compuesto aromático deficiente en electrones. El compuesto aromático deficiente en electrones puede tener una fórmula como la descrita anteriormente. Esta realización también puede consistir en tratar la muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático rico en electrones que incluye naftol fosfato antes de o de forma concomitante con la dispensación automática de la segunda sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido y detectar la segunda molécula diana por ISH. La concentración de naftol puede variar pero normalmente oscila de 1 a 60 miligramos por mililitro, como entre 25 miligramos por mililitro y 50

miligramos por mililitro, como entre 10 miligramos por mililitro y 40 miligramos por mililitro. En algunos ejemplos particulares, la concentración de naftol es de unos 50 miligramos por mililitro o unos 25 miligramos por mililitro.

[015] En una realización de la invención, la dispensación automática de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido ocurre tras el tratamiento de la muestra de tejido con un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato. En otra realización, la dispensación automática de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido ocurre de forma simultánea con el tratamiento de la muestra de tejido con un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato, en donde el compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato y la sonda nucleica y marcada se dispensan en la muestra de tejido bien de forma sustancialmente simultánea o bien en la misma solución. En algunos ejemplos, la sonda de ácido nucleico marcada con DNP es una sonda de ADN marcada con DNP.

[016] En algunas realizaciones de la invención, la IHC se realiza antes que la ISH. En otras realizaciones, la ISH se realiza antes que la IHC. En algunos ejemplos, la ISH incluye la detección del ácido nucleico diana mediante un sistema de detección con tinción de peroxidasa de rábano-plata o un sistema de detección con tinción Fast Red/fosfatasa alcalina/naftol fosfato. En algunos ejemplos, la detección IHC consiste en detectar la proteína diana a través de un sistema de detección de cromógeno de fosfatasa Fast Red/ fosfatasa alcalina/naftol fosfato o un sistema de detección de cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB.

[017] También se proporcionan kits para llevar a cabo las realizaciones presentadas del método. Las realizaciones del método y los kits aquí presentados pueden ser utilizados para detectar dianas en muestras de mamíferos que se sospecha padecen un trastorno o enfermedad, como un cáncer.

[018] En una realización particular de la invención, un método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido consiste en: poner en contacto la muestra de tejido con una primera fracción de unión específica que se une específicamente a una primera molécula diana; detectar la primera molécula diana en la muestra de tejido a base de depositar un producto cromógeno aromático, insoluble, rico en electrones haciendo reaccionar 3,3-Diaminobenzidina con un catalizador; poner en contacto la muestra de tejido con una segunda fracción de unión específica marcada con DNP que se une específicamente a una segunda molécula diana; tratar la muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, que contiene naftol fosfato antes de o al mismo tiempo que se pone en contacto la segunda fracción de unión específica marcada con DNP con la muestra de tejido; detectar la segunda molécula diana a base de depositar un segundo producto cromógeno insoluble, que es diferenciable del compuesto aromático insoluble, rico en electrones depositado para detectar la primera molécula diana, en donde el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo el compuesto aromático soluble, rico en electrones, y que incluye naftol fosfato reduce la tinción de fondo causada por la unión no específica de la fracción de unión específica marcada con DNP al compuesto insoluble rico en electrones depositado cerca de la primera molécula diana.

[021] En una realización de la revelación, en la que la concentración de naftol reduce la tinción de fondo causada por la unión no específica de la fracción de unión específica marcada con el hapteno al compuesto insoluble rico en electrones depositado cerca de la primera molécula diana y varía de 1 miligramo por mililitro a 30 miligramos por mililitro, de 1 miligramo por mililitro aproximadamente a 7 miligramos por mililitro aproximadamente, de 0,3 miligramos por mililitro aproximadamente a 1 miligramo por mililitro aproximadamente a 0,3 miligramos por mililitro aproximadamente a 1 miligramo por mililitro aproximadamente. Por ejemplo, en la invención, la segunda fracción de unión específica marcada con DNP es una sonda de ácido nucleico marcada con DNP, así como la sonda de ácido nucleico marcada con DNP es una sonda de ADN. En una realización, la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol es de 5 µg/ml como mínimo, tal como de 10 µg/ml a 15 µg/ml.

[023] En una realización de la invención, la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico, tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la primera molécula diana. Por ejemplo, la proteína es HER2/neu, c-Myc, n-Myc, Ab1, proteína EGFR, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53 o c-Met y la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico que codifica HER2, c-Myc, n-Myc, Ab1, EGFR, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53, c-Met.

[024] En una realización de la invención, la primera molécula diana y la segunda molécula son una primera proteína y una segunda proteína.

[025] En una realización de la invención, la primera molécula diana y la segunda molécula son una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico.

[026] En algunas realizaciones de la invención, el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, que contiene naftol fosfato consiste en tratar la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones conteniendo naftol fosfato antes de poner en contacto la segunda fracción de unión específica marcada con DNP con la muestra de tejido.

- 5 [027] En algunas realizaciones de la invención, el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, que contiene naftol fosfato consiste en tratar la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones que contiene naftol fosfato de manera concomitante con la puesta en contacto de la segunda fracción de unión específica marcada con DNP con la muestra de tejido.
- [028] En una realización de la invención, la primera fracción de unión específica es un anticuerpo primario, tal como un anticuerpo primario que se une a HER2, c-Myc, n-Myc, Ab1, proteína EGFR, péptidos C-Met, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53 o c-MET.
- 10 [029] En una realización de la invención, el compuesto aromático insoluble, rico en electrones, comprende un colorante azoico.
- [030] En una realización de la invención, la deposición cromogénica consiste en hacer reaccionar 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) con un catalizador para formar, de manera directa o indirecta, el compuesto aromático insoluble, rico en electrones. Por ejemplo, el catalizador es una enzima, como una fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.
- 15 [031] En una realización de la invención, la detección de la primera molécula diana consiste en realizar la inmunohistoquímica (IHC) y detectar la segunda molécula diana que comprende la realización de la hibridación in situ (ISH) en donde la realización de la IHC consiste en detectar la primera molécula diana a través de un sistema de detección cromógeno de fosfatasa alcalina-color rojo o un sistema de detección cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB y la realización de la ISH consiste en detectar la segunda molécula diana a través de un sistema de detección ISH de peroxidasa de rábano-plata o de un sistema de detección de fosfatasa alcalina color rojo-plata.
- 20 [032] En una realización de la invención, el método se realiza por automatización.
- [033] En una realización de la invención, se presenta un método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado que consiste en: dispensar automáticamente un anticuerpo primario sobre una muestra de tejido bajo condiciones suficientes como para que el anticuerpo primario se una específicamente a una primera molécula diana dentro de la muestra de tejido; detectar la primera molécula diana en la muestra de tejido con el anticuerpo primario mediante IHC; dispensar automáticamente una sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido bajo condiciones suficientes como para que la sonda de ácido nucleico marcada con DNP se una específicamente a una segunda molécula diana, en donde la sonda de ácido nucleico marcada con DNP contiene un compuesto aromático deficiente en electrones; tratar la muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático rico en electrones que contiene naftol fosfato antes de o de forma concomitante con la dispensación automática de la segunda sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido; y detectar la segunda molécula diana por hibridación in situ (ISH), permitiendo así la doble detección de ácido nucleico y proteínas en la misma muestra de tejido en un solo proceso automatizado.
- 30 [035] En una realización de la invención del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la concentración de naftol es efectiva para permitir la doble detección de ácido nucleico y proteínas en una sola muestra y varía de 1 miligramo por mililitro a 30 miligramos por mililitro, tal como de 1 miligramo por mililitro a 7 miligramos por mililitro o de 0,3 miligramos por mililitro aproximadamente a 1 miligramo por mililitro aproximadamente.
- 35 [036] En una realización, la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol es de 5 µg/ml como mínimo, como de 10 µg/ml a 15 µg/ml.
- [037] En una realización de la invención del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la dispensación automática de una sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido bajo condiciones suficientes como para que la sonda de ácido nucleico marcada con DNP se una específicamente a una segunda molécula diana ocurre tras el tratamiento de la muestra de tejido con un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato.
- 45 [038] En una realización de la invención del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la dispensación automática de una sonda de ácido nucleico marcada con DNP sobre la muestra de tejido bajo condiciones suficientes para que la sonda de ácido nucleico marcada con DNP se una específicamente a una segunda molécula diana ocurre de manera simultánea con el tratamiento de la muestra de tejido con un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato.
- 50 [039] En una realización del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la IHC se realiza antes que la ISH.
- [040] En una realización del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la ISH se realiza antes que la IHC.
- 55

[041] En una realización del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la ISH consiste en detectar el ácido nucleico diana por ISH con tinción de peroxidasa de rábano-plata o fosfatasa alcalina color rojo-plata.

5 [042] En una realización del método de detección de ácido nucleico y proteínas automatizado, la IHC consiste en detectar la proteína diana mediante un cromógeno de fosfatasa alcalina-color rojo o un cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB.

10 [043] En una realización, un kit para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido comprende una solución que contiene una primera fracción de unión específica que se une específicamente a una primera molécula diana, una solución conteniendo una segunda fracción de unión específica marcada con DNP que se une específicamente a una segunda molécula diana; una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, conteniendo naftol fosfato.

[044] En una realización del kit, la segunda fracción de unión específica marcada con DNP es una sonda de ácido nucleico marcada con DNP.

15 [045] En una realización del kit, la solución conteniendo el compuesto aromático soluble, rico en electrones conteniendo naftol fosfato contiene además la sonda de ácido nucleico marcada con DNP.

[046] Lo anterior y otras características de la invención quedarán más claras con la siguiente descripción detallada, en la que se comienza haciendo referencia a las figuras a color que la acompañan.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 [047] La FIG. 1 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo con una tinción HER2 débil (1+) tras la tinción IHC/ISH con los sistemas de detección IHC, Fast Red y SISH. Esta imagen ilustra una tinción de fondo de plata que sigue el patrón de la tinción IHC que hace que el cromógeno rojo tenga un tono diferente cuando la tinción moteada de plata se encuentra presente en el mismo lugar que el cromógeno rojo.

25 [048] La FIG. 2 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo con una tinción HER2 débil (1+) tras una tinción IHC/ISH con los sistemas de detección IHC, Fast Red y SISH. Esta imagen ilustra la ausencia de tinción de fondo de plata en una muestra de ensayo tras un tratamiento con naftol antes de la realización de la hibridación.

30 [049] La FIG. 3 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo con tinción HER2 fuerte (3+) tras la tinción IHC/ISH con los sistemas de detección IHC, Fast Red y SISH. Esta imagen ilustra la ausencia de tinción de fondo de plata en una muestra con tinción fuerte de la diana (3+).

35 [050] La FIG. 4 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo con tinción de la sonda HPV III tras la tinción con Fast Red en la IHC del anticuerpo HER2 y sistemas de detección SISH de la sonda HPV III (10 µg/ml). Esta imagen ilustra una tinción de fondo de plata que sigue el patrón del colorante IHC que hace que el cromógeno rojo tenga un tono diferente cuando la tinción moteada de plata se encuentra presente en el mismo lugar que el cromógeno precipitado rojo.

[051] La FIG. 5 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo tras la tinción IHC e ISH del anticuerpo HER2 con una sonda HPV marcada con FITC. Esta imagen ilustra la ausencia de tinción de fondo de plata en una muestra cuando la sonda está marcada con FITC en lugar de DNP.

40 [052] La FIG. 6 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (normal) tras la tinción en la IHC/ISH con un anticuerpo Ki67 (rojo) y una sonda TOP2A (plata). La solución de hibridación de la sonda TOP2A contenía naftol (300 µg/ml) lo que permitió que tanto la proteína Ki67 como las secuencias de ácidos nucleicos correlacionadas con la proteína Ki67 pudieran ser visualizadas con una tinción de fondo mínima.

45 [053] La FIG. 7 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (deleción) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo Ki67 (rojo) y una sonda TOP2A (plata).

[054] La FIG. 8 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (diana amplificada) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo Ki67 (rojo) y una sonda TOP2A (plata), en donde la solución de hibridación de la sonda TOP2A contenía naftol (300 µg/ml) lo que permitió que tanto la proteína como los genes pudieran ser visualizados con una tinción de fondo mínima.

50 [055] La FIG. 9 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (normal) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo TOP2A (rojo) y una sonda TOP2A (plata), en donde la solución de hibridación de la sonda TOP2A contenía naftol (300 µg/ml) lo que permitió que tanto la proteína TOP2A como las secuencias de ácidos nucleicos correlacionadas con la proteína TOP2A pudieran ser visualizadas con una tinción de fondo mínima.

[056] La FIG. 10 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (deleción) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo TOP2A (rojo) y una sonda TOP2A (plata).

[057] La FIG. 11 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (amplificada) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo TOP2A (rojo) y una sonda TOP2A (plata), en donde solución de hibridación de la sonda TOP2A contenía naftol (300 µg/ml) lo que permitió que tanto la proteína TOP2A como las secuencias de ácidos nucleicos correlacionadas pudieran ser visualizadas con una tinción de fondo mínima.

[058] La FIG. 12 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (diana amplificada) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo EGFR (rojo) y una sonda EGFR (plata), en donde la solución de hibridación de la sonda EGFR contenía naftol (300 µg/ml) lo que permitió que tanto la proteína EGFR como las secuencias de ácidos nucleicos correlacionadas pudieran ser visualizadas con una tinción de fondo mínima.

[059] La FIG. 13 es un ejemplo de una vista microscópica (60x) de una muestra de ensayo (amplificada) tras la tinción IHC/ISH con un anticuerpo c-Met (rojo) y una sonda c-Met (plata), en donde la solución de hibridación de la sonda c-Met contenía naftol (300 µg/ml) lo que permitió que tanto la proteína c-Met como las secuencias de ácidos nucleicos correlacionadas pudieran ser visualizadas con una tinción de fondo mínima.

[060] La FIG. 14 es una serie de vistas microscópicas de muestras de ensayo que ilustran un bloqueo con naftol de los pigmentos antracóticos que se unen a sondas de ADN marcadas DNP por Nick translation. El panel de la izquierda ilustra una hibridación *in situ* a dos colores para las sondas de ADN y centroméricas del cromosoma 7 (CEN7) y EGFR. El aspecto mejorado de los pigmentos antracóticos se ve a modo de aglomeraciones de color azul oscuro (panel izquierdo). Cuando la sonda marcada con DNP por Nick translation se omitió del ensayo (panel central), los pigmentos antracóticos se visualizaron a modo de aglomeraciones de color negro (el aspecto natural de los pigmentos antracóticos). Cuando en el paso de hibridación con las sondas EGFR marcadas DNP por Nick translation se añadió naftol (panel derecho), los pigmentos antracóticos se visualizaron a modo de agrupaciones negras.

[061] La FIG. 15 muestra una serie de vistas microscópicas de muestras de ensayo (sin amplificar, fila superior; amplificadas, fila inferior) tratadas con (columna izquierda) o sin (columna derecha) naftol (25 mg/ml) en el tampón de hibridación. Las imágenes ilustran que la interacción química entre DAB y DNP y, por lo tanto, la tinción de fondo generada por la detección SISH, queda eliminada con el tratamiento con naftol.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[062] La presente invención se define en las reivindicaciones. Algunas enfermedades, como el cáncer, pueden diagnosticarse por distintos métodos. Un método es identificar la presencia de un biomarcador, tal como un biomarcador de cáncer, en tejidos o células, en donde el biomarcador está correlacionado, o se piensa que está correlacionado, con un tipo de cáncer particular. La inmunohistoquímica se utiliza muchas veces para identificar biomarcadores de proteínas asociados a un tipo de cáncer particular, mientras que muchas veces se utilizan técnicas de hibridación *in situ* para identificar secuencias de ácidos nucleicos asociadas a un tipo de cáncer particular.

[063] Los métodos de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* para la identificación de dianas están adquiriendo cada vez mayor importancia en aplicaciones de investigación y para los facultativos, por ejemplo, para fines de diagnóstico y/o pronóstico. Los métodos actuales normalmente permiten la identificación de una diana, ya sea una proteína o una secuencia de ácido nucleico, por muestra de tejido o de células. No obstante, resultaría ventajoso que los investigadores pudieran identificar dos o más dianas en una muestra de tejido, por ejemplo, identificar dos o más proteínas diferentes, dos o más proteínas y secuencias de ácidos nucleicos diferentes, o dos o más secuencias de ácidos nucleicos diferentes, ahorrando así tiempo, reactivos y valiosas muestras de tejidos o células. Tal multiplexión en la identificación de dianas permitiría a los facultativos diagnosticar enfermedades con mayor precisión y llegar a conclusiones de pronóstico con un mayor fundamento. Los métodos aquí descritos también resultan útiles en diagnósticos complementarios, donde los resultados proporcionados por los métodos presentados se utilizan no solo para diagnósticos sino también para determinar el tratamiento óptimo y para el seguimiento de la progresión y el éxito de tal tratamiento en el ámbito clínico.

[064] La presente invención prevé la detección de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido. En particular, la presente invención proporciona métodos para la detección cromogénica de dos o más secuencias de ácidos nucleicos y una proteína, dos proteínas o dos secuencias de ácidos nucleicos en la misma muestra de tejido.

[065] Durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención se apreció que los experimentos de IHC en los que se utilizaba un sistema de detección complejo de Fast Red/naftol fosfato seguido de la ISH utilizando plata, el sistema de detección basado en HRP dio como resultado una cantidad significativa de tinción de fondo de plata que redujo la capacidad de visualizar la señal apropiada en el portaobjetos. En un experimento de control negativo en portaobjetos sin sondas de ácido nucleico marcadas DNP no se observó

tinción de fondo, lo que indica que la tinción de fondo no se debía a los reactivos de IHC ni al conjugado multímero-HRP. Estudios subsiguientes sugirieron que la tinción de fondo debida a Fast Red o al complejo Fast Red/naftol fosfato se debía en gran medida a las interacciones con la sonda de ADN marcada con DNP. No se observó tinción de fondo con el anticuerpo anti-DNP de conejo ni con los componentes del sistema conjugado anti-conejo de cabra-HRP.

[066] Para determinar qué componente del sistema era el responsable de la tinción de fondo, se sustituyeron varios componentes del sistema ISH eliminándolos del sistema. La presencia de la sonda de ADN marcada con DNP fue importante para que apareciera tinción de fondo. Si la tinción de fondo se debía al conjugado multímero-HRP se consideró que entonces la tinción de fondo estaría presente solo cuando se retirara la sonda de ADN marcada con DNP del sistema, sin embargo no fue así. Se obtuvieron más pruebas que demostraron que la tinción de fondo era causada por la sonda marcada con DNP cuando la tinción de fondo quedó eliminada con la adición de naftol fosfato AS-TR y la co-incubación con la sonda marcada con DNP en el portaobjetos. La presencia de naftol bloqueó la unión de la sonda marcada con DNP al complejo Fast Red/naftol fosfato, reduciendo así la tinción de fondo.

[067] La tinción de fondo de plata no siempre fue reproducible y variaba de un instrumento a otro y de un proceso a otro, lo que hizo que resultara difícil identificar si las causas estaban relacionadas con el instrumento o con el reactivo. Aunque la tinción de fondo de plata se observó con varias sondas marcadas DNP, la tinción de fondo no se observó con una sonda marcada FITC. Estos estudios sugirieron que la tinción de fondo de plata era el resultado de la interacción de la molécula de DNP con el cromógeno Fast Red. Esto quedó confirmado al realizar estudios en los que se incubó DNP libre con tejido tras el desarrollo del cromógeno Fast Red. Los resultados de este estudio resultaron en una tinción de fondo de plata comparable asociada al patrón del cromógeno Fast Red.

[068] Durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención, se realizaron experimentos con objeto de identificar los compuestos y métodos que podrían ser utilizados para inhibir o reducir la tinción de fondo no específica observada. Se realizaron una serie de estudios que indicaron una vez concluidos que la porción de DNP de las sondas marcadas DNP se unían principalmente al componente de naftol fosfato del complejo Fast Red/naftol fosfato. Aunque se desconoce la naturaleza exacta de la interacción del DNP con el componente naftol fosfato en el portaobjetos, se considera que la unión no específica observada se debe a la unión de un compuesto aromático deficiente en electrones (en este caso el hapteno DNP) a un complejo cromógeno rico en electrones (por ej., un complejo Fast Red/naftol fosfato), tal como por apilamiento *pi*.

[069] En base a estas observaciones, la presente invención se refiere en particular a un proceso y/o composición que permite la doble detección a base de reducir o prevenir sustancialmente la unión no específica de un compuesto aromático deficiente en electrones (tal como un hapteno) a un complejo cromógeno rico en electrones durante la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra. Determinadas realizaciones presentadas de la invención se refieren a procesos y/o composiciones que reducen o previenen sustancialmente el apilamiento *pi* de un compuesto aromático deficiente en electrones al complejo cromógeno rico en electrones. El método puede automatizarse o realizarse manualmente.

## 11. Abreviaturas y términos

[070] Salvo que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan según el uso convencional. Definiciones de los términos comunes de biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000; Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Publishers, 1994; Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology*; a *Comprehensive Desk Reference*, publicada por Wiley, John & Sons, Inc., 1995; y George P. Redei, *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics*, 2<sup>a</sup> Edition, 2003.

[071] Las siguientes explicaciones de términos y métodos se ofrecen para describir mejor la presente invención y para guiar a aquellos versados en la materia en la práctica de la presente invención. Las formas singulares "un", "uno" y "el" (y sus formas femeninas) se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "conteniendo una célula" incluye una o varias células y se considera equivalente a la frase "conteniendo al menos una célula". El término "o" se refiere a un solo elemento de entre varios elementos alternativos mencionados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[072] Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento para la puesta en práctica o el ensayo de la tecnología presentada, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y en modo alguno pretenden ser restrictivos.

[073] Para facilitar la revisión de las distintas realizaciones de esta invención, se ofrecen las siguientes explicaciones de términos específicos:

[074] Fosfatasa alcalina: una enzima hidrolasa que elimina grupos fosfato ( $P(O)(OR)_3$ ) de una molécula. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina hidroliza ésteres de naftol fosfato (sustrato) a compuestos fenólicos y fosfatos. Los fenoles azo se unen a sales de diazonio incoloras (cromógenos como Fast Red) produciendo un precipitado insoluble y coloreado.

5 [075] Alifático: fracciones que incluyen grupos alquilo, alqueno, alquino, alquilo halogenado o cicloalquilo como se describe más abajo. Un grupo "alifático inferior" es un grupo alifático ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

[076] Alquilo: un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, 10 tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y análogos. Un grupo "alquilo inferior" es un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Los términos "alquilo halogenado" o "grupo haloalquilo" se refieren a un grupo alquilo tal como se ha definido más arriba con uno o más de los 15 átomos de hidrógeno presentes en estos grupos sustituidos por un halógeno (F, Cl, Br, I). El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo basado en carbono no aromático compuesto de tres átomos de carbono como mínimo. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc. El término "grupo heterocicloalquilo" es un grupo cicloalquilo como el definido anteriormente, en donde al menos uno de los átomos de carbono del anillo es sustituido por un heteroátomo, entre otros, como nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. Grupos opcionalmente sustituidos, como "alquilo sustituido," describen grupos, como un grupo alquilo, que tiene de 1 a 5 sustituyentes, típicamente de 1 a 3 sustituyentes, 20 seleccionados del alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, arilo, carboxialquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, cicloalqueno opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicliilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, tiol y tioalcoxi.

[077] Anticuerpo: un polipéptido que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada y que se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos incluyen 25 anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o fragmentos de anticuerpos así como otros conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, un anticuerpo es marcado con un marcador detectable tal como una enzima o fluoróforo.

[078] Antígeno: una molécula que estimula una respuesta inmunitaria. Los antígenos son normalmente 30 proteínas o polisacáridos. Un epítipo es un determinante antigénico compuesto por grupos químicos o secuencias de péptidos en una molécula que provoca una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un antígeno o epítipo particular. La unión de un anticuerpo a un antígeno o epítipo de un antígeno particular puede utilizarse para localizar la posición del antígeno, por ejemplo, en o sobre una muestra biológica, o determinar si el antígeno particular se encuentra presente en una muestra biológica. Un antígeno de interés es un antígeno que en un ensayo IHC es designado para detectar en una muestra de ensayo. Por 35 ejemplo, para detectar un antígeno de interés, el anticuerpo primario utilizado en el ensayo IHC se une específicamente al antígeno de interés.

[079] Unión o unión estable: se refiere a la asociación entre dos sustancias o moléculas, como la asociación de un agente de unión específica (por ej., un anticuerpo) con un antígeno.

[080] Cromógeno: una sustancia capaz de convertirse en un producto coloreado, como un pigmento o un 40 colorante. Algunos cromógenos son donantes de electrones y, cuando se oxidan, se convierten en un producto coloreado. La producción de un producto coloreado y la propiedad de convertirse en insoluble tras la conversión química, como por oxidación, hace que los cromógenos resulten útiles para IHC. Ejemplos particulares de compuestos cromogénicos incluyen, entre otros, diaminobenzidina (DAB), 4-cloro-2-metilbenzenodiazonio (Fast Red), nitroazul de tetrazolio (NBT), Orange (Naranja) de AP, tetrametilbenzidina (TMB), 45 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS), New Fuchsin (Fucsia), yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

[081] DAB es un cromógeno que produce un producto final marrón altamente insoluble en alcohol y otros 50 disolventes orgánicos. La oxidación de DAB causa la polimerización que resulta en la capacidad de reaccionar con tetróxido de osmio y, por lo tanto, aumentar la intensidad de su coloración y densidad de electrones. De los muchos metales y métodos utilizados para intensificar la densidad óptica polimerizada de DAB, el cloruro de oro en combinación con sulfuro de plata parece ser el más eficaz.

[082] Las sales de diazonio son ejemplos adicionales de cromógenos que se acoplan a los fenoles producidos por la enzima fosfatasa alcalina mediante, por ejemplo, la hidrólisis de ésteres de naftol fosfato (sustrato) a 55 compuestos fenólicos y fosfatos. Los cromógenos Fast Red TR y Fast Blue (Azul) BB producen un producto final rojo o azul brillante, respectivamente. Los dos son solubles en disolventes alcohólicos y otros disolventes orgánicos, por lo que se utilizan medios de montaje acuosos. El colorante New Fuchsin también da un producto final rojo. A diferencia del Fast Red TR y del Fast Blue BB, el color producido por la New Fuchsin es insoluble

en alcohol y otros disolventes orgánicos, lo que permite la deshidratación de las muestras antes de colocar el cubreobjetos.

[083] Condiciones suficientes para detectar: cualquier entorno que permita la actividad deseada, por ejemplo, que permita que una sonda se una a una diana y que la interacción pueda ser detectada. Por ejemplo, tales condiciones incluyen temperaturas, soluciones tampón y medios de detección apropiados como microscopios y equipos de formación de imágenes digitales.

[084] Puesta en contacto: colocación que permite la asociación entre dos o más fracciones, en especial la asociación física directa, por ejemplo, tanto en forma sólida y/o en forma líquida (por ejemplo, la colocación de una muestra biológica, como una muestra biológica fijada a un portaobjetos, en contacto con una solución liberadora de antígeno).

[085] Control: una muestra o método realizados para evaluar la validez de un ensayo. En un ejemplo, un control es un control de calidad, como un control positivo. Por ejemplo, un control positivo es un método o muestra, como un tejido o célula, que es similar a la muestra de ensayo real, pero que se sabe por experiencia que da un resultado positivo. El control positivo confirma que las condiciones básicas del ensayo producen un resultado positivo incluso si ninguna de las muestras de ensayo reales producen dicho resultado. En un ejemplo particular, un control positivo es una muestra que por ensayos anteriores se sabe que contiene el antígeno sospechoso.

[086] En otros ejemplos, un control es un control negativo. Un control negativo es un método o muestra de ensayo que por experiencia se sabe que da un resultado negativo. El control negativo demuestra el resultado de la línea de partida obtenido cuando un ensayo no produce un resultado positivo medible; a menudo el valor del control negativo se trata como un valor "de fondo" que se resta de los resultados de la muestra de ensayo. En un ejemplo particular, un control negativo es un reactivo que no incluye el anticuerpo primario específico. Otros ejemplos incluyen controles calibradores, que son muestras que contienen una cantidad conocida de un antígeno de control. Dichos controles calibradores tiene una intensidad de la señal esperada y, por lo tanto, pueden utilizarse para corregir la variabilidad de coloración inter o intra ensayo.

[087] Detectar: determinar si un reactivo (como una señal o un antígeno o proteína particular) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto también puede incluir la cuantificación. "Detección" se refiere a cualquier método para determinar si algo existe, o no existe, como determinar si una molécula diana se encuentra presente en una muestra biológica. Por ejemplo, la "detección" puede incluir la utilización de un dispositivo visual o mecánico para determinar si una muestra presenta una característica específica. En algunos ejemplos, la detección se refiere a observar visualmente una sonda unida a una diana, u observar que una sonda no se une a una diana. Por ejemplo, para los métodos aquí descritos se utilizan habitualmente la microscopía luminosa y otros medios microscópicos para detectar precipitados cromogénicos.

[088] Marca detectable: una molécula o material capaz de producir una señal detectable (como visualmente, electrónicamente o de cualquier otra forma) indicativa de la presencia y/o concentración de una diana en una muestra. Cuando se conjuga con una molécula de unión específica, el marcador detectable puede utilizarse para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige la molécula de unión específica. Así, la presencia y/o concentración de la diana en una muestra puede detectarse detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable puede ser detectado directa o indirectamente, y pueden utilizarse varios marcadores detectables diferentes conjugados con diferentes moléculas de unión específica de forma combinada para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable, como un hapteno conjugado con un anticuerpo específico a una diana, puede ser detectado indirectamente utilizando un segundo marcador detectable que se conjuga con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Pueden conjugarse múltiples marcadores detectables que pueden ser detectados por separado con diferentes moléculas de unión específicas que se unen específicamente a diferentes dianas para obtener un ensayo multiplexado capaz de proporcionar la detección de las múltiples dianas presentes en una muestra.

[089] Los marcadores detectables incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (por ejemplo, convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra), haptenos que pueden ser detectados mediante interacciones de unión anticuerpo-hapteno utilizando conjugados de anticuerpos adicionales marcados de forma detectable, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen: enzimas, como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, B-galactosidasa o (3-glucuronidasa, fluoróforos, tales como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes de BODIPY, resorufinas y rodaminas (pueden encontrarse muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes en la Guía - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR); nanopartículas, como puntos cuánticos (Patentes Estadounidenses números 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138, quelatos de metales, como quelatos DOTA y

DPTA de iones metálicos radioactivos o paramagnéticos como  $Gd^{3+}$ ; y liposomas, por ejemplo, liposomas conteniendo moléculas fluorescentes atrapadas. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se utiliza un sustrato detectable como un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico en combinación con la enzima para generar una señal detectable (hay una amplia variedad de tales compuestos disponibles en el mercado, por ejemplo, pueden adquirirse en Life Technologies, Carlsbad, CA).

[090] Alternativamente, en un método de detección metalográfica puede utilizarse una enzima. Los métodos de detección metalográfica incluyen la utilización de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ión metálico soluble en agua y un sustrato redox inactivo de la enzima. La enzima convierte al sustrato en un agente redox activo y el agente redox activo reduce el ión metálico formando un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Estadounidense co-pendiente, n.º. de serie 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004, Publicación PCT n.º. 2005/003777 y Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense n.º. 2004/0265922). Los métodos de detección metalográfica incluyen la utilización de una enzima óxido reductasa (como peroxidasa de rábano) junto con un ión metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, para formar una vez más un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense n.º. 6.670.113). Los haptenos son pequeñas moléculas unidas por anticuerpos, aunque por sí mismos no provocarán una respuesta inmunitaria en animales y primero deben de ser acoplados a una molécula portadora de mayor tamaño, como una proteína, para generar una respuesta inmunitaria. Ejemplos de haptenos incluyen dinitrofenilo, biotina, digoxigenina y fluoresceína. En la Solicitud de Patente Estadounidense co-pendiente, n.º. de serie 11/982.627, presentada el 1 de noviembre de 2007 se presentan ejemplos adicionales que incluyen oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triterpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y haptenos de ciclolignano.

[091] Deficiente en electrones: indica un sistema pi, como un alqueno o areno, que tiene acoplados grupos que retiran electrones, como ocurre en el caso del nitrobenzeno o acrilonitrilo. En lugar de presentar la reactividad típica común a tales fracciones, los sistemas pi deficientes en electrones pueden ser electrofílicos y susceptibles de un ataque nucleofílico. En un ejemplo, un hapteno deficiente en electrones es DNP.

[092] Epítipo: un lugar en una molécula diana (por ej., un antígeno, como una proteína o una molécula de ácido nucleico) en el que se unen una molécula de unión de antígeno (por ej., un anticuerpo), un fragmento de anticuerpo, una proteína estructural conteniendo regiones de unión al anticuerpo, o aptámero. Los epítipos se pueden formar a partir de una interfaz de residuos tanto contiguos como no contiguos yuxtapuestos. Los epítipos formados a partir de residuos contiguos (por ej., aminoácidos o nucleótidos) normalmente quedan retenidos al quedar expuestos a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados mediante un plegamiento terciario normalmente se pierden al tratarlos con disolventes desnaturizantes. Normalmente un epítipo incluye al menos 3, y con mayor frecuencia, al menos 5, 8 o 10 residuos (por ej., aminoácidos o nucleótidos). Normalmente, un epítipo también tiene menos de 20 residuos (por ej., aminoácidos o nucleótidos) de longitud, tal como menos de 15 residuos o menos de 12 residuos.

[093] Fijación: un proceso que conserva a los constituyentes de las células y de los tejidos en un estado lo más cercano posible a la vida y permite que se puedan someter a métodos preparatorios sin que cambien. La fijación frena la autólisis y los procesos de descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte de las células, y estabiliza los constituyentes celulares y tisulares de modo que sean capaces de soportar las siguientes etapas del procesamiento de tejidos, como la IHC.

[094] Los tejidos se pueden fijar bien por perfusión con o sumersión en un fijador, como un aldehído (como formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído y análogos). Otros fijadores incluyen agentes oxidantes (por ejemplo, iones y complejos metálicos, como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercúrico, acetona, y ácido pícrico), reactivos combinados (por ejemplo, fijador de Carnoy, metacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y varios (por ejemplo, fijación con volumen excluido y fijación con vapor). En el fijador también pueden incluirse aditivos, como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (por ejemplo, cloruro de zinc, sulfato de zinc y sales de litio) y lantano.

[095] El fijador más utilizado habitualmente en la preparación de las muestras para IHC es formaldehído, generalmente en forma de solución de formalina (4 % de formaldehído en una solución tampón, denominada formalina tamponada al 10 %).

[096] Hapteno: una molécula, normalmente una molécula pequeña capaz de combinarse específicamente con un anticuerpo, pero que normalmente es sustancialmente incapaz de ser inumogénica excepto cuando se combina con una molécula portadora. Ejemplos de haptenos incluyen, entre otros, fluoresceína, biotina, nitroarilos, incluyendo entre otros, dinitrofenol (DNP) y digoxigenina.

[097] Hibridación: formar pares de bases entre las regiones complementarias de dos cadenas de ADN, ARN o entre ADN y ARN, formando así una molécula dúplex. Las condiciones de hibridación resultantes en niveles de

rigor particulares variarán en función de la naturaleza del método de hibridación y de la composición y la longitud de las secuencias de ácidos nucleicos que se están hibridando. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (como la concentración de  $\text{Na}^+$ ) del tampón de hibridación determinarán el nivel de rigor de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación para alcanzar unos niveles de rigor particulares se tratan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11).

[098] Inmunohistoquímica (IHC): un método para determinar la presencia o distribución de un antígeno en una muestra a base de detectar la interacción del antígeno con un agente de unión específica, tal como un anticuerpo. Se incuba una muestra que incluye un antígeno (como un antígeno diana) con un anticuerpo bajo condiciones que permiten la unión anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno puede detectarse mediante un marcador detectable conjugado con el anticuerpo (detección directa) o mediante un marcador detectable conjugado con un anticuerpo secundario, que se produce contra el anticuerpo primario (por ej., detección indirecta). Los marcadores detectables incluyen, entre otros, isótopos radioactivos, fluorocromos (como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y rodamina), y moléculas cromogénicas.

[099] Hibridación *in situ* (ISH): un tipo de hibridación que utiliza una cadena de ADN o ARN complementaria marcada (es decir, sonda) para localizar una secuencia de ADN o de ARN específica en una porción o sección de tejido (*in situ*) o, si el tejido es lo suficientemente pequeño (por ej., semillas de plantas, embriones de *Drosophila*), en todo el tejido (ISH de montaje completo). Es diferente de la inmunohistoquímica que localiza proteínas en secciones de tejidos. La ISH de ADN puede utilizarse para determinar la estructura de cromosomas, como para diagnósticos médicos para evaluar la integridad cromosomal. La ISH de ARN (histoquímica por hibridación) se utiliza para medir y localizar mRNA y otras transcripciones dentro de secciones de tejidos o en cantidades completas.

[0100] En la histoquímica por hibridación, las células y tejidos de muestra normalmente se tratan para fijar las transcripciones diana en su lugar correspondiente y para mejorar el acceso de la sonda a la molécula diana. Tal como se ha indicado anteriormente, la sonda es bien ADN complementario marcado o ARN complementario (Ribosonda). La sonda se hibrida a la secuencia diana a una temperatura elevada y, a continuación, el exceso de sonda se elimina por lavado (tras una hidrólisis anterior utilizando RNasa en el caso de un exceso de sonda de ARN no hibridada). Los parámetros de la solución, como la temperatura, concentración de sal y/o detergente pueden manipularse para eliminar cualquier interacción no idéntica (es decir, solo las secuencias que coinciden exactamente permanecerán unidas). A continuación, la sonda marcada que ha sido marcada de forma efectiva, por ejemplo con bases marcadas radioactivamente, fluorescencia o con antígenos (por ej., digoxigenina), se localiza y potencialmente se cuantifica en el tejido utilizando la autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente. En la ISH también pueden utilizarse dos o más sondas, marcadas con radioactividad u otras marcas no radioactivas, como marcadores de hapteno, y típicamente marcadas de forma diferente para detectar dos o más transcripciones simultáneamente.

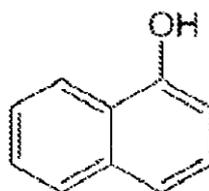
[0101] Alquilo inferior: un hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

[0102] Mamífero: este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" incluye a sujetos tanto humanos como veterinarios.

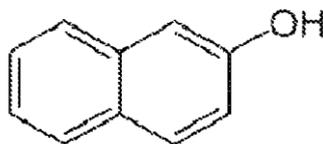
[0103] Molécula de interés o diana: una molécula cuya presencia, localización y/o concentración van a determinarse. Ejemplos de moléculas de interés incluyen secuencias de ácidos nucleicos y proteínas marcadas con haptenos.

[0104] Naftol: el naftol, o naftalen-1-ol y naftalen-2-ol es una de entre dos isoformas sólidas cristalinas incoloras con la fórmula  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OH}$  que son isómeros posicionales que difieren por la localización del grupo hidroxilo sobre naftaleno.

[0105] El  $\alpha$ -naftol es naftalen-1-ol con una fórmula



[0106] El  $\beta$ -naftol es naftalen-2-ol con una fórmula



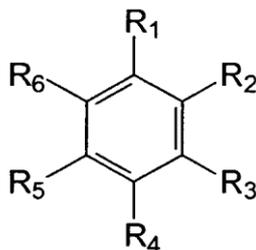
5 [0107] El naftol es el homólogo del naftaleno del fenol, siendo el grupo hidroxilo más reactivo que en los fenoles. El naftol es soluble en alcoholes, éteres y cloroformo simple. En un ejemplo, el naftol se disuelve en un tampón de hibridación. Los compuestos de Naftol AS-TR fosfato, Naftol AS-MX fosfato, etc., se utilizan como sustrato, por ejemplo por una fosfatasa tal como una fosfatasa alcalina, y son componentes típicos de un complejo cromógeno de Fast Red/naftol fosfato.

10 [0108] Neoplasia y tumor: el proceso de un crecimiento celular anormal e incontrolado. La neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo.

[0109] El producto de la neoplasia es un neoplasma (un tumor), que es un crecimiento anormal de tejido resultante de una división celular excesiva. A un tumor que no hace metástasis se le denomina "benigno". A un tumor que invade el tejido circundante y/o que puede hacer metástasis se le denomina "maligno". Ejemplos de tumores hematológicos incluyen las leucemias, incluyendo leucemias agudas (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas, (como leucemia mieloide (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfática crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células peludas y mielodisplasia.

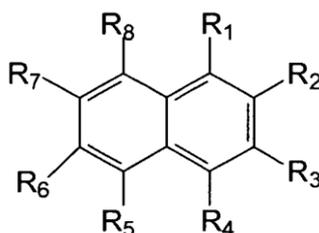
[0110] Ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, cáncer colorrectal, malignidad linfocítica, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, cáncer medular tiroideo, carcinoma de glándula sebácea, feocromocitoma, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, cáncer de vejiga y tumores del SNC (como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

[0111] Nitroarilo: una clase general de haptenos que incluye, entre otros, nitrofenilo, nitrobifenilo, nitrotrifenilo, etc., y cualquiera y todos los equivalentes heteroarilo, que tiene la siguiente fórmula química general.

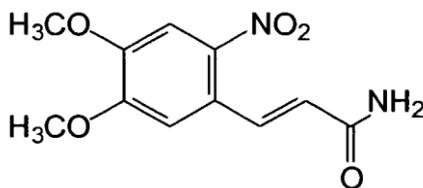


35 [0112] Con referencia a esta fórmula general, dichos compuestos tienen al menos uno, y opcionalmente, varios grupos nitro. Así, al menos uno de entre R1-R6 es nitro. Si más de uno de entre R1-R6 es nitro, todas las combinaciones de las posiciones relativas del anillo de varios sustituyentes nitro, o sustituyentes nitro relativos a otros sustituyentes del anillo, se incluyen dentro de esta clase de haptenos presentados. Los compuestos de dinitroarilo son los más corrientes. Cualquier persona experta en la materia apreciará que conforme aumenta el número de grupos nitro, disminuye el número de sustituyentes restantes en el anillo de la fórmula general.

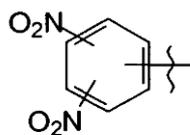
- Estos sustituyentes se seleccionan independientemente del: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifáticos, especialmente los alifáticos inferiores, alifáticos sustituidos, heteroalifáticos, por ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tal como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, especialmente un alquilo que tiene 20 átomos de carbono o menos, e incluso de manera más corriente todavía, alquilo inferior que tiene 10 átomos de carbono o menos, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo, (por ej.,  $-CX_3$  en donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, bien en la cadena o unidas al mismo), oxima, éter de oxima (por ej., metoxiimina,  $CH_3-O-N=$ ) alcoholes (es decir, alifáticos o alquilo hidroxilo, especialmente alquilo hidroxilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, como bencilo, carbohidratos, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilatos (incluyendo sales de los mismos, como un metal del Grupo I o carboxilatos de amonio), cíclico, heterocíclico, ciano ( $-CN$ ), éster, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ( $HO-N=$ ), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno, y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes  $R_1-R_6$  está unido a un enlazador o es un grupo funcional adecuado para su acoplamiento a un enlazador o a una molécula portadora.
- [0113] Dos o más de los sustituyentes  $R_1-R_6$  también pueden ser átomos, normalmente átomos de carbono, en un sistema de anillos, como naftaleno (mostrado abajo) o derivados tipo antraceno. Pueden formarse sistemas de anillos que no sean sistemas de anillos de 6 miembros, tal como sistemas de 6-5 anillos fusionados.



- [0114] De nuevo, al menos una de las posiciones de los anillos ocupada por  $R_1-R_8$  está unida a un enlazador o es un grupo funcional variable adecuado para su acoplamiento, como por un enlace covalente, a una molécula portadora. Por ejemplo, los compuestos de nitroarilo pueden incluir un grupo funcional para su acoplamiento a un portador, o a un enlazador, en distintas posiciones opcionales de los anillos.
- [0115] Las realizaciones de trabajo quedan de manifiesto mediante compuestos de nitrofenilo. Únicamente a modo de ejemplo, los compuestos de mononitroarilo quedan de manifiesto mediante compuestos de nitrocinamida. Una realización de un compuesto basado en nitrocinamida queda de manifiesto mediante 4,5-dimetoxi-2-nitrocinamida, mostrada más abajo.

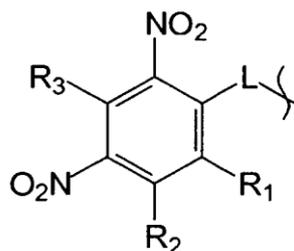


- [0116] La clase de compuestos de nitrofenilo también queda representada por compuestos de dinitrofenilo. Al menos uno de los átomos de carbono restantes de las posiciones de los anillos que no tienen un grupo nitro está enlazado a un grupo funcional, a un enlazador o directamente a un portador. Cualquiera y todas las combinaciones de posiciones relativas de estos grupos están incluidas en la clase de los haptenos presentados.



[0117] Las realizaciones de trabajo quedan especialmente de manifiesto mediante compuestos de 2,4-dinitrofenilo acoplados a un enlazador, tal como se ilustra más abajo.

5



[0118] R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son como se ha indicado anteriormente.

[0119] Oligonucleótido: una pluralidad de nucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster nativos, de entre unos 6 y unos 300 nucleótidos de longitud. Un análogo oligonucleótido se refiere a fracciones que actúan de manera similar a los oligonucleótidos pero que tiene porciones que no ocurren de forma natural. Por ejemplo, los análogos oligonucleótidos pueden contener porciones que no ocurren de forma natural, tal como fracciones con los azúcares alterados o enlaces entre los azúcares, como un oligodesoxinucleótido de fosforotioato. Los análogos funcionales de polinucleótidos que ocurren de forma natural pueden unirse al ARN o al ADN, e incluyen moléculas de ácido nucleico peptídico.

[0120] Algunos oligonucleótidos y análogos polinucleótidos particulares pueden incluir secuencias lineales de hasta unos 200 nucleótidos de longitud, por ejemplo, una secuencia (tal como ADN o RNA) que tiene una longitud de al menos 6 bases, por ejemplo al menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 o incluso 200 bases, o de unas 6 a unas 50 bases, por ejemplo, unas 10-25 bases, tal como 12, 15 ó 20 bases.

[0121] Sustancia polimérica: una sustancia compuesta de moléculas con una gran masa molecular compuesta de unidades estructurales repetidas, o monómeros, conectadas mediante enlaces químicos covalentes. Tal y como se utiliza en este documento, ejemplos de sustancias poliméricas pueden incluir parafina, agarosa y gelatina.

[0122] Sonda: un ácido nucleico aislado, un oligonucleótido sintético aislado, acoplado a un marcador detectable o molécula informadora. Los marcadores típicos incluyen isótopos radioactivos, sustratos de enzimas, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos (incluyendo, entre otros, DNP) y enzimas. Los métodos de marcado y guía para elegir los marcadores apropiados para varios fines, se detallan por ej., en Sambrook et al. (En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel et al. (En Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992).

[0123] Cualquiera versado en la materia apreciará que la especificidad de una sonda particular aumenta con su longitud. De este modo, las sondas pueden seleccionarse de modo que proporcionen una especificidad deseada, y pueden comprender al menos 17, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos deseada. En ejemplos particulares, las sondas pueden tener al menos 100, 250, 500, 600 ó 1000 ácidos nucleicos consecutivos de una secuencia de nucleótidos deseada.

[0124] Muestra: el término "muestra" se refiere a cualquier sustancia (o material) líquida, semisólida o sólida en o sobre la cual puede encontrarse presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida de un material biológico. Ejemplos de muestras biológicas incluyen muestras de tejido y muestras citológicas. En algunos ejemplos, la muestra biológica se obtiene de un sujeto animal, como un sujeto humano. Una muestra biológica es cualquier muestra sólida o líquida obtenida de, excretada por o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo, entre otros, organismos unicelulares, tales como bacterias, levaduras, protozoos y amebas, entre otros, organismos multicelulares (como plantas o animales,

40

incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o de un paciente humano afectado por un trastorno o enfermedad a diagnosticar o investigar, como un cáncer). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un líquido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cerebroespinal, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, líquido obtenido de un absceso o de cualquier otro punto de infección o inflamación), o un líquido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo muestras de biopsias o autopsias, como la biopsia de un tumor) o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o una célula cultivada) o un medio condicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En algunos ejemplos, la muestra biológica es un extracto nuclear. En algunos ejemplos, la muestra biológica es un citoplasma bacteriano. En ciertos ejemplos, una muestra es una muestra de control de calidad, como una de las muestras de la sección de sedimento celular presentadas. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo es una célula, un tejido o una sección de sedimento celular preparada a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es alguien con riesgo de padecer o que ya ha padecido un trastorno o enfermedad particular.

[0125] Unión específica: un término que se refiere a la unión de un agente que preferentemente se une a una diana definida (como un anticuerpo a un antígeno específico o una sonda de ácido nucleico a una secuencia de ácido nucleico específica). Respecto a un antígeno, "unión específica" se refiere a la asociación preferencial de un anticuerpo u otro ligando, en todo o en parte, con un polipéptido específico. Respecto a una secuencia de ácido nucleico, "unión específica" se refiere a la asociación preferencial de una sonda de ácido nucleico, en todo o en parte, con una secuencia de ácido nucleico específica.

[0126] Un agente de unión específica solo se une sustancialmente a una diana definida. Se reconoce que puede ocurrir un grado menor de interacción no específica entre una molécula, como un agente de unión específica, y un polipéptido no diana o una secuencia de ácido nucleico no diana. Aunque un anticuerpo selectivamente reactivo se une a un antígeno, puede hacerlo con baja afinidad. La unión específica anticuerpo a antígeno normalmente resulta en un aumento en la cantidad de anticuerpo enlazado u otro ligando (por unidad de tiempo) a un polipéptido diana superior a 2 veces, como superior a 5 veces, superior a 10 veces, o superior a 100 veces, en comparación con un polipéptido no diana. Hay una variedad de formatos de inmunoensayo apropiados para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA de fase sólida se utilizan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase en Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar una inmunorreactividad específica.

[0127] La unión específica de una sonda de ácido nucleico a una secuencia de ácido nucleico normalmente resulta en un aumento de la cantidad de sonda de ácido nucleico enlazada a una secuencia de ácido nucleico superior a 2 veces, como superior a 5 veces, superior a 10 veces o superior a 100 veces, en comparación con un ácido nucleico no diana. Hay una variedad de condiciones ISH apropiadas para seleccionar sondas de ácido nucleico que se unen específicamente a una secuencia de ácido nucleico particular (tal como aquí se describe).

[0128] Fracción de unión específica: un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan porque se unen entre sí con la exclusión sustancial de unirse a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es al menos  $10^3$  NT<sup>-1</sup> mayor,  $10^4$  M<sup>-1</sup> mayor o  $10^5$  M<sup>-1</sup> mayor que una constante de unión para cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas de una muestra biológica). Ejemplos particulares de fracciones de unión específica incluyen proteínas de unión específica (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, avidinas como estreptavidinas, y proteína A). Las fracciones de unión específica también pueden incluir las moléculas (o porciones de las mismas) que son enlazadas específicamente por dichas proteínas de unión específica.

[0129] Sustrato: una molécula sobre la que actúa un catalizador, como una enzima. En un ejemplo, un sustrato es 4-Cloro-1-naftol (4-CN), Naftol AS-TR fosfato, 5-Bromo-4-clor-3-indolil fosfato (BCIP), diaminobenzidina (DAB) o para-Nitrofenilfosfato (pNPP).

[0130] Diana: cualquier molécula cuya presencia, localización y/o concentración se determina o se puede determinar. Ejemplos de moléculas diana incluyen proteínas, ácidos nucleicos y haptenos, como haptenos enlazados covalentemente a proteínas o secuencias de ácidos nucleicos. Las moléculas diana normalmente se detectan utilizando uno o más conjugados de una molécula de unión específica y un marcador detectable.

[0131] Tejido: un conjunto de células interconectadas que realizan una función similar dentro de un organismo.

### III. Realizaciones de un método para la detección de dos o más moléculas en una sola muestra de tejido

[0132] Se presentan realizaciones que consisten en realizar una IHC o una ISH sobre una muestra de una manera tal que no excluya la realización de un segundo método de IHC o de ISH. Así, se realizan métodos IHC-IHC, ISH-ISH, IHC-ISH o ISH-IHC. En una realización comercial particular, la IHC y la ISH se realizan sobre la misma muestra.

[0133] En este documento se presentan realizaciones que consisten en un método para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido. En una realización, el método consiste en poner en contacto la muestra de tejido con una primera fracción de unión específica que se une específicamente a una primera molécula diana. En un ejemplo, la primera fracción de unión específica es un anticuerpo primario y la primera molécula diana es una proteína. Por ejemplo, el anticuerpo primario es un anticuerpo que detecta una proteína asociada al cáncer, tal como una HER2, c-Myc, n-Myc, Ab1, EGFR, TOP2A, Bcl2, Bcl6, Rb1, p53, o c-Met.

[0134] Algunas realizaciones del método consisten en detectar una primera molécula diana en la muestra de tejido. Por ejemplo, la primera molécula diana se detecta cromogénicamente añadiendo un cromógeno, como un compuesto aromático insoluble, rico en electrones, a la muestra de tal manera que se detecte la primera fracción de unión específica que se une a la primera molécula diana. En una realización, el compuesto aromático insoluble, rico en electrones, es un colorante azoico. En algunos ejemplos, la deposición de un cromógeno consiste en hacer reaccionar un sustrato con un catalizador para formar el compuesto aromático insoluble, rico en electrones. Por ejemplo, el catalizador es una enzima, tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano. Se selecciona un sustrato para la enzima, tal como 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC), 4-Cloro-1-naftol (4-CN), Naftol AS-TR fosfato, 5-Bromo-4-clor-3-indolil fosfato (BCIP), o para-Nitrofenilfosfato (pNPP). En una realización particular, se utiliza un sistema de detección cromogénico basado en DAB. Por ejemplo, se utiliza un sistema de detección IHC-DAB para detectar una primera proteína diana. En otra realización, se utiliza un sistema de detección de fosfatasa alcalina Fast Red. En una realización se utiliza un sistema de detección IHC de fosfatasa alcalina Fast Red para detectar una primera proteína diana. Por ejemplo, los Kits de detección ULTRAVIEW RED emplean un cóctel de anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina para localizar un anticuerpo primario enlazado. El anticuerpo primario, el complejo anticuerpo fosfatasa alcalina marcado, se visualiza utilizando un complejo cromógeno Fast Red/naftol fosfato. Un resultado positivo proporciona un precipitado rojo brillante localizado en el punto de unión. Por ejemplo, al realizar la IHC sobre una muestra de tejido con una dermatopatología, el color rojo brillante proporciona la diferenciación entre una proteína diana y los pigmentos de melanina que ocurren de forma natural y que están presentes en la muestra.

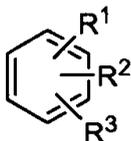
[0135] En una realización de la invención, un método para la detección cromogénica de dos o más moléculas en una sola muestra de tejido consiste en poner en contacto la muestra de tejido con una segunda fracción de unión marcada con el hapteno que se une específicamente a una segunda molécula diana. En algunas realizaciones, el hapteno de la segunda fracción de unión marcada con el hapteno es un compuesto aromático deficiente en electrones. Por ejemplo, la segunda fracción de unión específica marcada con el hapteno es una sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno, como una sonda de ADN marcada con el hapteno (por ej., una sonda de ADN marcada con DNP). En algunas realizaciones, la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP es de 5 µg/ml como mínimo. En algunas realizaciones, la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP varía de 10 µg/ml aproximadamente a 15 µg/ml aproximadamente.

[0136] En una realización, la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una proteína. En otra realización, la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico. En otras realizaciones, la primera diana es una secuencia de ácido nucleico y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico que se correlaciona con la proteína de la molécula diana (por ej., una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína diana, o secuencias de ácidos nucleicos en o cerca de la ubicación cromosomal en la que se encuentran las secuencias que codifican la proteína diana). La primera molécula diana y la segunda molécula diana pueden ser una molécula asociada al cáncer, como una proteína HER2, proteína c-Myc, proteína n-Myc, proteína Ab1, proteína EGFR, proteína TOP2, proteína Bc12, proteína Bc16, proteína Rb1, proteína p53 o proteína c-Met o un ácido nucleico que codifica una de estas proteínas, o secuencias de ácidos nucleicos en o cerca de la ubicación cromosomal en la que se encuentran las secuencias de codificación. En un ejemplo, la detección de la primera molécula diana incluye la realización de IHC y la detección de la segunda molécula diana incluye la realización de ISH. La realización de IHC consiste en detectar la primera molécula diana a través de un sistema de detección cromógeno de fosfatasa alcalina-color rojo o un sistema de detección cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB. La realización de ISH consiste en detectar la segunda molécula diana a través de un sistema de detección ISH de peroxidasa de rábano-plata o un sistema de detección de fosfatasa alcalina color rojo-plata. Los métodos de detección cromogénica pueden realizarse de forma automatizada o manual.

[0137] Realizaciones de la invención incluyen tratar la muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones conteniendo naftol fosfato antes de, de forma concomitante o de forma sustancialmente concomitante con la puesta en contacto de la segunda fracción de unión específica marcada con el hapteno con la muestra de tejido. En una realización, el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones conteniendo naftol fosfato se realiza antes de poner en contacto la segunda fracción de unión específica marcada con hapteno con la muestra. En otra realización, el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones conteniendo naftol fosfato de forma concomitante, o al menos sustancialmente concomitante, con la puesta en contacto de la segunda fracción de unión específica marcada con el hapteno con la muestra.

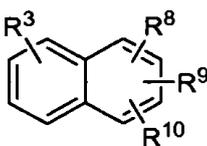
[0138] El método presentado para la detección cromogénica de dos o más moléculas también consiste en detectar la segunda molécula diana a base de depositar un segundo cromógeno insoluble que pueda distinguirse del compuesto aromático insoluble, rico en electrones, utilizado para detectar la primera molécula diana. El tratamiento de una muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones conteniendo naftol fosfato reduce la tinción de fondo que ocurre como consecuencia de la unión no específica de la fracción de unión específica marcada con el hapteno al compuesto insoluble, rico en electrones, depositado cerca de la primera molécula diana.

[0139] En una realización de la invención, el compuesto aromático soluble, rico en electrones, tiene la fórmula general



En donde al menos uno de los R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son grupos donantes de electrones seleccionados independientemente del H, -OR<sup>4</sup>, -NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, -OP<sub>3</sub><sup>2-</sup> y alquilo inferior; dos de los R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> forman un anillo fusionado, o un anillo que tiene uno o más puntos insaturados junto con el primer anillo aromático, opcionalmente sustituidos por uno, dos o tres sustituyentes donantes de electrones, y en donde R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o un alquilo inferior.

[0140] En otra realización de la divulgación, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> forman juntos un anillo aromático fusionado, en donde el compuesto aromático rico en electrones tiene la fórmula



En donde R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> se seleccionan independientemente del H, -OR<sup>11</sup>, -NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>, -OP<sub>3</sub><sup>2-</sup> y alquilo inferior, y R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> se seleccionan independientemente del H y alquilo inferior. En una realización particular de la invención, el compuesto aromático soluble, rico en electrones, es un compuesto hidroxil arilo o hidroxil biarilo, tal como naftol.

[0141] En una realización particular de la invención, se presenta un método de detección de ácido nucleico/proteínas automatizado que permite la doble detección de ácido nucleico/proteínas en la misma muestra de tejido en un solo ensayo automatizado. Una realización presentada del método consiste en dispensar automáticamente un anticuerpo primario sobre una muestra de tejido bajo condiciones suficientes como para que el anticuerpo primario se una específicamente a una primera molécula diana dentro de la muestra de tejido. En algunas realizaciones, los métodos, tal como se presentan en este documento, consisten en detectar la primera molécula diana presente en la muestra de tejido con el anticuerpo primario por IHC. Esta realización presentada consiste en dispensar automáticamente una sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno sobre la muestra de tejido bajo condiciones suficientes para que dicha sonda se una específicamente a una segunda molécula diana. En algunos ejemplos, la sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno

contiene un compuesto aromático deficiente en electrones, tal como se ha descrito anteriormente. Otras realizaciones consisten en tratar la muestra de tejido con una solución conteniendo un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato antes de o de forma concomitante con la dispensación automática de la segunda sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno sobre la muestra de tejido y detectar la segunda molécula diana por ISH. La concentración de naftol puede variar pero normalmente oscila entre 0,1 y 10 miligramos por mililitro aproximadamente, 0,2 miligramos por mililitro y 7 miligramos por mililitro aproximadamente, o 0,3 miligramos por mililitro y 1 miligramo por mililitro aproximadamente.

[0142] En una realización del presente método, la dispensación automática de la sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno sobre la muestra de tejido ocurre tras el tratamiento de la muestra de tejido con un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato. En otra realización, la dispensación automática de la sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno sobre la muestra de tejido ocurre de forma simultánea con el tratamiento de la muestra de tejido con un compuesto aromático rico en electrones conteniendo naftol fosfato, en donde el compuesto aromático rico en electrones y la sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno se aplican en la muestra de tejido bien de forma sustancialmente simultánea o bien en la misma solución. En algunos ejemplos, la sonda de ácido nucleico marcada con el hapteno es una sonda de ADN marcada con el hapteno, como una sonda de ADN marcada con DNP.

[0143] En algunas realizaciones de la presente invención, la IHC se realiza antes que la ISH. En otras realizaciones, la ISH se realiza antes que la IHC. En algunos ejemplos, la ISH consiste en detectar el ácido nucleico diana por tinción de peroxidasa de rábano-plata o por tinción de fosfatasa alcalina color rojo-plata. En algunos ejemplos, la detección por IHC consiste en detectar la proteína diana mediante un complejo cromógeno de enzima de fosfatasa alcalina-color rojo o un complejo cromógeno de enzima de peroxidasa de rábano-DAB.

[0144] Los métodos aquí presentados pueden realizarse de forma manual o automática, por ejemplo sobre un instrumento de procesamiento de tejidos automatizado. Los sistemas automatizados se controlan normalmente, al menos parcialmente, si no sustancialmente en su totalidad, a través de un ordenador. Dado que los sistemas automatizados son controlados normalmente a través de un ordenador, al menos parcialmente, determinadas realizaciones de la presente invención también se refieren a uno o más medios tangibles legibles por ordenador que almacenan instrucciones ejecutables por el ordenador para conseguir que el ordenador lleve a cabo las realizaciones presentadas del método.

#### IV. Muestras y dianas

[0145] Las muestras incluyen componentes biológicos y generalmente se sospecha que incluyen una o más moléculas diana de interés. Las moléculas diana pueden encontrarse sobre la superficie de células y las células pueden estar en una suspensión o en una sección tisular. Las moléculas diana también pueden ser intracelulares y detectarse por lisis celular o por penetración de una sonda a través de la célula. Aquellos versados en la técnica apreciarán que el método para la detección de moléculas diana en una muestra variará en función del tipo de muestra y de sonda que se esté utilizando. También son conocidos en la técnica métodos de recogida y preparación de muestras.

[0146] Las muestras utilizadas en los métodos aquí descritos, tal como una muestra de tejido u otra muestra biológica, pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. Las muestras pueden obtenerse de sujetos para un examen de rutina o de sujetos que se sospecha padecen un trastorno, como una anomalía genética o una neoplasia. Los métodos descritos también pueden ser aplicados a muestras sin anomalías genéticas, enfermedades, trastornos, etc., denominadas muestras "normales". Dichas muestras normales son útiles, entre otras cosas, en controles para su comparación con otras muestras. Las muestras pueden analizarse para muchos fines diferentes. Por ejemplo, las muestras pueden utilizarse en un estudio científico o para el diagnóstico de una enfermedad sospechosa, o como indicadores de pronóstico sobre el éxito de tratamientos, supervivencia, etc.

[0147] Las muestras pueden incluir múltiples dianas que pueden unirse específicamente mediante una sonda o molécula informadora. Las dianas pueden ser secuencias de ácidos nucleicos o proteínas. A lo largo de toda esta invención, siempre que se haga referencia a una proteína diana se entiende que las secuencias de ácidos nucleicos asociadas a esa proteína también pueden utilizarse como dianas. En algunos ejemplos, la diana es una proteína o una molécula de ácido nucleico de un patógeno, como un virus, bacteria o parásito intracelular, como de un genoma viral. Por ejemplo, una proteína diana puede producirse a partir de una secuencia de ácido nucleico asociada a (por ej., correlacionada con, causalmente implicada en, etc.) una enfermedad.

[0148] Una secuencia de ácido nucleico diana puede variar sustancialmente de tamaño. Sin limitación, la secuencia de ácido nucleico puede tener un número variable de residuos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana puede tener al menos 10 residuos de ácidos nucleicos aproximadamente, o al menos 20, 30, 50, 100, 150, 500, 1000 residuos aproximadamente. De forma similar, un polipéptido diana puede variar sustancialmente de tamaño. Sin limitaciones, el polipéptido diana incluirá al

menos un epítipo que se une a un anticuerpo específico al péptido, o a un fragmento del mismo. En algunas realizaciones ese polipéptido puede incluir al menos dos epítipos que se unen a un anticuerpo específico al péptido, o a un fragmento del mismo.

[0149] En algunos ejemplos específicos, no limitativos, una proteína diana se produce a través de una secuencia de ácido nucleico diana (por ej., una secuencia de ácido nucleico diana genómica) asociada a un neoplasma (por ejemplo, un cáncer). Se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluyendo translocaciones y otras reorganizaciones, amplificación o delección) en células neoplásicas, especialmente en células cancerosas, tales como leucemias de linfocitos B y linfocitos T, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon, cánceres neurológicos y similares. Por lo tanto, en algunos ejemplos, al menos una porción de la molécula diana se produce a través de una secuencia de ácido nucleico (secuencia de ácido nucleico diana genómica) amplificada o delecionada en al menos un subconjunto de células de una muestra.

[0150] Se sabe que los oncogenes son responsables de muchas malignidades humanas. Por ejemplo, las reorganizaciones cromosómicas en las que interviene el gen SYT que se encuentra ubicado en la región del punto de ruptura del cromosoma 18q11.2 son corrientes entre los tumores de tejidos blandos del sarcoma sinovial. La translocación t(18q11.2) puede identificarse, por ejemplo, utilizando sondas con marcadores diferentes: la primera sonda incluye moléculas de ácidos nucleicos FPC generadas a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende distalmente desde el gen SYT, y la segunda sonda incluye ácido nucleico FPC generado a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende 3' o proximal al gen SYT. Cuando las sondas correspondientes a estas secuencias de ácidos nucleicos diana (por ej., secuencias de ácidos nucleicos diana genómicas) se utilizan en un método de hibridación *in situ*, las células normales, a las que les falta una t(18q11.2) en la región del gen SYT, presentan dos señales de fusión (generadas por los dos marcadores que se encuentran cerca), que reflejan las dos copias intactas del SYT. Las células anormales con una t(18q11.2) presentan una sola señal de fusión.

[0151] En otros ejemplos, una proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ej., secuencia de ácido nucleico diana genómica) se selecciona por considerarse que es un gen supresor de tumores que está delecionado (perdido) en células malignas. Por ejemplo, la región pi 6 (incluyendo D9S1749, D9S1747, p16(INK4A), p14(ARF), D9S1748, p15(INK4B) y D9S1752) que se encuentra ubicada en el cromosoma 9p21 está delecionada en algunos cánceres de vejiga. Las delecciones cromosomales relativas a la región distal del brazo corto del cromosoma 1 (que comprende, por ejemplo, SHGC57243, TP73, EGFL3, ABL2, ANGPTL1 y SHGC-1322), y la región pericentromérica (por ej., 19p13-19q13) del cromosoma 19 (que comprende, por ejemplo, MAN2B1, ZNF443, ZNF44, CRX, GLTSCR2 y GLTSCR1) son características moleculares típicas de ciertos tipos de tumores sólidos del sistema nervioso central.

[0152] Los ejemplos mencionados se ofrecen con fines meramente ilustrativos y en modo alguno pretenden ser restrictivos. Otras muchas anomalías citogenéticas correlacionadas con la transformación y/o crecimiento neoplásico son conocidas por aquellos versados en la técnica. Las proteínas diana producidas mediante secuencias de ácidos nucleicos (por ej., secuencias de ácidos nucleicos diana genómicas), que han sido correlacionadas con una transformación neoplásica y que son útiles en los métodos presentados, también incluyen el gen EGFR (7p12; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000007, nucleótidos 55054219-55242525), el gen C-MYC (8q24.21; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000008, nucleótidos 128817498-128822856), D5S271 (5p15.2), gen lipoproteinlipasa (LPL) (8p22; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000008, nucleótidos 19841058-19869049), RB1 (13q14; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000013, nucleótidos 47775912-47954023), p53 (17p13.1; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000017, complemento, nucleótidos 7512464-7531642), N-MYC (2p24; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000002, complemento, nucleótidos 151835231-151854620), CHOP (12q13; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000012, complemento, nucleótidos 56196638-56200567), FUS (16p11.2; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000016, nucleótidos 31098954-31110601), FKHR (13p14; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000013, complemento, nucleótidos 40027817-40138734), así como, por ejemplo: ALK (2p23; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000002, complemento, nucleótidos 29269144-29997936), cadena pesada de la Ig, CCND1 (11q13; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000011, nucleótidos 69165054-69178423), BCL2 (18q21.3; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000018, complemento, nucleótidos 58941559-59137593), BCL6 (3q27; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000003, complemento, nucleótidos 188921859-188946169), MALF1, API (1p32-p31; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000001, complemento, nucleótidos 59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000017, complemento, nucleótidos 35798321-35827695), Tmprss (21q22.3; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000021, complemento, nucleótidos 41758351-41801948), ERG (21q22.3; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000021, complemento, nucleótidos 38675671-38955488), ETV1 (7p21.3; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000007, complemento, nucleótidos 13897379-13995289), EWS (22q12.2; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000022, nucleótidos 27994271-28026505); FLU (11q24.1-q24.3; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000011, nucleótidos 128069199-128187521), PAX3 (2q35-q37; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000002, complemento, nucleótidos 222772851-222871944), PAX7 (1p36.2-p36.12; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000001,

nucleótidos 18830087-18935219), PTEN (10q23.3; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000010, nucleótidos 89613175-89716382), AKT2 (19q13.1-q13.2; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000019, complemento, nucleótidos 45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000001, complemento, nucleótidos 40133685-40140274), REL (2p13-p12; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000002, nucleótidos 60962256-61003682) y CSF1R (5q33-q35; por ej., n.º. de acceso de GENBANK™ NC\_000005, complemento, nucleótidos 149413051-149473128).

[0153] En otros ejemplos, una proteína diana se selecciona de un virus o de otro microorganismo asociado a una enfermedad o trastorno. La detección de la secuencia de ácido nucleico diana derivada de un virus o microorganismo (por ej., secuencia de ácido nucleico genómica) en una muestra celular o tisular indica la presencia del organismo. Por ejemplo, el péptido, polipéptido o proteína dianas pueden seleccionarse del genoma de un virus oncogénico o patogénico, una bacteria o un parásito intracelular (tales como *Plasmodium falciparum* y otras especies *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como especies de *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* y *Babesia*).

[0154] En algunos ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ej., una secuencia de ácido nucleico diana genómica) de un genoma viral. Ejemplos de virus y de las secuencias genómicas correspondientes (n.º. de acceso de la Sec. de ref. de GENBANK™ entre paréntesis) incluyen adenovirus humano A (NC 001460), adenovirus humano B (NC\_004001), adenovirus humano C (NC 001405), adenovirus humano D (NC 002067), adenovirus humano E (NC 003266), adenovirus humano F (NC\_001454), astrovirus humano (NC\_001943), poliomavirus humano BK (V01109; GI:60851), bocavirus humano (NC\_007455), coronavirus humano 229E (NC\_002645), coronavirus humano HKU1 (NC 006577), coronavirus humano NL63 (NC 005831), coronavirus humano OC43 (NC 005147), enterovirus humano A (NC001612), enterovirus humano B (NC 001472), enterovirus humano C (NC 001428), enterovirus humano D (NC\_001430), eritrovirus humano V9 (NC\_004295), espumavirus humano (NC 001736), herpesvirus humano 1 (Virus del herpes simple de tipo 1) (NC 001806), herpesvirus humano 2 (Virus del herpes simple de tipo 2) (NC 001798), herpesvirus humano 3 (Virus varicela-zóster) (NC 001348), herpesvirus humano 4 de tipo 1 (Virus de Epstein-Barr de tipo 1) (NC 007605), herpesvirus humano 4 de tipo 2 (Virus de Epstein-Barr de tipo 2) (NC 009334), cepa AD169 del herpesvirus humano 5 (NC 001347), cepa Merlin del herpesvirus humano 5 (NC 006273), herpesvirus humano 6A (NC 001664), herpesvirus humano 6B (NC 000898), herpesvirus humano 7 (NC001716), herpesvirus humano 8 tipo M (NC\_003409), herpesvirus humano 8 tipo P (NC\_009333), virus de la inmunodeficiencia humana 1 (NC 001802), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (NC 001722), metapneumovirus humano (NC 004148), virus del papiloma humano-1 (NC 001356), virus del papiloma humano 18 (NC 001357), virus del papiloma humano 2 (NC 001352), virus del papiloma humano 54 (NC\_001676), virus del papiloma humano 61 (NC 001694), virus del papiloma humano cand90 (NC 004104), virus del papiloma humano RTRX7 (NC\_004761), virus del papiloma humano de tipo 10 (NC\_001576), virus del papiloma humano de tipo 101 (NC 008189), virus del papiloma humano de tipo 103 (NC 008188), virus del papiloma humano de tipo 107 (NC 009239), virus del papiloma humano de tipo 16 (NC 001526), virus del papiloma humano de tipo 24 (NC 001683), virus del papiloma humano de tipo 26 (NC 001583), virus del papiloma humano de tipo 32 (NC 001586), virus del papiloma humano de tipo 34 (NC 001587), virus del papiloma humano de tipo 4 (NC\_001457), virus del papiloma humano de tipo 41 (NC 001354), virus del papiloma humano de tipo 48 (NC\_001690), virus del papiloma humano de tipo 49 (NC\_001591), virus del papiloma humano de tipo 5 (NC 001531), virus del papiloma humano de tipo 50 (NC 001691), virus del papiloma humano de tipo 53 (NC 001593), virus del papiloma humano de tipo 60 (NC 001693), virus del papiloma humano de tipo 63 (NC 001458), virus del papiloma humano de tipo 6b (NC 001355), virus del papiloma humano de tipo 7 (NC 001595), virus del papiloma humano de tipo 71 (NC 002644), virus del papiloma humano de tipo 9 (NC 001596), virus del papiloma humano de tipo 92 (NC 004500), virus del papiloma humano de tipo 96 (NC\_005134), virus parainfluenza humano 1 (NC 003461), virus parainfluenza humano 2 (NC\_003443), virus parainfluenza humano 3 (NC 001796), .parechovirus humano (NC\_001897), parvovirus humano 4 (NC\_007018), parvovirus humano B19 (NC\_000883), virus sincitial respiratorio humano (NC 001781), rhinovirus humano A (NC001617), rhinovirus humano B (NC 001490), espumarretrovirus humano (NC 001795), virus linfotrópico de linfocitos T humano 1 (NC 001436), virus linfotrópico de linfocitos T humano 2 (NC\_001488).

[0155] En determinados ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ej., una secuencia de ácido nucleico diana genómica) de un virus oncogénico, tal como el Virus de Epstein-Barr (EBV) o un Virus del Papiloma Humano (HPV, por ej., HPV16, HPV18). En otros ejemplos, la proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ej., secuencia de ácido nucleico diana genómica) es de un virus patogénico, como un Virus Sincitial Respiratorio, un Virus de la Hepatitis (por ej., Virus de la Hepatitis C), un Coronavirus (por ej., virus SARS), un Adenovirus, un Poliomavirus, un Citomegalovirus (CMV) o un Virus del Herpes Simple (HSV).

[0156] Las muestras de tejido descritas en este documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollarse más adelante en la técnica. Generalmente, las muestras de tejido se preparan fijando e inclusionando el tejido en un medio.

[0157] En algunos ejemplos se utiliza un medio de inclusión. Un medio de inclusión es un material inerte en el que se inclusionan los tejidos y/o células para ayudar a conservarlas para futuros análisis. La inclusión también permite cortar las muestras de tejido en secciones finas. El medio de inclusión contiene, entre otros, parafina, celoidina, un compuesto OCT™, agar, plásticos o acrílicos.

5 [0158] Muchos medios de inclusión son hidrófobos, por lo tanto, puede que resulte necesario retirar el material inerte antes de los análisis histológicos o citológicos, que hacen uso de reactivos hidrófilos principalmente. El término desparafinación o descerado se utiliza ampliamente en este documento para referirse a la retirada parcial o completa de cualquier tipo de medio de inclusión de una muestra biológica. Por ejemplo, las secciones de tejido inclusionadas con parafina se desceran haciéndolas pasar a través de disolventes orgánicos tales como tolueno, xileno, limoneno y otros disolventes adecuados.

10 [0159] El proceso de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra de tejido conserva los constituyentes de las células y de los tejidos en un estado lo más cercano posible a la vida y permite que se les pueda someter a métodos preparatorios sin que cambien significativamente. La fijación frena la autólisis y los procesos de descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte de las células, y estabiliza los constituyentes celulares y tisulares de modo que sean capaces de soportar las siguientes etapas del procesamiento de tejidos, como para IHC y ISH.

15 [0160] Los tejidos se pueden fijar mediante cualquier proceso adecuado, incluyendo la perfusión o por sumersión en un fijador. Los fijadores pueden clasificarse como agentes reticulantes (como aldehídos, por ej., formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes reticulantes no aldehídos), agentes oxidantes (por ej., iones y complejos metálicos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturizantes de proteínas (por ej., ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ej., cloruro mercúrico, acetona, y ácido pícrico), reactivos combinados (por ej., fijador de Carnoy, metacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y fijadores varios (por ej., fijación con volumen excluido y fijación con vapor). En el fijador también pueden incluirse aditivos, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (por ejemplo, cloruro de zinc, sulfato de zinc y sales de litio) y lantano.

20 [0161] El fijador más utilizado habitualmente en la preparación de las muestras para IHC es formaldehído, generalmente en forma de solución de formalina (4 % de formaldehído en una solución tampón, denominada formalina tamponada al 10 %). En un ejemplo, el fijador es una formalina neutra tamponada al 10 %.

## 30 VI. Sondas

[0162] Tal como se ha descrito anteriormente, una sonda incluye una fracción de detección y un marcador. La fracción de detección funciona tanto para unirse específicamente a una molécula diana como para asociarse a un marcador, de modo que la diana sea detectable. La fracción de detección se puede asociar al marcador de manera directa o indirecta. Cualquier persona versada en la materia apreciará que el marcador puede ser cualquiera de entre una variedad de moléculas conocidas por aquellos versados en la materia, como moléculas cromogénicas (por ej., moléculas que producen un pigmento o materia colorante) o fluoróforos (por ej., una molécula que absorbe un fotón y dispara la emisión de otro fotón con una longitud de onda diferente). En algunos ejemplos, las moléculas cromogénicas no son detectables hasta que reaccionan con una enzima y/o un sustrato adicional. El marcador se utiliza para detectar o visualizar el complejo sonda-diana.

35 [0163] Un ejemplo particular de una sonda es una sonda marcada con el hapteno, tal como una sonda de ácido nucleico marcada con DNP. En realizaciones particulares de los métodos presentados, se utiliza una sonda de ácido nucleico marcada con DNP para detectar una secuencia de ácido nucleico, en donde la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con DNP varía de 5 µg/ml a 15 µg/ml, tal como de 10 µg/ml a 15 µg/ml. En ciertas realizaciones, la detección puede resultar más fácil si se utilizan anticuerpos monoclonales anti-hapteno. Por ejemplo, una sonda marcada con el hapteno dirigida a una secuencia de ácido nucleico diana se administra de una manera tal que resulte efectiva para que la sonda reconozca la diana. A continuación se somete la muestra a hibridación, seguido de la adición de un anticuerpo monoclonal anti-hapteno conteniendo una molécula de enzima, seguido de la adición de un complejo sustrato/cromogénico para la detección del complejo diana/sonda.

40 [0164] Las fracciones de detección pueden estar diseñadas para que se conjuguen directamente con un marcador. Cuando se utiliza de esta manera, el complejo fracción de detección/marcador (es decir, la sonda) se pone en contacto con la muestra y se detecta la diana.

45 [0165] Las fracciones de detección también se pueden asociar indirectamente a un marcador. En algunos ejemplos, se pone una primera fracción de detección en contacto con una muestra. La fracción de detección puede estar basada bien en un ácido nucleico o bien en una proteína. La fracción de detección se puede conjugar con otra fracción que a continuación se une a través de un anticuerpo secundario por ejemplo, o una fracción de unión no basada en un péptido, tal como biotina. El par de unión del anticuerpo secundario o no peptídico se puede enlazar entonces a un marcador. En otro ejemplo, una fracción de detección se puede

asociar indirectamente a un marcador conjugando la fracción de detección, bien directa o indirectamente, a un péptido que tenga actividad enzimática. La actividad enzimática se selecciona de modo que tras la adición de uno o más sustratos, el o los sustratos son convertidos en un marcador o se convierten en un marcador más activo.

5 [0166] Entre los ejemplos de pares de enzima/sustrato cabe incluir los siguientes: HRP/DAB.; AP/Naftol AS-TR fosfato (o Naftol AS-MS fosfato, etc.); y beta-D-galactosidasa (beta-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ej., p-nitrofenil-beta-D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico (por ej., 4-metilumbeliferil-beta-D-galactosidasa). Existen otras muchas combinaciones de enzima-sustrato conocidas por aquellos versados en la materia. Para una revisión general de las mismas, véanse las Patentes Estadounidenses nº. 4.275.149 y 10 4.318.980. Cuando una sonda se crea a partir de la asociación indirecta de una o más moléculas adicionales, a las moléculas adicionales se les puede denominar componentes de la sonda.

[0167] Tal como se ha descrito previamente, en algunos ejemplos el marcador se conjuga indirectamente con un anticuerpo. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo con biotina en donde la biotina se une selectivamente a avidina para la detección subsiguiente. Alternativamente, un anticuerpo se conjuga con un 15 hapteno pequeño y un marcador se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno. De este modo se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con la fracción de detección.

[0168] Cuando la sonda incluye una enzima que reacciona con un sustrato para generar el marcador de detección, el sustrato puede ser un compuesto cromogénico. Existen numerosos ejemplos de tales sustratos. Por ejemplo, muchos de dichos compuestos se pueden adquirir en Invitrogen, Eugene OR. Ejemplos no 20 restrictivos particulares de compuestos cromogénicos incluyen nitrofenil-p-D-galactopiranosido (ONPG), 5-bromo-4-clor-3-indolil-P-galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-P-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil-a-D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-clor-3-indolil-P-D-glucuronido (X-Gluc) y 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). Como marcadores pueden utilizarse otras moléculas cromofóricas adicionales, tales como puntos cuánticos. Determinados puntos cuánticos se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo en 25 Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA).

#### VII. Contratación

[0169] La contratación es un método de post-tratamiento de las muestras una vez teñidas con agentes para detectar una o más dianas, de modo que sus estructuras puedan visualizarse más fácilmente al microscopio. Por ejemplo, antes de colocar el cubreobjetos puede hacerse uso opcionalmente de una contratación para 30 hacer que la tinción inmunohistoquímica sea más marcada. Las contrataciones tienen un color diferente que la tinción primaria. Se conocen numerosas contrataciones, como hematoxilina, eosina, verde de metilo, azul de metileno, Geimsa, Alcian Blue y Nuclear Fast Red.

[0170] En algunos ejemplos puede mezclarse más de un colorante entre sí para producir el contracolorante. Esto ofrece la flexibilidad y la posibilidad de poder elegir los colorantes. Por ejemplo, puede seleccionarse un 35 primer colorante para la mezcla que tenga un atributo particular pero que aún así no tenga un atributo diferente deseado. Puede añadirse un segundo colorante a la mezcla que muestra el atributo deseado que falta. Por ejemplo, para formar un contracolorante pueden mezclarse azul de toluidina, DAPI y azul celeste de pontamina.

[0171] En una realización, el acondicionamiento de células puede completarse en una fase para la doble 40 coloración de genes-proteínas o en más de una fase. La parte IHC del ensayo puede realizarse antes o después de la parte ISH del ensayo.

#### VIII. Captación de imágenes

[0172] Determinados, o todos, los aspectos de las realizaciones presentadas se pueden automatizar y facilitar a través de un sistema de análisis por ordenador y/o de análisis de imágenes. En algunas aplicaciones se 45 miden las relaciones precisas de color. En otras realizaciones se utiliza la microscopía luminosa para el análisis de las imágenes. Determinadas realizaciones presentadas incluyen la captación de imágenes digitales. Esto puede realizarse acoplando una cámara digital a un microscopio. Las imágenes digitales obtenidas de las muestras teñidas se analizan utilizando un programa de software de análisis de imágenes. El color puede medirse de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, el color puede medirse como valores de rojos, azules y 50 verdes, valores de tono, saturación e intensidad; y/o midiendo la longitud de onda específica o la gama de longitudes de onda utilizando una cámara de imágenes espectrales.

[0173] Una realización presentada consiste en utilizar técnicas de formación de imágenes de campo claro con colorantes cromogénicos. A través del colorante se transmite luz blanca en el espectro visible. El colorante absorbe luz de diferentes longitudes de onda y transmite otras longitudes de onda. Esto cambia la luz de 55 blanca a coloreada dependiendo de las longitudes específicas de la luz transmitida.

Las muestras también pueden evaluarse cualitativamente y semicuantitativamente. La evaluación cualitativa consiste en evaluar la intensidad de la coloración, identificar las demandas de tinción positivamente y los

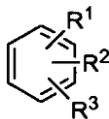
compartimentos intracelulares que intervienen en la tinción y evaluar la calidad general de la muestra o portaobjetos. En las muestras de ensayo se realizan evaluaciones puntuales y este análisis puede incluir una comparación con los valores medios conocidos para determinar si las muestras representan un estado anormal.

5

### IX. Kits de ensayo

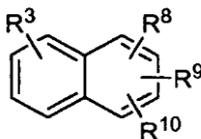
[0175] Las realizaciones presentadas de la presente invención proporcionan, en parte, kits para llevar a cabo las distintas realizaciones del método de la invención. Ejemplos de tales kits incluyen aquellos útiles para análisis de colesterol, kits de embarazo, kits de diagnóstico de cáncer, etc. Los kits de ensayo de la presente invención incluyen típicamente un primer reactivo, típicamente una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, como un compuesto aromático soluble, rico en electrones que tiene una fórmula

10



15 en la que los grupos R son como se ha indicado anteriormente.

[0176] En otro ejemplo presentado, el kit puede tener un compuesto aromático rico en electrones en donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> juntos forman un anillo aromático fusionado que tiene una fórmula



20

en la que los grupos R son como se ha indicado anteriormente. En un ejemplo específico presentado, un kit incluye un compuesto hidroxil arilo o hidroxil biarilo, como naftol, combinado con una solución de hibridación y una sonda marcada con el hapteno, como una sonda de ácido nucleico marcada con DNP. En la invención, el kit puede incluir naftol fosfato.

25 [0177] El kit puede contener componentes adicionales, incluyendo anticuerpos, sondas marcadas con hapteno y otros reactivos necesarios para realizar una IHC y/o una ISH por detección cromogénica. Dichos kits pueden ser utilizados, por ejemplo, por un clínico o por un médico como ayuda para seleccionar una terapia apropiada para un paciente particular o para fines de diagnóstico.

### X. Realizaciones automatizadas

30 [0178] Cualquier persona versada en la técnica apreciará que las realizaciones del método aquí presentado para la detección cromogénica de dos o más moléculas pueden automatizarse. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de una serie Patentes Estadounidenses en las que se presentan sistemas y métodos para la realización de análisis automatizados, incluyendo las Patentes Estadounidenses n<sup>o</sup>. 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y las Solicitudes de Patente Publicadas n<sup>o</sup>. 20030211630 y 35 20040052685. Se llevaron a cabo realizaciones particulares de los métodos utilizando varios procesos automatizados.

### XI. Ejemplos de trabajo

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características específicas de realizaciones de trabajo. El alcance de la presente invención no queda limitado por las características presentadas en los ejemplos siguientes.

40

*Ejemplo 1*

[0179] Este ejemplo proporciona un ensayo por tinción que permite detectar ácidos nucleicos y proteínas en una sola muestra.

**A. Materiales y métodos**

5 [0180] Entre los reactivos utilizados para la realización de los dobles ensayos de hibridación y detección de ácido nucleico/proteínas cabe incluir el Kit de detección ULTRA VIEW SISH (Ventana Medical Systems, Inc., n/p 780-001), la Sonda ADN HER2 INFORM (Ventana Medical Systems, Inc., n/p 780-4332), el Anticuerpo de conejo anti-DNP (Ventana Medical Systems, Inc., n/p 780-4335), el Anticuerpo de conejo anti-HER2 (4B5) (Ventana Medical Systems, Inc., n/p 800-2996) y el Kit de detección ULTRA VIEW Universal Alkaline Phosphatase Red (Ventana Medical Systems, Inc., n/p 760-501). Con el instrumento BENCHMARK XT se utilizaron soluciones estándar a granel. Los programas de software NexES se modificaron según fue necesario para establecer el orden de adición de los reactivos, la temperatura y los tiempos de incubación.

15 [0181] Tejidos: se realizaron dobles estudios de hibridación y detección en tejidos con cáncer de mama y material de xenotransplantes (HER2 3-in-1 Control Slides, Ventana Medical Systems, Inc., n/p 783-4332). Se examinaron muestras de tejido con cáncer de mama para detectar células positivas de HER2 utilizando el anticuerpo anti-HER2 (4B5) de conejo y la sonda de ADN HER2. Se seleccionaron varios casos para su uso en bloques de múltiples tejidos que fueron los principales modelos de tejido utilizados para estos estudios. Los bloques de múltiples tejidos contenían tejido fijado con NBF y tejido fijado con Prefer. Los casos incluían tinción HER2 3+ así como 1+. Los casos 3+ mostraron una amplificación genómica mientras que los casos 1+ mostraron un número de copias genómicas normal. Los tejidos cualificados también se utilizaron para sondas de ADN TOP2A, EGFR y c-Met. Los anticuerpos para estas sondas incluían TOP2A (51-8/5B4) Ki67 (30-9), EGFR (5B7) y c-Met (3D4), respectivamente.

25 [0182] Sistemas de detección: la parte ISH del ensayo se realizó con el Kit de detección ULTRA VIEW SISH. La parte IHC del ensayo se realizó con el sistema HRP-DAB (Kit de detección DAB ULTRAVIEW Universal, Ventana Medical Systems, Inc., n/p 760-500) o bien con el sistema AP-Fast Red (Kit de detección ULTRAVIEW Universal Fosfatasa alcalina color rojo, Ventana Medical Systems, Inc., n/p 760-501 y el Kit de detección ISH ULTRAVIEW Fosfatasa alcalina color rojo, Ventana Medical Systems, Inc., n/p 800-504).

**B. Resultados**

30 [0183] La realización de la IHC con el sistema de detección DAB seguido de la ISH resultó en una cantidad significativa de tinción de fondo de plata que impidió que se siguiera detectando la señal cromogénica. En un principio se pensó que esta tinción de fondo se debía al conjugado multímero-HRP presente en el kit de detección IHC DAB. Los intentos de neutralizar dicha actividad tratando el tejido tras la detección IHC con calor (60 °C-90 °C durante 4 minutos) o peróxido de hidrógeno (3%) resultaron infructuosos. Con la adición de reactivos de detección de plata (Cromógeno de plata A, B y C del Kit de detección SISH) tras la IHC no se observó tinción de fondo. Por lo tanto, se concluyó que la tinción de fondo observada no se debía a los reactivos de detección SISH. No se observó tinción de fondo con el anticuerpo anti-DNP de conejo ni con el conjugado anti-conejo de cabra-HRP. El sistema de detección DAB para la parte IHC del ensayo se cambió por un sistema de detección de tinción por fosfatasa alcalina-Fast Red. Aunque el sistema de detección de tinción por fosfatasa alcalina-Fast Red (ya sea el Kit de detección ULTRAVIEW Universal Fosfatasa alcalina color rojo IHC o ISH) resultó en una menor tinción de fondo de plata en comparación con el sistema de detección DAB, hubo casos en los que todavía podía seguir observándose tinción de fondo. Estudios subsiguientes demostraron que la tinción de fondo observada en relación con el kit de detección DAB se debía a la sonda de ADN HER2.

45 [0184] Se observaron determinadas cantidades de tinción de fondo de plata en el doble ensayo IHC/ISH con los dos sistemas de detección IHC DAB y Fast Red. Cuando se utilizó el sistema de detección Fast Red, la tinción de fondo siguió el patrón de la tinción de detección IHC lo que hizo que el cromógeno rojo mostrara un tono diferente cuando se localizaba con la tinción moteada de plata (véase la FIG. 1). Esta tinción de fondo de plata no siempre resultó reproducible y varió de un instrumento a otro y de un ensayo a otro lo que hizo que resultara difícil identificar las causas relacionadas bien con el instrumento o bien con el reactivo. La tinción de fondo de plata no era aparente con tinción fuerte 3+ (véase la FIG. 3), pero era significativa con tinción débil 1+ (véase la FIG. 1). La tinción de fondo parecía aumentar cuanto mayor era la digestión de proteasa antes de la hibridación de la sonda de ADN.

55 [0185] En un principio se pensó que la tinción de fondo de plata asociada a los sistemas de detección Fast Red se debía a la reactividad cruzada del conjugado anti-conejo de cabra-HRP que se une al anticuerpo anti-HER2 4B5 de conejo y que esta tinción de fondo podría reducirse con un paso fijador post-IHC. No obstante, cuando se ensayó un portaobjetos de control negativo con el tampón de hibridación menos la sonda de ADN no se produjo tinción de fondo, lo que indicó que la tinción de fondo no se debía a la reactividad cruzada del conjugado anti-conejo de cabra-HRP sino que se debía a la sonda de ADN en sí misma.

[0186] También se observó que la tinción de fondo de plata era independiente del anticuerpo primario. Anticuerpos como los producidos contra CD20 y TOPOII también presentaron tinción de fondo de plata que seguía el patrón de tinción IHC (el CD20 es citoplásmico en amígdalas, el TOPOII es nuclear). La tinción de fondo de plata también se observó con diferentes sondas de ADN marcadas DNP. Los ensayos en los que se usaron sondas de ADN EGFR y TOPOII en ensayos de detección, también mostraron tinción de fondo de plata. Los ensayos en los que se usaron sondas de ADN para HPV III (16) en un principio no dieron tinción de fondo de plata, pero si se aumentaba la concentración de la sonda HPV al mismo nivel que en la sonda de ADN HER2 (10 µg/ml) se observaba tinción de fondo de plata (véase la FIG. 4). Con una versión marcada con FITC de la sonda de ADN HPV (16) no se observó tinción de plata (véase la FIG. 5), lo que indica que la interacción se basaba en la molécula DNP que interactuaba con el complejo cromógeno Fast Red/naftol fosfato. Los ensayos donde se utilizaron sondas de oligonucleótidos marcados DNP específicos para el cromosoma 7 y para el cromosoma 17 no contenían tinción de fondo de plata posiblemente porque a 2 µg/ml la concentración era demasiado baja como para que pudiera observarse esta reacción.

[0187] Se realizó un estudio en el que se incubó DNP libre con muestras de tejido tras el desarrollo del cromógeno Fast Red. Los resultados de este estudio resultaron en la misma tinción de fondo de plata asociada al patrón del cromógeno Fast Red.

[0188] Se realizaron estudios de inhibición competitiva para determinar si podía bloquearse la tinción de fondo de plata con la adición de varias sustancias químicas en el portaobjetos en presencia de sondas de ADN durante la hibridación de la sonda. Estudios de bloqueo demostraron que el naftol bloquea la tinción de fondo de plata como mínimo a niveles de trazas (véase la FIG. 2). El naftol se tituló en el tampón de hibridación y se descubrió que bloqueaba la tinción de plata un 100 % a concentraciones iguales o superiores a 300 µg/ml en el dispensador. Cuando la concentración de naftol era de 10 µg/ml aproximadamente o menor, no hubo bloqueo de la tinción de fondo de plata, excepto bajo condiciones de pH elevado (el pH de la solución de hibridación se ajustó a pH 10). Todos estos resultados sugieren que el componente DNP en las sondas marcadas DNP se une principalmente al componente de naftol fosfato del complejo cromógeno Fast Red. Esta unión es significativa a unas concentraciones de la sonda marcada con DNP de 10 µg/ml o superiores.

[0189] También se realizaron experimentos utilizando las sondas de ADN TOP2A, EGFR y c-Met en muestras de tejidos con secuencias genómicas de ácidos nucleicos ampliadas y no ampliadas además de la delección de la secuencia en el caso de TOP2A (véanse las FIGS. 6-13). La sonda de ADN TOP2A se hibridó tanto con el anticuerpo TOP2A como con el anticuerpo Ki67. En todos los casos, se detectaron hibridaciones de la sonda de ADN junto con la unión del anticuerpo en los dobles ensayos. Las condiciones de hibridación incluían naftol (300 µg/ml) minimizando así la contribución de la tinción de fondo de plata a los ensayos de detección. Estos estudios respaldan los métodos para la realización de dobles ensayos de hibridación y detección por IHC/ISH.

### *Ejemplo 2*

#### Acondicionamiento óptimo de las células

[0190] Este ejemplo proporciona condiciones para el acondicionamiento óptimo de las células para dobles procedimientos de tinción de genes y proteínas.

#### **A. Materiales y métodos**

[0191] Acondicionamiento de las células: el acondicionamiento óptimo de las células para cada uno de los ensayos se determinó comparando diferentes tipos de acondicionamiento de las células. Las opciones para el acondicionamiento de las células incluían CC1 (Tris/Ácido bórico/EDTA, pH 8,6), CC2 (ácido cítrico, pH 6,0), y un Tampón de reacción. El alcance del acondicionamiento de las células se ajustó seleccionando tiempos diferentes para el acondicionamiento celular, es decir, moderado, normal o prolongado. El tejido también se digirió para la tinción ISH con proteasa 3 para ISH durante 4 minutos aproximadamente, proteasa 3 durante 8 minutos aproximadamente o proteasa 2 para ISH durante 4 minutos aproximadamente.

#### **B. Resultados**

[0192] Se realizaron experimentos para determinar las condiciones óptimas de acondicionamiento de células para la tinción del anticuerpo anti-HER2 4B5 conforme a los métodos descritos anteriormente. La detección óptima de la diana para el anticuerpo anti-HER2 4B5 se observó cuando se seleccionó el CC1 estándar. La tinción también se consiguió con CC2 y un pretratamiento más prolongado de la proteasa además de con un Tampón de reacción. Aunque la tinción no era tan sólida cuando se utilizaba CC1, había una tinción significativa. El Tampón de reacción era la solución menos efectiva para el acondicionamiento de las células.

[0193] Se realizaron experimentos para determinar las condiciones óptimas para el acondicionamiento de células para la sonda de ADN HER2. La sonda de ADN HER2 se comportó óptimamente en las hibridaciones de dianas cuando las células de los tejidos se acondicionaron con CC2 durante un tiempo prolongado, y cuando el acondicionamiento de las células se complementó con un pretratamiento de la proteasa. Cuanto mayor era el tiempo de pretratamiento de la proteasa, mayor era la señal, sin embargo, el pretratamiento de la

proteasa durante un tiempo demasiado largo resultó en una morfología del tejido comprometida (por ej., degradación del tejido). El Tampón de reacción fue el menos efectivo como solución acondicionadora de células para la detección e hibridación de la sonda de ADN.

5 [0194] Estos estudios ilustran que el acondicionamiento básico de las células (CC1 es Tris/Ácido bórico/EDTA, pH 8,6) favorece la IHC óptima para el anticuerpo anti-HER2 4B5, mientras que el acondicionamiento ácido de las células junto con la digestión de proteasas (CC2 es ácido cítrico, pH 6,0) favorece la ISH de la sonda de ADN. No obstante, el antígeno de la proteína HER2 fue capaz de soportar un acondicionamiento de las células ácido, ya que el acondicionamiento de las células con CC2 más la digestión de proteasas produjo una tinción IHC más fuerte que el CC2 por sí solo.

10 [0195] En la mayoría de los niveles de pH, las histonas son proteínas cargadas positivamente debido al alto contenido de lisina/arginina. La lisina y la arginina son aminoácidos con un valor pKa elevado (10,5 y 12,5 respectivamente ) con lo que proporcionan a las histonas un pi dentro del rango de pH de 10,5 - 11,0. La mayoría de las proteínas tienen un pi dentro del rango de pH de 4,0-6,0. Se sugiere que el acondicionamiento ácido (pH 6,0) de las células es óptimo para sondas de ADN ya que es más severo en el caso de las proteínas que el acondicionamiento básico (pH 8,6) de las células. El acondicionamiento de las células es básicamente la desnaturalización con la rotura de los enlaces covalentes y no covalentes que mantienen a las proteínas unidas. La mayoría de las proteínas son sometidas a desnaturalización cuando el pH del entorno se encuentra cerca del pi de la proteína. Así, cuando el pH se encuentra cerca de la pKa de ese aminoácido, las interacciones electrostáticas normales entre grupos aminoácidos cargados se debilitan ya que un porcentaje significativo ya no estará cargado. Sin la carga no hay interacción electrostática. Como resultado, la proteína será menos estable y se verá más sometida a la desnaturalización, especialmente cuando la temperatura se aumenta significativamente por encima de 37 °C.

25 [0196] Para histonas con un pi de 10,5 a 11,0, las fuerzas electrostáticas quedan en gran medida inalteradas ya que el pH no estará cercano al pi. Esto significa que las fuerzas electrostáticas seguirán en gran medida intactas. Por lo tanto, serán las proteínas circundantes con un pi menor las que se verán más afectadas por el acondicionamiento de las células. Por ello, la digestión de proteasas para eliminar histonas se lleva a cabo mejor bajo un acondicionamiento ácido de las células para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas vecinas.

### *Ejemplo 3*

30 Doble tinción óptima de genes/proteínas

[0197] Este ejemplo ilustra que la señal IHC generada por el doble método de tinción de gen/proteína depende de si la IHC se realiza antes o después de la ISH.

#### **A. Materiales y métodos**

35 [0198] Acondicionamiento de las células: Tal como se ha descrito anteriormente, se determinó el acondicionamiento óptimo de las células para cada uno de los ensayos.

[0199] Orden de la IHC y la ISH: el orden de los dos ensayos de detección se determinó comparando la ISH seguida de la IHC con la IHC seguida de la ISH. También se exploró la secuencia para el acondicionamiento de las células, para ver si el acondicionamiento de las células para cada uno de los ensayos debía de realizarse de forma simultánea o secuencial.

#### **B. Resultados**

40 [0200] Se realizaron experimentos para determinar si el orden de la IHC y de la ISH influía en la señal de detección IHC. Se descubrió que la señal de detección IHC era menor si se realizaba después de la ISH y mejor si la IHC se realizaba primero. Una explicación para esta diferencia en la señal son las duras condiciones que se dan durante la hibridación donde la temperatura se aumentó a 95 °C.

45 [0201] Incluso si la IHC se realiza antes que la ISH, se probaron varios formatos para combinar los dos ensayos. Algunos ejemplos de estos formatos se muestran en la Tabla 1. Los Formatos 1 y 2 se realizaron con resultados adecuados ya que la señal de detección ISH era buena y la tinción IHC era observable pero se consideró más débil (por ej., menor intensidad de la señal) que los resultados obtenidos con un solo ensayo IHC. La morfología de los tejidos era menos óptica con la digestión de proteasas 2.

50 [0202] Puede ser posible realizar todo el acondicionamiento de las células antes del ensayo IHC y realizar la digestión de la proteasa después de la detección IHC tal como se describe en el Formato 3. Aunque resulte posible generar tanto la señal IHC como ISH con una serie de formatos diferentes, un formato deseable es aquel que genera la mejor señal y morfología en comparación con un solo ensayo de tinción.



moléculas de cadena simple, y se dejó que la hibridación *in situ* tuviera lugar. Tras los pasos de hibridación y lavado, se aplicó un anticuerpo anti-DNP de conejo, los portaobjetos se lavaron, y se aplicaron anticuerpos anti-DNP de conejo, anti-conejo de cabra marcados con HRP o anti-conejo de cabra marcados con AP y los portaobjetos se incubaron y ensayaron para la detección final bien por detección con Plata o detección con Azul, respectivamente. El experimento se repitió hasta que la tinción de fondo de plata resultante de la unión de DNP a DAB o al pigmento antracótico disminuyó. Las disminuciones de la tinción de fondo de plata se correlacionaron con los aumentos en la concentración de Naftol AS-TR fosfato en el tampón de hibridación.

[0209] La adición de 10 mg/ml de Naftol AS-TR fosfato en el tampón de hibridación redujo la tinción de fondo de plata resultante de la unión del componente de DNP de la sonda de ADN al pigmento antracótico. 5 mg/ml de Naftol AS-TR fosfato en la solución de hibridación utilizada resultaron en la reducción significativa de la tinción de fondo de plata.

[0210] En la FIG. 4 (panel izquierdo) se muestra la doble hibridación *in situ* en color para EGFR y sondas de ADN centroméricas del cromosoma 7 (CEN7). La señal ISH EGFR se detectó utilizando una sonda de ADN marcada con DNP por Nick translation, EGFR y detección con azul basado en AP mientras que la señal de ISH del CEN7 se detectó utilizando oligosondas marcadas DNP para el CEN7 y detección con rojo basado en AP. El aspecto mejorado del pigmento antracótico aparece en forma de aglomeraciones de color azul oscuro (panel izquierdo). Cuando la sonda marcada con DNP por Nick translation se omitió del ensayo (panel central), el pigmento antracótico aparecía en forma de aglomeraciones de color negro (el aspecto natural de los pigmentos antracóticos).

[0211] Los pigmentos antracóticos se componen parcialmente de partículas de carbón que se sabe absorben hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como naftol. De este modo se evaluó el uso de un hidrocarburo aromático policíclico soluble en agua (tal como naftol) para bloquear la unión no específica de DNP al pigmento antracótico. Cuando en el tampón de hibridación se añadió naftol para la hibridación *in situ* con sondas marcadas DNP EGFR por Nick translation, los pigmentos antracóticos se veían como aglomeraciones de color negro (FIG. 14, panel derecho). Estos estudios demostraron que la unión de la sonda al pigmento antracótico podía bloquearse con éxito por co-incubación del naftol con la sonda de ADN marcada con DNP por Nick translation durante la hibridación.

#### Ejemplo 5

##### Eliminación de la tinción de fondo por detección SISH tras IHC DAB

[0212] Este ejemplo ilustra que una alta concentración de Naftol AS-TR fosfato (25 mg/ml) en el tampón de hibridación elimina la interacción química entre DAB y DNP, eliminando así la tinción de fondo generada por la detección SISH.

[0213] Durante el desarrollo de ensayos de doble y triple detección por IHC e ISH, se observaron cantidades significativas de tinción de fondo de la detección SISH tras la detección IHC basada en DAB. La tinción de fondo puede ser el resultado de la unión del componente DNP de las sondas de ADN marcadas DNP por Nick translation al ADN presente en los núcleos y depositado en la tinción DAB. La DAB es rica en electrones y se une al ADN por lo que la DAB es un agente causante de cáncer. El DNP es una molécula aromática deficiente en electrones que puede unirse a la DAB rica en electrones. Se observó que si se añadía una molécula aromática de bloqueo competitivo, rica en electrones (como naftol-AS-TR fosfato) podía evitarse la unión no específica.

[0214] En este experimento, la diana para el ensayo de detección IHC era la proteína HER2 que se expresa a altos niveles en las células amplificadas del gen HER2. Las dianas para los ensayos de detección ISH eran la región del gen HER2 y el centrómero del cromosoma 17 (CEN17). La diana de la proteína HER2 se detectó con un anticuerpo anti-HER2 y por detección basada en DAB. La región diana del gen HER2 se detectó por una sonda de ADN marcada con DNP por Nick translation y un sistema de detección SISH, mientras que la diana del CEN17 se detectó con oligosondas marcadas DNP y un sistema de detección con rojo basado en AP. La detección del ácido nucleico del HER2 por SISH tras la IHC HER2 produjo una alta tinción de fondo en los núcleos de las células negativas de la proteína HER2 (FIG. 15, panel superior izquierdo) y en el citoplasma, membrana celular y núcleos de las células positivas de la proteína HER2. Se ensayaron varias concentraciones de Naftol AS-TR fosfato para determinar si la co-incubación de Naftol AS-TR fosfato con la sonda marcada con DNP para la identificación de la diana, podría impedir la unión de la sonda de ADN marcada con DNP por Nick translation a DAB. Para reprimir la unión DNP a la tinción DAB se necesitaron altas concentraciones (25 mg/ml) sobre el portaobjetos. Una vez logrado con éxito el bloqueo de la unión de la sonda de ADN marcada con DNP por Nick translation al naftol AS-TR fosfato de DAB, no había tinción de fondo de plata significativa en los núcleos de las células negativas del HER2 (FIG. 15, panel superior derecho) ni en la membrana celular, citoplasma y núcleos de las células positivas del HER2 (FIG. 15, panel inferior derecho). Con el bloqueo de la unión de la sonda de ADN marcada con DNP por Nick translation a DAB, las

tres dianas, es decir proteína HER2, gen HER2 y CEN17, se visualizan todas en la misma sección del tejido (FIG. 15, panel inferior derecho).

[0215] Estos estudios ilustran que una alta concentración de Naftol AS-TR fosfato (25 mg/ml) en el tampón de hibridación elimina la interacción química entre DAB y DNP.

- 5 [0216] A la vista de tantas realizaciones posibles en las que se pueden aplicar los principios de la invención presentada, se reconocerá que las realizaciones ilustradas solo son ejemplos preferentes de la invención y no deben ser consideradas como restrictivas del alcance de la invención. Antes bien, el alcance de la invención queda definido mediante las reivindicaciones siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección cromogénica de dos moléculas diana en una sola muestra de tejido que consiste en:

5 poner en contacto la muestra de tejido con una primera fracción de unión específica que se une específicamente a una primera molécula diana;

detectar la primera molécula diana en la muestra de tejido depositando un producto cromógeno aromático, insoluble, rico en electrones, en donde la deposición cromogénica consiste en hacer reaccionar 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) con un catalizador para formar directa o indirectamente el producto cromógeno aromático, insoluble, rico en electrones;

10 poner en contacto la muestra de tejido con una segunda fracción de unión específica marcada con el hapteno que se une específicamente a una segunda molécula diana, en donde el hapteno de la segunda fracción de unión específica marcada con el hapteno es dinitrofenol;

15 tratar la muestra de tejido con una solución que contiene un compuesto aromático soluble, rico en electrones, que contiene naftol fosfato, se realiza antes o al tiempo que se pone en contacto la segunda fracción de unión específica marcada con dinitrofenol con la muestra de tejido.

20 detectar la segunda molécula diana a base de depositar un segundo producto cromógeno insoluble que pueda distinguirse del compuesto aromático insoluble, rico en electrones depositado para detectar la primera molécula diana, en donde el tratamiento de la muestra de tejido con la solución que contiene el compuesto aromático soluble, rico en electrones, reduce la tinción de fondo resultante de la unión no específica de la fracción de unión específica marcada con dinitrofenol al compuesto insoluble rico en electrones depositado cerca de la primera molécula diana.

25 2. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de Naftol reduce la tinción de fondo resultante de la unión no específica de la fracción de unión específica marcada con el hapteno al compuesto insoluble rico en electrones depositado cerca de la primera molécula diana y varía de 1 miligramo por mililitro a 30 miligramos por mililitro.

3. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración de Naftol varía de 1 miligramo por mililitro a 7 miligramos por mililitro.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la segunda fracción de unión específica marcada con dinitrofenol es una sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol.

30 5. El método de la reivindicación 4, en donde la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol es una sonda de ADN.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol es de 5 mg/ml como mínimo.

35 7. El método de la reivindicación 6, en donde la concentración de la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol varía de 10 µg/ml a 15 µg/ml.

8. El método de la reivindicación 1, en donde la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la primera molécula diana es una proteína y la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la primera molécula diana.

40 10. El método de la reivindicación 9, en donde la proteína es HER2/neu, c-Myc, n-Myc, Abl, proteína EGFR, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53 o c-Met.

11. El método de la reivindicación 1, en donde la primera molécula diana y la segunda molécula diana son una primera proteína y una segunda proteína.

45 12. El método de la reivindicación 1, en donde la primera molécula diana y la segunda molécula diana son una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la segunda molécula diana es una secuencia de ácido nucleico.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico que codifica HER2, c-Myc, n-Myc, Abl, EGFR, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53 y c-Met.

50

15. El método de la reivindicación 1, en donde el tratamiento de la muestra de tejido con la solución que contiene un compuesto aromático soluble, rico en electrones y conteniendo naftol fosfato, consiste en tratar la muestra de tejido con la solución que contiene un compuesto aromático soluble, rico en electrones que contiene naftol fosfato antes de poner en contacto la segunda fracción de unión específica marcada con dinitrofenol con la muestra de tejido.
16. El método de la reivindicación 1, en donde el tratamiento de la muestra de tejido con la solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones, conteniendo naftol fosfato consiste en tratar la muestra de tejido con la solución que contiene un compuesto aromático soluble, rico en electrones que contiene naftol fosfato al mismo tiempo que se pone en contacto la segunda fracción de unión específica marcada con dinitrofenol con la muestra de tejido.
17. El método de la reivindicación 1, en donde la primera fracción de unión específica es un anticuerpo primario.
18. El método de la reivindicación 17, en donde el anticuerpo primario se une a HER2, c-Myc, n-Myc, Abl, proteína EGFR, TOP2A, Bc12, Bc16, Rb1, p53 o péptidos c-MET.
19. El método de la reivindicación 1, en donde el catalizador es una enzima.
20. El método de la reivindicación 19, en donde la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.
21. El método de la reivindicación 1, en donde la detección de la primera molécula diana consiste en realizar la inmunohistoquímica (IHC) y la detección de la segunda molécula diana consiste en realizar la hibridación *in situ* (ISH) en donde la realización de la IHC consiste en detectar la primera molécula diana mediante un sistema de detección de cromógeno de fosfatasa alcalina-color rojo o un sistema de detección cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB y la realización de la ISH consiste en detectar la segunda molécula diana a través de un sistema de detección ISH a base de peroxidasa de rábano-plata o un sistema de detección a base de fosfatasa alcalina color rojo-plata.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el método es automatizado y consiste particularmente en:
- dispensar automáticamente un anticuerpo primario sobre una muestra de tejido bajo condiciones suficientes para que el anticuerpo primario se una específicamente a una primera molécula diana que se encuentra dentro de la muestra de tejido;
- detectar la primera molécula diana en la muestra de tejido con el anticuerpo primario por IHC;
- dispensar automáticamente una sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol sobre la muestra de tejido bajo condiciones suficientes para que la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol se una específicamente a una segunda molécula diana;
- tratar la muestra de tejido con una solución que contiene un compuesto aromático rico en electrones y conteniendo naftol fosfato antes de dispersar o al tiempo que se dispensa automáticamente la segunda sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol sobre la muestra de tejido; y
- detectar la segunda molécula diana por hibridación *in situ* (ISH), permitiendo así la doble detección de ácido nucleico y proteínas en la misma muestra de tejido en un solo proceso automatizado.
23. El método de la reivindicación 22, en donde la ISH consiste en detectar el ácido nucleico diana por ISH con tinción de peroxidasa de rábano-plata o tinción con fosfatasa alcalina color rojo-plata.
24. El método de la reivindicación 23, en donde la IHC consiste en detectar la proteína diana mediante un cromógeno de fosfatasa alcalina-color rojo o un cromógeno de peroxidasa de rábano-DAB.
25. Un kit para la detección cromogénica de dos o más moléculas diana en una sola muestra de tejido, que comprende una solución conteniendo 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) y un catalizador para formar, directa o indirectamente, un producto cromógeno aromático, insoluble, rico en electrones, a partir de DAB, una primera fracción de unión específica que se une específicamente a una primera molécula diana; una solución conteniendo una segunda fracción de unión específica marcada con dinitrofenol que se une específicamente a una segunda molécula diana; una solución conteniendo un compuesto aromático soluble, rico en electrones y conteniendo naftol fosfato, en donde la segunda fracción de unión específica marcada con dinitrofenol es una sonda de ácido nucleico marcada con DNP.
26. El kit de la reivindicación 25, en donde la solución conteniendo el compuesto aromático soluble, rico en electrones, y conteniendo naftol fosfato contiene además la sonda de ácido nucleico marcada con dinitrofenol.

FIG. 1

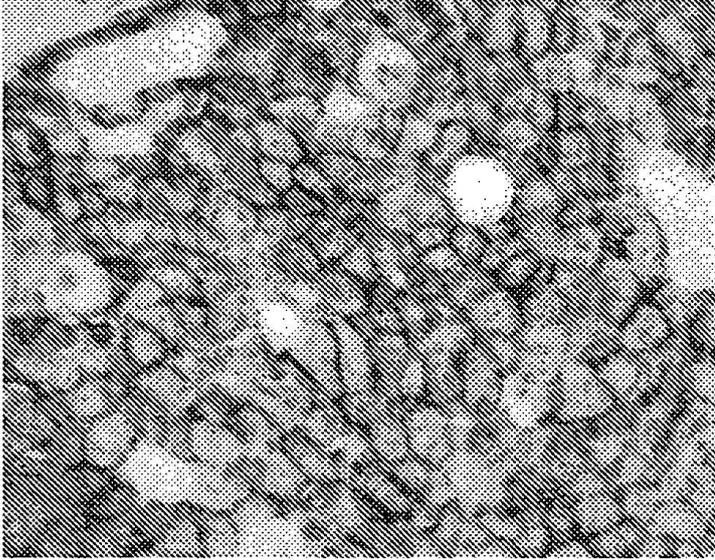


FIG. 2

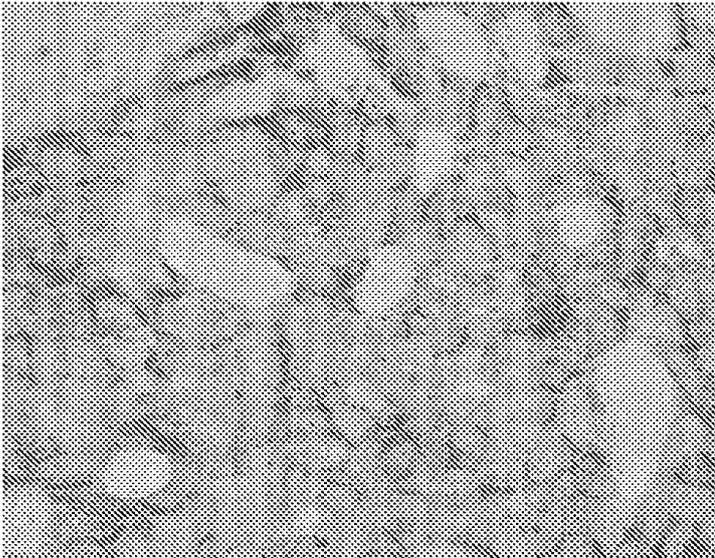


FIG. 3

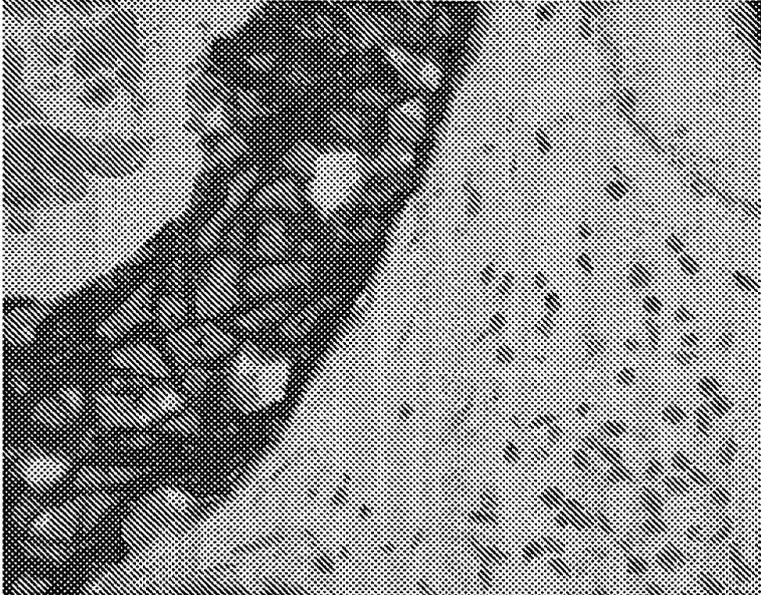


FIG. 4

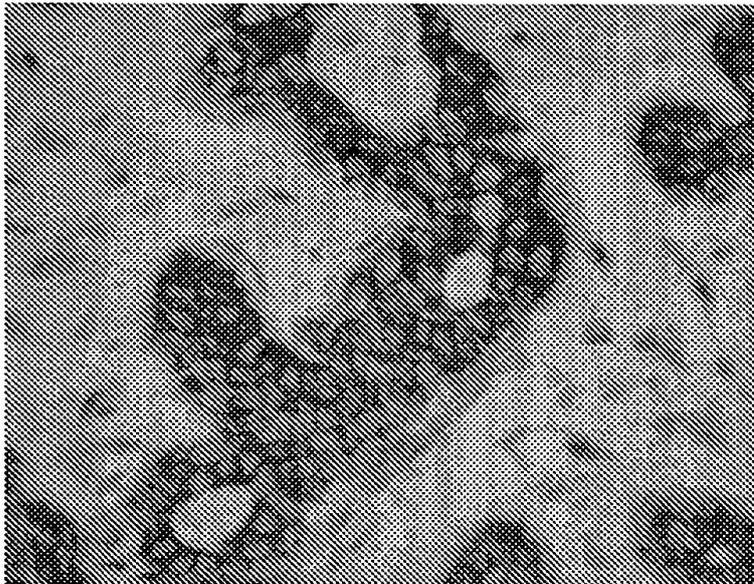


FIG. 5

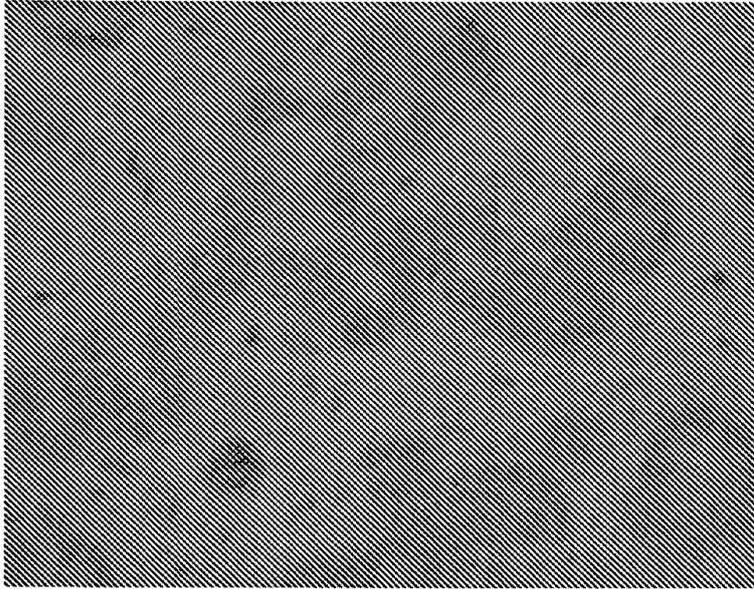


FIG. 6

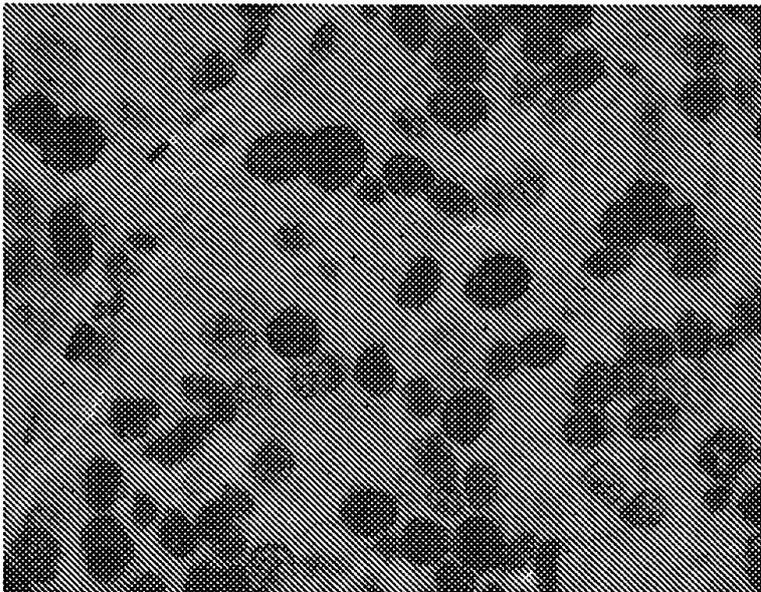


FIG. 7

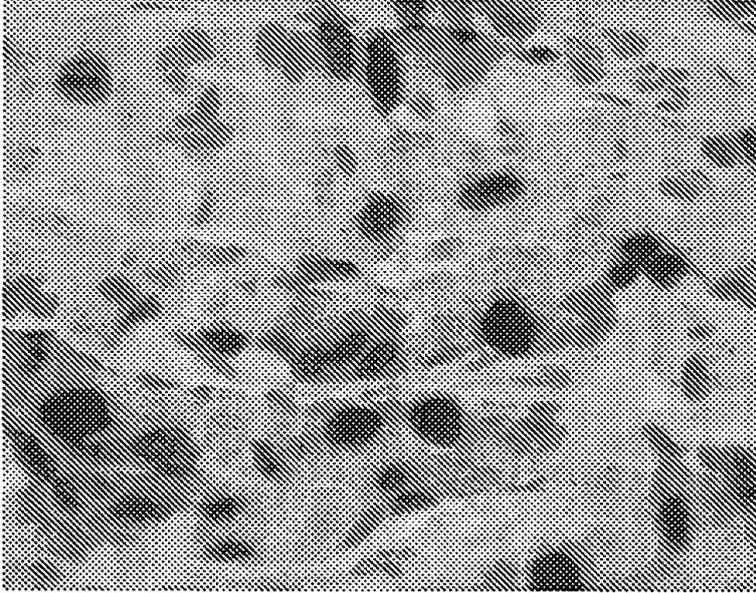


FIG. 8

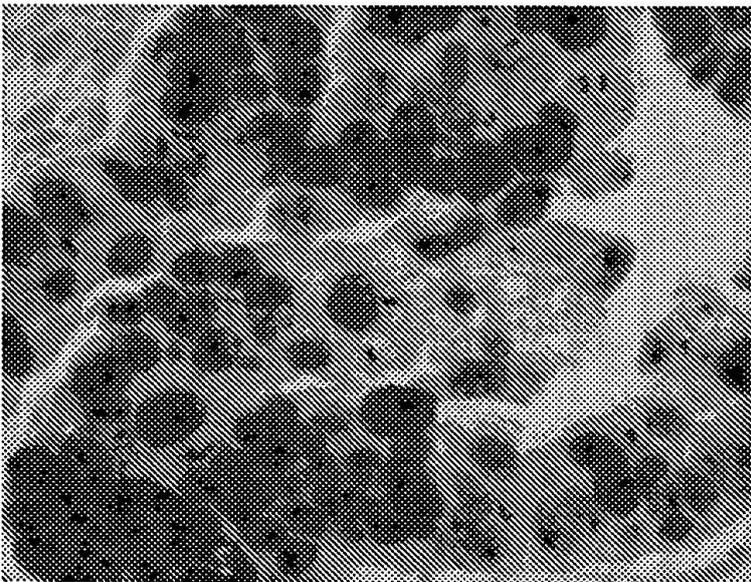


FIG. 9

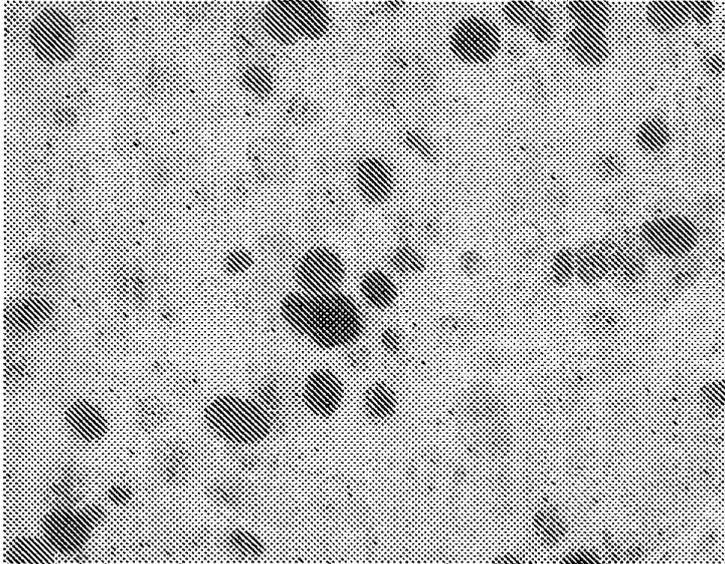


FIG. 10

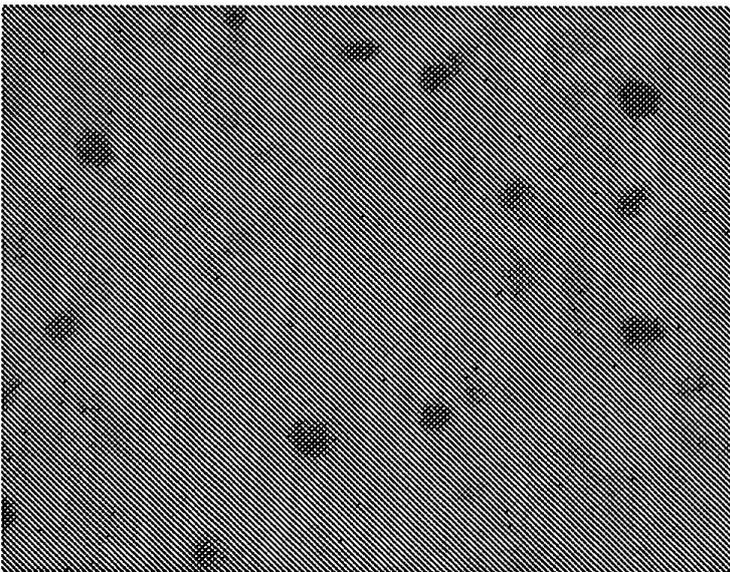


FIG. 11

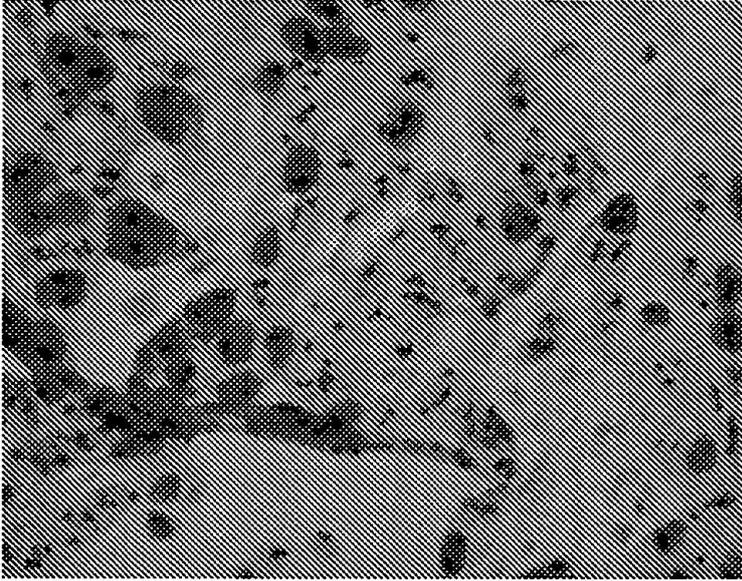


FIG. 12

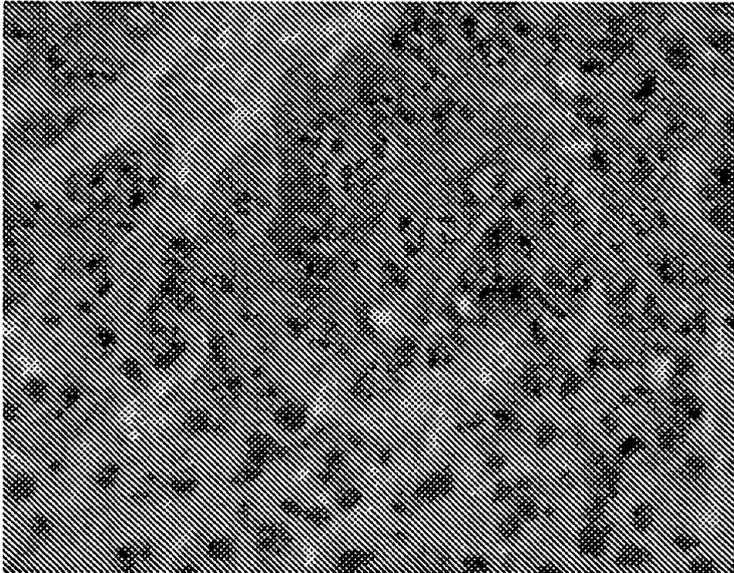


FIG. 13

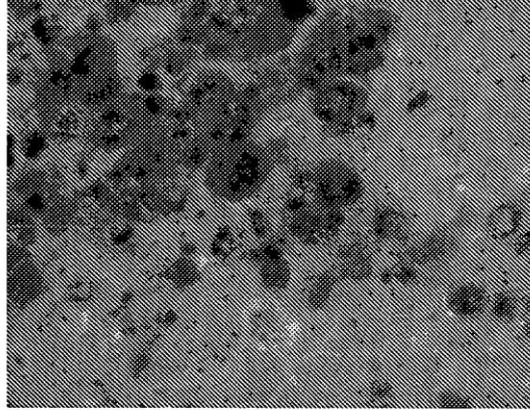
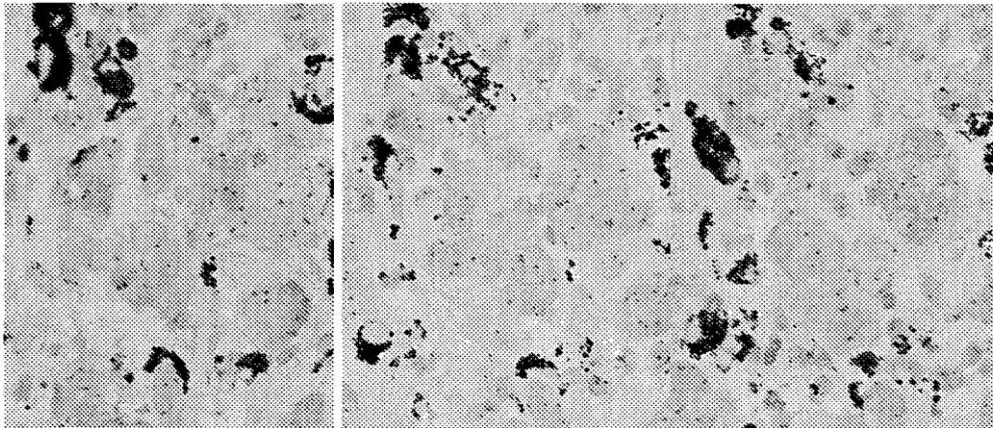


FIG. 14



**No bloqueante**  
⊗ EGFR  
⊗ CEN7  
● Pigmento antracótico

**Sonda no EGFR**  
⊗ CEN7  
● Pigmento antracótico

**Bloqueante**  
⊗ EGFR EG  
⊗ CEN7  
● Pigmento antracótico

FIG. 15

