

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 615**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6503 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011 E 11751996 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2606055**

54 Título: **Sustratos para detección cromogénica y métodos de uso en los ensayos y kits de detección**

30 Prioridad:

16.08.2010 US 374087 P

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

07.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KELLY, BRIAN, DANIEL;
BIENIARZ, CHRISTOPHER;
NITTA, HIRO y
GAIRE, FABIEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 542 615 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

Sustratos para detección cromogénica y métodos de uso en los ensayos y kits de detección

5 ÁMBITO

La presente descripción se refiere a sustratos y procesos para la detección cromogénica y en particular a compuestos dihidrogenofosfato de pirazolilo.

10 ANTECEDENTES

El diagnóstico de las enfermedades basado en la interpretación de muestras de tejidos o de células extraídas del organismo del paciente se ha expandido en gran manera durante los últimos años. Además de las técnicas tradicionales de tinción histológica y de los ensayos inmunológicos ahora se realizan técnicas "in situ", por ejemplo la hibridación "in situ" y la reacción en cadena de la polimerasa "in situ" para facilitar el diagnóstico de los estados patológicos de los humanos. Por lo tanto existe una gran variedad de técnicas que pueden evaluar no solo la morfología celular, sino también la presencia de macromoléculas específicas dentro de las células y de los tejidos.

La detección cromogénica de la fosfatasa alcalina (AP) en un tejido se lleva a cabo por lo general mediante la combinación de un fosfato de naftol AS sustituido y una sal de diazonio. Burstone introdujo esta metodología a finales de la década de los años 1950, véase Burstone, J. Histochem. Cytochem. 6, 322-39, 1958. Esta técnica implica la liberación del naftol por acción de la AP, que después reacciona con una sal de diazonio para generar un colorante azoico insoluble, que precipita en el sitio del epítipo.

Las técnicas cromogénicas estaban limitadas debido al número limitado de sustratos cromogénicos, que imparten diferentes colores y son compatibles con las técnicas inmunohistoquímicas. Por lo tanto, lo que se necesita en la técnica son sustratos cromogénicos que proporcionen nuevos colores para el uso en los ensayos inmunohistoquímicos y de hibridación. La adición de los nuevos sustratos cromogénicos permite lograr, por ejemplo, el multiplexado de diferentes dianas, que se identifican por depósitos de diferentes colores, todas ellas pueden identificarse en un tejido individual en un solo portaobjetos o placa.

Los compuestos descritos en la técnica anterior difieren de los sustratos aquí descritos en la estructura y en los usos.

En la patente US 4,120,956 A se describen los ésteres y las ester-amidas del ácido 3-alcóximetil- y -alquiltiometil-pirazol(5)-il(tiono)(tiol)-fosfórico (fosfónico), métodos de obtención de tales compuestos y su uso para combatir pestes.

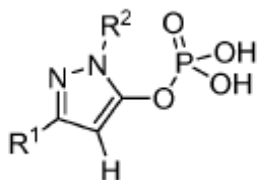
En el documento WO 2007/021966 A1 se describen compuestos de pirazol sustituido por un anillo arilo o heteroarilo como inhibidores de la actividad de la proteína del choque térmico 90 en una célula y su uso para el tratamiento y la prevención de trastornos de proliferación, por ejemplo del cáncer y de la angiogénesis.

RESUMEN

Aquí se describen las formas de ejecución de sustratos y procesos para la detección cromogénica y en particular los compuestos dihidrogenofosfato de pirazolilo.

La presente descripción no se limita a los compuestos dihidrogenofosfato de pirazolilo concretos. En ciertas formas de ejecución, los compuestos se describen mediante la siguiente fórmula:

50



incluidas sus sales; e incluidas las dos formas enantioméricas R y S y las mezclas racémicas de los mismos.

55 En algunas formas de ejecución, R¹ es hidrógeno, halógeno (p. ej. cloro, flúor, bromo, yodo), un grupo alifático saturado o insaturado de cualquier longitud que se desee, o un grupo arilo de cualquier tamaño que se desee.

En algunas formas de ejecución, R² es hidrógeno, un grupo alifático saturado o insaturado de cualquier longitud que se desee, o un grupo arilo de cualquier tamaño que se desee.

Tal como se emplea aquí, el término “alifático” indica los grupos ya conocidos en general como alquilo (p. ej. sustituido o sin sustituir), alqueno (p. ej. sustituido o sin sustituir), alquino (p. ej. sustituido o sin sustituir), alicíclico (p. ej. sustituido o sin sustituir).

5 Tal como se emplea aquí, el término “alifático sustituido” indica un grupo alifático que tiene cualquier número de átomos de carbono que se desee (p. ej. 100, 80, 75, 50, 40, 30, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2), en el que por lo menos uno de los átomos de hidrógeno alifático se ha reemplazado por un halógeno (p. ej. cloro, bromo, flúor, yodo), un amino, un hidroxilo, un alcoxi, un nitro, un tio, una cetona, un aldehído, un éster, una amida, un grupo alifático inferior, un grupo alifático inferior sustituido o un anillo (arilo, arilo sustituido, cicloalifático o cicloalifático sustituido, etc.).

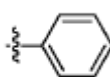
15 El término “alquilo” ya es conocido en la técnica e indica grupos alifáticos saturados, que incluyen los grupos alquilo de cadena lineal, los grupos alquilo de cadena ramificada, los grupos cicloalquilo (alicíclicos), los grupos cicloalquilo sustituidos por alquilo y los grupos alquilo sustituidos por cicloalquilo.

20 El término “alquilo sustituido” ya es conocido en la técnica e indica un resto alquilo que tiene un sustituyente que reemplaza a un átomo de hidrógeno de uno o más átomos de carbono del esqueleto del hidrocarburo. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alqueno, alquino, halógeno (p. ej. cloro, bromo, flúor, yodo), hidroxilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcocarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxi, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluidos el alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluidos el alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinilo, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático.

Tal como se emplea aquí, el término “arilo” indica un anillo aromático individual, por ejemplo un anillo fenilo, o dos o más anillos aromáticos conectados entre sí (p. ej. bisfenilo) o fusionados entre sí (p. ej. naftaleno o antraceno).

30 Tal como se emplea aquí, el término “sustituido arilo” indica un anillo aromático o un sistema de anillo aromático fusionado, en el que por lo menos uno de los átomos de hidrógeno de un carbono del anillo se ha reemplazado por un halógeno (p. ej. cloro, bromo, flúor, yodo), un amino, un hidroxilo, un alcoxi, un nitro, un tio, una cetona, un aldehído, un éster, una amida, un resto alifático inferior, un resto alifático inferior sustituido o un anillo (p. ej. arilo, arilo sustituido, cicloalifático o cicloalifático sustituido). Los ejemplos de tales incluyen, pero no se limitan a: hidroxifenilo y similares.

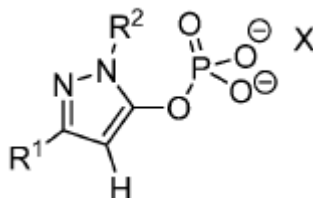
En algunas formas de ejecución, R^1 es hidrógeno.
En algunas formas de ejecución, R^1 es CH_3 .
En algunas formas de ejecución, R^2 es



(fenilo)

En algunas formas de ejecución, R^2 es hidrógeno.

En algunas formas de ejecución, el compuesto dihidrogenofosfato de pirazolilo es una sal que se puede describir también mediante la siguiente fórmula:

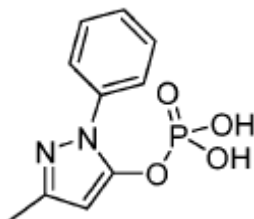


en la que X significa cualquier ion que tenga carga positiva.

50 En algunas formas de ejecución, X significa dos iones positivos monovalentes cualesquiera (p. ej. 2Na^+ , 2K^+ , 2NH_4^+ , etc.).

En algunas formas de ejecución, X es cualquier ion positivo divalente (p. ej. Mg^{2+}).

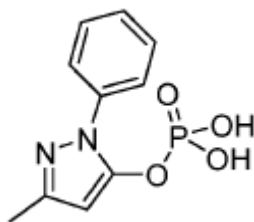
En algunas formas de ejecución, el compuesto dihidrogenofosfato de pirazolilo es el dihidrogenofosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo:



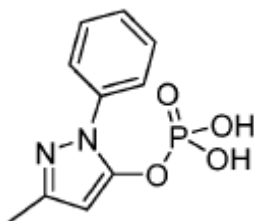
incluidas sus sales; e incluidas las dos formas enantioméricas R y S y las mezclas racémicas de los mismos.

5 En algunas formas de ejecución, el compuesto es un sustrato para una fosfatasa. En algunas formas de ejecución, el compuesto forma un precipitado de color dorado o amarillo en presencia de una fosfatasa y una sal de diazonio. En algunas formas de ejecución, la sal de diazonio es el tetraclorocincato de 4-(benzoilamino)-2,5-dietoxibencenodiazonio (Fast Blue BB).

10 Se describen formas de ejecución de kits que contienen un compuesto descrito en párrafos anteriores y una sal de diazonio. En algunas formas de ejecución, los kits contienen además una enzima que reacciona con dicho compuesto. En algunas formas de ejecución, la enzima es una fosfatasa. En algunas formas de ejecución, la sal de diazonio es el tetraclorocincato de 4-(benzoilamino)-2,5-dietoxibencenodiazonio (Fast Blue BB). En algunas formas de ejecución, la enzima está conjugada con un hapteno. En algunas formas de ejecución, la enzima está conjugada con una proteína que se fija sobre el antígeno. En algunas formas de ejecución, la proteína que se fija sobre el antígeno es una proteína que se fija sobre un antígeno anti-hapteno. En algunas formas de ejecución, la enzima está conjugada con un ácido nucleico. En algunas formas de ejecución, el compuesto de sustrato es el siguiente.



20 En algunas formas de ejecución, los métodos de detección de una diana en una muestra biológica incluyen: poner en contacto dicha muestra con un reactivo de detección que contiene una enzima que reacciona con un compuesto según la reivindicación 1, dicho reactivo de detección se fija directa o indirectamente sobre dicha diana, un compuesto según la reivindicación 1 y una sal de diazonio, dicha enzima actúa sobre dicho compuesto en presencia de dicha sal de diazonio para producir un compuesto coloreado; y detectar la presencia de dicho compuesto coloreado. En algunas formas de ejecución, la enzima es una fosfatasa alcalina. En algunas formas de ejecución, la sal de diazonio es el tetraclorocincato de 4-(benzoilamino)-2,5-dietoxibencenodiazonio (Fast Blue BB). En algunas formas de ejecución, la diana se elige entre el grupo formado por un ácido nucleico y una proteína. En algunas formas de ejecución, el reactivo de detección contiene un primer reactivo de fijación conjugado con dicha enzima. En algunas formas de ejecución, el primer reactivo de fijación se elige entre el grupo formado por una proteína que se fija sobre un antígeno, un ácido nucleico y un hapteno. En algunas formas de ejecución, el reactivo de detección contiene una enzima conjugada con un ácido nucleico, dicha diana es un ácido nucleico y dicho reactivo de detección se hibrida con dicha diana. En algunas formas de ejecución, el reactivo de detección contiene una enzima conjugada con una proteína que se fija sobre un antígeno, dicha diana es una proteína y dicho reactivo de detección se une a dicho analito. En algunas formas de ejecución, la detección es indirecta y el reactivo de detección contiene una enzima conjugada con una proteína que se fija sobre el antígeno y es específica de un hapteno. En algunas formas de ejecución, el compuesto es el siguiente.



40

Los objetos, características y ventajas previos y otros más de la invención resultarán más evidentes a partir de la descripción detallada que sigue y que toma como referencia las figuras anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 La figura 1 representa la estructura química de dihidrogenofosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo (1), un ejemplo de sustrato de AP, de color amarillo / dorado.
 La figura 2 es un esquema que ilustra una vía de síntesis para obtener la sal de amonio de 1.
 La figura 3 es un diagrama esquemático de una reacción del sustrato de AP 1 con sales de diazonio.
 10 La figura 4 contiene una serie de fotografías de tinción Ki-67 de tejido amigdalario con varias sales de diazonio.
 La figura 5 es una serie de fotografías que ponen de manifiesto el efecto de diluir la concentración de diazonio (la concentración del compuesto 1 se mantiene en 10 mM).
 La figura 6 es un esquema de retrosíntesis de la tartrazina (5).
 15 La figura 7 es dos imágenes de campo claro que ponen de manifiesto la detección de dianas múltiples en Xenografts: HER2 IHC (detección de AP de color dorado), HER2 ISH (detección de color plateado) y CEN17 ISH (detección de AP de color rojo).
 La figura 8 es dos imágenes de campo claro que ponen de manifiesto la detección de dianas múltiples en un caso clínico: HER2 IHC (detección de AP de color dorado), HER2 ISH (detección de color plateado) y CEN17 ISH (detección de AP de color rojo).
 20 La figura 9 es dos imágenes de campo claro que ponen de manifiesto la detección de dianas múltiples en un caso clínico: HER2 IHC (detección de AP de color dorado), HER2 ISH (detección de color plateado) y CEN17 ISH (detección de AP de color rojo).
 La figura 10 es una traza de compuesto 1 purificado detectada por HPLC.
 La figura 11 es una traza representativa detectada por resonancia magnética nuclear H^1 de la sal de bis-trietilamina (1) del fosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo en D_2O .
 25 La figura 12 es una traza representativa detectada por resonancia magnética nuclear C^{13} de la sal de bis-trietilamina (1) del fosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo en D_2O .

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 30 Aquí se describen formas de ejecución de sustratos y procesos para la detección cromogénica y en particular compuestos dihidrogenofosfato de pirazolilo. Ya son conocidos los colorantes azoicos que llevan un grupo pirazol, por ejemplo la tartrazina. Algunas formas de ejecución de los compuestos son complementarias de la serie de fosfatos de naftol AS y permiten acceder a nuevos colores de detección. Estos compuestos se sintetizan con preferencia capturando u ocultando un tautómero de enol de un compuesto pirazol-5(4H)-ona en forma de éster monofosfato.
 35 En WO 2007-021966A1 se describen compuestos fosfato de pirazol; sin embargo, la posición 4 del pirazol está sustituida y no puede reaccionar con las sales de diazonio.

I. DEFINICIONES

- 40 A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos que se emplean aquí tienen el mismo significado que le atribuyen habitualmente los expertos del ámbito, al que pertenece esta invención. Las definiciones de los términos habituales de biología molecular podrán encontrarse en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y col. (coord.), The Encyclopedia of
 45 Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (coord.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

- 50 Los términos singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen también los referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De igual manera, la conjunción “o” incluye también la “y”, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término “pluralidad” se emplea indistintamente con la expresión “más de uno”, es decir, dos o más. Se da por supuesto además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o de masa molecular que se indican para los ácidos nucleicos o los polipéptidos son aproximados y se facilitan con fines meramente descriptivos. El término “comprende” significa “incluye”. La
 55 abreviatura “p. ej.” (en inglés: e. g.) se deriva de la expresión latina *exempli gratia* y se emplea aquí para indicar un ejemplo no limitante. Por consiguiente, la abreviatura “p. ej.” es sinónimo del término “por ejemplo”. Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, en la práctica o en los ensayos de esta invención se emplearán los métodos y materiales descritos a continuación.

- 60 Con el fin de facilitar la revisión de las diversas formas de ejecución de esta invención, en las explicaciones que siguen se facilitan las definiciones de los términos específicos.

- 65 Anticuerpo: “anticuerpo” en sentido colectivo indica las inmunoglobulinas o moléculas similares a las inmunoglobulinas (incluidas a título de ejemplo y sin limitación la IgA, la IgD, la IgE, la IgG y la IgM, las combinaciones de las mismas y las moléculas similares producidas durante una respuesta inmune de cualquier vertebrado, por ejemplo, de un mamífero por ejemplo humano, cabras, conejos y ratones) y los fragmentos de

anticuerpo que se unen específicamente a una molécula de interés (o a un grupo de moléculas de interés muy similares) con exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tengan una constante de unión a la molécula de interés que sea por lo menos 10^3 M^{-1} mayor, por lo menos 10^4 M^{-1} mayor o por lo menos 10^5 M^{-1} mayor que la constante de unión a otras moléculas de una muestra biológica.

Más en particular, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipéptido que contiene por lo menos una región variable de inmunoglobulina de cadena corta o de cadena larga que reconoce de modo específico y se une a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena larga y una cadena corta, cada una de ellas tiene una región variable, también llamada región larga variable (V_H) y región corta variable (V_L). La región V_H y la región V_L juntas son las que realizan la unión con el antígeno reconocido por el anticuerpo.

El término incluye a las inmunoglobulinas intactas y a las variantes y porciones de las mismas, bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos proteolíticos de anticuerpo [por ejemplo los fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab ya son conocidos en la técnica], los fragmentos recombinantes de anticuerpo (por ejemplo los fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos $F(ab)_2$, proteínas Fv de cadena simple ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (ya conocidos en la técnica) y los anticuerpos camélidos (véase, por ejemplo, patentes U.S. n° 6,015,695; 6,005,079; 5,874,541; 5,840,526; 5,800,988; y 5,759,808). Una proteína scFv es una proteína de fusión, en la que una región variable de cadena corta de una inmunoglobulina y una región variable de cadena larga de una inmunoglobulina se unen mediante un engarce, mientras que en las dsFv, las cadenas han mutado para introducir el enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término incluye también las formas de ingeniería genética, por ejemplo los anticuerpos quiméricos (por ejemplo, los anticuerpos murinos humanizados), los anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo los anticuerpos biespecíficos). Véase también el Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3ª ed. revisada, W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Normalmente una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas largas (H) y cadenas cortas (L) interconectadas con enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena corta, la lambda y la kappa. Hay cinco clases principales (o isotipos) de cadena larga que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena larga y cada cadena corta contienen una región constante y una región variable (las regiones se conocen también como "dominios"). Las regiones variables de cadena larga y corta en combinación se unen de modo específico al antígeno. Las regiones variables de cadena larga y corta contienen una región de "estructura" o entramado (framework), interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región de estructura y de las CDR (véase Kabat y col., Sequence of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat puede consultarse ahora por internet. Dentro de una especie, las secuencias de las regiones de estructura de diferentes cadenas cortas o largas se conservan relativamente. La región de estructura de un anticuerpo, es decir, las regiones de estructura combinadas de las cadenas corta y larga constitutivas, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son los causantes primarios de la fijación sobre un epítipo de un antígeno. Las CDR de de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, se numeran sucesivamente partiendo del extremo N y se identifican también normalmente con la cadena, en la que está ubicada la CDR en cuestión. Por lo tanto, una V_H CDR3 está situada en el dominio variable de la cadena larga del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena corta del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une a RET tendrá una secuencia específica de región V_H y de región V_L y por consiguiente secuencias CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación con diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solamente un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR participa directamente en la unión con el antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se llaman restos determinantes de especificidad (SDR).

"Unión o unión estable" indica la asociación entre dos sustancias o moléculas, por ejemplo la hibridación de una molécula de ácido nucleico (p. ej. una región de enlace) con otra (o consigo misma) (p. ej. una molécula de ácido nucleico diana). Una molécula de ácido nucleico se une o se une de modo estable con una molécula de ácido nucleico diana si una cantidad suficiente de moléculas de ácido nucleico forma pares de bases o se hibrida con su molécula de ácido nucleico diana para permitir la detección de tal unión.

Se dice que una molécula de ácido nucleico es "complementaria" de otra molécula de ácido nucleico si las dos moléculas comparten un número suficiente de nucleótidos complementarios para formar un dúplex o un tríplex estable cuando las hebras se unen (se hibridan) entre sí, por ejemplo formando pares de bases de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inverso. La unión estable se produce cuando una molécula de ácido nucleico permanece unida de modo detectable a una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de un ácido nucleico diana) en las condiciones requeridas.

La complementariedad es el grado en el que las bases de una molécula de ácido nucleico (p. ej. sonda de ácido nucleico diana) se aparean con las bases de una segunda molécula de ácido nucleico (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana). La complementariedad se describe de modo conveniente mediante el porcentaje, es decir, la proporción de nucleótidos que forman pares de bases entre dos moléculas o dentro de una región o dominio específico de dos moléculas.

En la presente descripción, "complementariedad suficiente" indica que existe un número suficiente de pares de bases entre una molécula de ácido nucleico o región del mismo y una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) para lograr una unión detectable. Se encontrará un amplio tratamiento de las consideraciones cualitativas y cuantitativas que intervienen en el establecimiento de las condiciones de enlace en Beltz y col. *Methods Enzymol.* 100, 266-285, 1983 y en Sambrook y col. (coord.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Los términos "conjugar, unir, enlazar o engarzar" indican la unión covalente de una molécula con otra molécula para formar una molécula mayor. Por ejemplo, incorporando dos polipéptidos a una molécula contigua de polipéptido, o unión mediante enlace covalente un hapteno u otra molécula a un polipéptido, por ejemplo a un anticuerpo scFv. En un contexto específico, los términos incluyen la referencia a la unión a una molécula de enlace específica, por ejemplo un anticuerpo con un resto que genera una señal, por ejemplo un punto cuántico. La unión puede realizarse por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" indica una reacción entre el resto del anticuerpo y la molécula efectora, de modo que se forme un enlace covalente entre las dos moléculas, resultando de ello una molécula.

El término "unido" (coupled), cuando se aplica a un primer átomo o molécula que está "unido" a un segundo átomo o molécula puede indicar una unión directa o indirecta. Un anticuerpo secundario proporciona un ejemplo de unión indirecta. Un ejemplo específico de unión indirecta es el anticuerpo primario de conejo anti-hapteno que se une mediante un anticuerpo IgG de ratón anti-conejo, que a su vez está unido mediante un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón, que está unido mediante enlace covalente a un marcador (label) detectable.

El término "hapteno" indica una molécula, normalmente una molécula pequeña, que puede combinarse específicamente con un anticuerpo, pero que normalmente es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica, excepto en combinación con una molécula portadora.

Un "marcador" (label) es un compuesto o composición detectable que está conjugada directa o indirectamente con otra molécula para facilitar la detección de aquella molécula. Los ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores incluyen los restos fluorescentes y fluorogénicos, los restos cromogénicos, los haptenos, los marcadores de afinidad y los isótopos radiactivos. El marcador puede ser detectable directamente (p. ej. detectable ópticamente) o detectable indirectamente (por ejemplo, mediante la interacción con una o más moléculas adicionales, que a su vez son detectables). Los marcadores ilustrativos en el contexto de las sondas aquí descritas se indican a continuación. Los métodos para el marcado de ácidos nucleicos y la guía para la elección de los marcadores útiles para diversos fines se han discutido p. ej. en Sambrook y Russell, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) y Ausubel y col., en: *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987, incluidas las actualizaciones).

El término "múltiple" indica las formas de ejecución que permiten detectar múltiples dianas de una muestra de modo sustancialmente simultáneo o sucesivo, si se desea, empleando diferentes conjugados plurales. El multiplexado puede incluir la identificación y/o cuantificación de ácidos nucleicos en general, DNA, RNA, péptidos, proteínas, los dos a título individual y en cualquiera y todas las combinaciones. El multiplexado puede incluir también la detección de dos o más de los siguientes: un gen, un mensajero y una proteína de una célula en su contexto anatómico.

Un "ácido nucleico" es un desoxirribonucleótido o ribonucleótido polímero en forma de hebra simple o doble y, a menos que se limite de otro modo, abarca los análogos de los nucleótidos naturales que se hibridan con los ácidos nucleicos de manera similar a los nucleótidos de origen natural. El término "nucleótido" incluye, pero no se limita a un monómero que incluye una base (por ejemplo una pirimidina, purina o análogos sintéticos de las mismas) unida a un azúcar (por ejemplo una ribosa, desoxirribosa o análogos sintéticos de las mismas), o una base unida a un aminoácido, por ejemplo en un ácido nucleico péptido (PNA). Un nucleótido es un monómero de un polinucleótido. La secuencia de nucleótidos significa la secuencia de bases en un polinucleótido.

Una "sonda" o un "sonda de ácido nucleico" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con una molécula de ácido nucleico diana (p. ej. la molécula genómica de ácido nucleico diana) y, cuando se hibrida con la diana, es capaz de detectarse de manera directa o indirecta. Por lo tanto, las sondas permiten la detección y en algunos ejemplos la cuantificación de una molécula de ácido nucleico diana. En los ejemplos particulares, una sonda incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, que incluyen regiones de unión derivadas de la molécula de ácido nucleico diana y por ello son capaces de hibridarse de modo específico por lo menos con una porción de la molécula de ácido nucleico diana. Una sonda puede denominarse también "sonda marcada de ácido nucleico", que indica que la sonda está unida directa o indirectamente con un resto detectable o "marcador" (label), que hace que la sonda sea detectable.

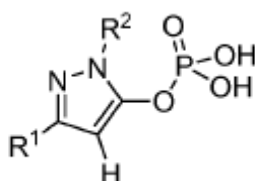
Una "muestra" es un material biológico que contiene el DNA, RNA (incluido el mRNA) genómicos, proteína o combinaciones de los mismos, obtenido de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a preparaciones cromosómicas, sangre periférica, orina, saliva, biopsias de tejidos, material quirúrgico, médula ósea, muestras de amniocentesis y material de autopsia. En un ejemplo, una muestra incluye DNA o RNA genómicos. En algunos ejemplos, la muestra es una preparación citogenética, por ejemplo que puede colocarse sobre el portaobjetos de un microscopio. En los ejemplos particulares, las muestras se emplean directamente, o pueden manipularse antes del uso, por ejemplo, por fijación (p. ej. empleando formalina).

Una "secuencia o molécula de ácido nucleico diana" es una región definida o una secuencia particular de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo un genoma (por ejemplo un gen o una región del DNA genómico de un mamífero que contiene el gen de interés) o una secuencia de RNA. En un ejemplo, cuando la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica diana, dicha diana puede definirse por su posición en un cromosoma (p. ej. en una célula normal), por ejemplo, con arreglo a la nomenclatura citogenética por referencia a una ubicación particular dentro de un cromosoma, por referencia a su ubicación en un mapa genético, por referencia a un "contig" hipotético o ensamblado ("contig" es un conjunto de segmentos de DNA que se solapan, derivados de una sola fuente genética), por su secuencia o función específicas, por su nombre de gen o de proteína o por cualquier otro medio que la identifique de modo inequívoco entre otras secuencias genéticas de un genoma. En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica de mamífero o de un virus. En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de RNA.

En algunos ejemplos, las alteraciones de una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico) están "asociadas con" una enfermedad o estado patológico. Es decir, la detección de la secuencia de ácido nucleico diana puede emplearse para inferir el estado de una muestra con respecto a la enfermedad o estado patológico. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana puede existir en dos (o más) formas diferenciables, de modo que una primera forma guarde relación con la ausencia de una enfermedad o estado patológico y una segunda forma (diferente) guarde relación con la presencia de dicha enfermedad o estado patológico. Las dos formas diferentes pueden distinguirse cualitativamente, por ejemplo por polimorfismos de polinucleótidos y/o las dos formas diferentes pueden distinguirse cuantitativamente, por ejemplo por el número de copias de la secuencia de ácido nucleico diana que están presentes en una célula.

II. Compuestos dihidrogenofosfato de pirazolilo

La presente descripción no se limita a compuestos dihidrogenofosfato de pirazolilo particulares. En ciertas formas de ejecución, los compuestos se describen mediante la siguiente fórmula:



incluidas las sales de los mismos; e incluidas las dos formas enantioméricas R y S y las mezclas racémicas de los mismos.

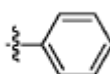
En algunas formas de ejecución, R¹ es hidrógeno, halógeno (p. ej. cloro, flúor, bromo, yodo), un grupo alifático saturado o insaturado de cualquier longitud que se desee, o un grupo arilo de cualquier tamaño que se desee.

En algunas formas de ejecución, R² es hidrógeno, un grupo alifático saturado o insaturado de cualquier longitud que se desee, o un grupo arilo de cualquier tamaño que se desee.

En algunas formas de ejecución, R¹ es hidrógeno.

En algunas formas de ejecución, R¹ es CH₃.

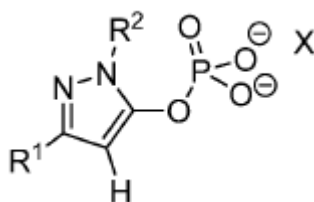
En algunas formas de ejecución, R² es



(fenilo).

En algunas formas de ejecución, R² es hidrógeno.

En algunas formas de ejecución, el compuesto dihidrogenofosfato de pirazolilo es una sal que puede describirse mediante la siguiente fórmula:



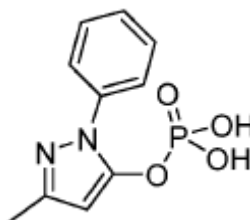
en la que X significa cualquier ion que tenga una carga positiva.

5 En algunas formas de ejecución, X es dos iones positivos monovalentes cualesquiera (p. ej. 2Na^+ , 2K^+ , 2NH_4^+ , etc.).

En algunas formas de ejecución, X es cualquier ion positivo divalente (p. ej. Mg^{2+}).

En algunas formas de ejecución, el compuesto dihidrogenofosfato de pirazolilo es el dihidrogenofosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo:

10



incluidas las sales de los mismos; e incluidas las dos formas enantioméricas R y S y las mezclas racémicas de los mismos.

15

III. Aplicaciones

Algunas formas de ejecución de los compuestos descritos se emplean en combinación con una sal de diazonio. Se contempla que formas de ejecución de los compuestos descritos sean sustratos para una enzima, p. ej. una hidrolasa, tal como una fosfatasa. Se contempla además que en presencia de la fosfatasa alcalina y una sal de diazonio, la fosfatasa alcalina descomponga catalíticamente los fosfatos para generar los compuestos, permitiendo que los compuestos a su vez reaccionen con la sal de diazonio para producir un precipitado coloreada. En algunas formas de ejecución, las sales de diazonio incluyen, pero no se limitan al Fast Red KL (2-(aminocarbonil)-5-metoxibenceno-diazonio), Fast Red B (2-metoxi-4-nitrobenzenodiazonio), Diazo Red RC (tetraclorocincato de 5-cloro-2-metoxibencenodiazonio), Variamine Blue RT (N-fenil-p-fenilendiamina) y Fast Blue BB (tetraclorocincato de 4-(benzoi-amino)-2,5-dietoxibencenodiazonio). En algunas formas de ejecución, el precipitado coloreado es amarillo o dorado, cuando se visualiza en condiciones estándar de microscopio de campo claro. En algunas formas de ejecución, la sal de diazonio es el Fast Blue BB, que en presencia de algunas formas de ejecución de los compuestos descritos y fosfatasa alcalina, proporciona un precipitado coloreado de color dorado o amarillo, cuando se visualiza en condiciones estándar de microscopio de campo claro.

30

Algunas formas de ejecución de los compuestos descritos son útiles para los procesos de hibridación "in situ". La hibridación "in situ" supone poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. secuencia genómica de ácido nucleico diana) en el contexto de una preparación cromosómica en metafase o en interfase (por ejemplo una célula o una muestra de tejido montada sobre un portaobjetos) con a sonda (es decir, la sonda de ácido nucleico diana descrita previamente) hibridable de modo específico con o bien específica de la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana). Opcionalmente, los portaobjetos pueden tratarse previamente, p. ej. para eliminar la parafina u otros materiales presentes en los tejidos inmersos en parafina y fijados con formalina, que pudieran interferir con la hibridación uniforme. La muestra de cromosoma y la sonda se tratan, ambos, por ejemplo por calentamiento, para desnaturalizar los ácido nucleicos de doble hebra. Se combinan la sonda (formulada en un tampón de hibridación adecuado) y la muestra en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que la hibridación tenga lugar (normalmente para alcanzar el equilibrio). Se lava la preparación de cromosoma para eliminar el exceso de sonda de ácido nucleico diana y se lleva a cabo la detección de del marcador específico del cromosoma diana. Se encontrará una descripción general de los procesos de hibridación "in situ" p. ej. en la patente U.S. n° 4,888,278. En la técnica se conocen ya numerosos procedimientos de hibridación "in situ" por fluorescencia (FISH), hibridación "in situ" cromogénica (CISH) y hibridación "in situ" con plata (SISH). Por ejemplo, los procedimientos para llevar a cabo la FISH e han descrito en las patentes U.S. n° 5,447,841, 5,472,842, 5,427,932 y por ejemplo, en Pinkel y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 2934-2938, 1986; Pinkel y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 9138-9142, 1988 y Lichter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 9664-9668, 1988. La CISH se ha descrito p. ej. en Tanner y col., Am. J. Pathol. 157, 1467-1472, 2000 y en la patente U.S. n° 6,942,970. Otros

50

métodos adicionales de detección se describen en la patente U.S. nº 6,280,929. Los procedimientos ilustrativos para la detección de virus por hibridación "in situ" se encontrarán en Poddighe y col., J. Clin. Pathol. 49, M340-M344, 1996.

5 En algunas formas de ejecución, se emplean sondas de ácido nucleico, que se hibridan con una o más secuencias de ácido nucleico diana. En las formas de ejecución de detección directa, las sondas de ácido nucleico pueden conjugarse con una enzima idónea, por ejemplo, con una fosfatasa alcalina. En las formas de ejecución de detección indirecta, las sondas contienen con preferencia un molécula adicional, por ejemplo un hapteno, que se une a un segundo reactivo, por ejemplo un anticuerpo anti-hapteno.

10 Las sondas de ácido nucleico son capaces de hibridarse con una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones adecuadas para la hibridación, como son las condiciones idóneas para la hibridación "in situ", Southern blotting o Northern blotting. En algunas formas de ejecución, la porción de la sonda de detección contiene cualquier ácido nucleico apropiado, por ejemplo RNA, DNA, LNA, PNA o combinaciones de los mismos y puede contener no solo los nucleótidos estándar, tales como los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, sino también los análogos de nucleótidos. El LNA y el PNA son dos ejemplos de análogos de ácido nucleico que forman complejos de hibridación más estables (es decir, que tienen un mayor T_m) que los formados entre DNA y DNA o DNA y RNA. Los análogos de LNA y mPNA pueden combinarse con los nucleósidos de DNA y RNA tradicionales durante la síntesis química para proporcionar moléculas híbridas de ácidos nucleicos, que pueden emplearse como sondas. El uso de los análogos de LNA y PNA permite modificar los parámetros de hibridación, por ejemplo el T_m del complejo de hibridación. Esto permite diseñar las sondas de detección para que se hibriden con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana en condiciones que son las mismas o similares a las condiciones requeridas para la hibridación de la porción de sonda diana con la secuencia de ácido nucleico diana.

25 Las sondas adecuadas de ácido nucleico pueden seleccionarse manualmente o con la asistencia de un algoritmo computerizado que optimice la selección de la sonda en base a los parámetros deseados, por ejemplo la temperatura, la longitud, el contenido de GC, etc. Se dispone de numerosos algoritmos o programas computerizados que pueden descargarse de internet o pueden emplearse en un ordenador personal. Por ejemplo, para generar múltiples regiones de unión a partir de una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana), se identifican las regiones de secuencia desprovistas de secuencia de ácido nucleico repetitiva (u otras indeseables, que generan p. ej. fondo), por ejemplo manualmente o empleado un algoritmo computerizado, por ejemplo el RepeatMasker. Los métodos para crear sondas específicas únicas y sin repeticiones se encontrarán por ejemplo en la publicación de las solicitudes de patente US nº 2001/0051342 y 2008/0057513 y las solicitudes de patente provisional US que llevan el nº de serie 61/291,750 y 61/314,654. Dentro de una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) que abarca varios centenares de kilobases, se identifican normalmente las numerosas regiones de unión que están sustancialmente libres o con preferencia que están completamente libres de secuencias repetitivas de ácido nucleico (o de otras secuencias no deseables, que producen por ejemplo fondo).

40 En algunas formas de ejecución, un hapteno se incorpora a una sonda de ácido nucleico, por ejemplo, empleando un nucleósido haptencilado. Los métodos para conjugar haptenos y otros marcadores con los dNTP (p. ej. para facilitar la incorporación a las sondas marcadas) ya son conocidos en la técnica. En cuando a ejemplos de procedimientos, véase las patentes U.S. nº 5,258,507, 4,772,691, 5,328,824 y 4,711,955. Obviamente, hay numerosos dNTP marcados que son productos comerciales, suministrados por ejemplo por Invitrogen Detection Technologies (Molecular Probes, Eugene, OR). Un marcador puede fijarse directa o indirectamente sobre un dNTP en cualquier ubicación dentro del dNTP, por ejemplo un fosfato (p. ej. fosfato α , β o γ) o un azúcar. Las sondas pueden sintetizarse cualquier método adecuado de síntesis de ácidos nucleicos. En algunas formas de ejecución, las sondas de detección se sintetizan químicamente empleando nucleósidos de fosforamidita y/o análogos de nucleósidos de fosforamidita. Por ejemplo, en algunas formas de ejecución, las sondas se sintetizan empleando nucleósidos de fosforamidita de RNA o DNA estándar. En algunas formas de ejecución, las sondas se sintetizan empleando fosforamiditas de LNA o fosforamiditas de PNA, solas o en combinación con nucleósidos de fosforamiditas estándar. En algunas formas de ejecución, se introducen los haptenos en fosforamiditas abásicas que contienen los restos detectables deseados. Se pueden emplear también otros métodos para la síntesis de las sondas de detección. Por ejemplo, se puede emplear un cebador obtenido a partir de análogos de LNA o una combinación de análogos de LNA y nucleótidos estándar para la transcripción del resto de la sonda. En otro ejemplo, se emplea un cebador que contiene restos detectables para la transcripción del resto de la sonda. En otras formas de ejecución adicionales, se producen segmentos de sonda, por ejemplo por transcripción o por síntesis química y después se ensamblan por ligación enzimática o química.

60 En la porción del resto detectable de la sonda de detección puede emplearse una gran variedad de haptenos. Dichos haptenos incluyen, pero no se limitan a los pirazoles, en particular los nitropirazoles; los compuestos nitrofenilo; los benzofurazanos; los triterpenos; las ureas y las tioureas, en particular las fenil-ureas y de modo más particular todavía las fenil-tioureas; la rotenona y los derivados de rotenona, también llamados rotenoides; el oxazol y los tiazoles, en especial las sulfonamidas del oxazol y tiazol; la y los derivados de cumarina; los ciclolignanos, por ejemplo la podofilotoxina y los derivados de podofilotoxina; y las combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de haptenos incluyen, pero no se limitan al 2,4-dinitrofenilo (DNP), la biotina, los derivados de

65

fluoresceína (FITC, TAMRA, Texas Red, etc.), la digoxigenina (DIG), la 5-nitro-3-pirazolcarbamida (nitropirazol, NP), la 4,5,-dimetoxi-2-nitrocinamida (nitrocinamida, NCA), la 2-(3,4-dimetoxifenil)-quinolina-4-carbamida (fenilquinolona, DPQ), 2,1,3-benzoxadiazol-5-carbamida (benzofurazano, BF), la 3-hidroxi-2-quinoxalinacarbamida (hidroxi-quinoxalina, HQ), la 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (DABSYL), la rotenona-isoxazolina (Rot), la (E)-2-(2-(2-oxo2,3-dihidro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-4-il)fenoxi)acetamida (benzodiazepina, BD), el ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (cumarina 343, DCC), la 2-acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida (tiazolsulfonamida, TS) y la p-metoxifenilpirazopodofilamida (Podo). Estos haptenos y su uso en las sondas se han descrito con mayor detalle en la patente US 7,695,929 de propiedad compartida y en las publicaciones de patente US nº 2008/0305497 y 2008/0057513.

Las sondas hapteniladas se detectan con preferencia con el uso de una proteína anti-hapteno que se une a un antígeno. En algunas formas de ejecución, las proteínas anti-hapteno que se unen a un antígeno están conjugadas con una enzima, por ejemplo con una fosfatasa alcalina. Los ejemplos de moléculas adecuadas que se unen a un antígeno incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos, inmunoglobulinas o moléculas similares a las inmunoglobulinas (incluidas a título de ejemplo y sin limitación, la IgA, IgD, IgE, IgG y la IgM), los fragmentos de anticuerpo por ejemplo los fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab ya conocidos en la técnica, los fragmentos de anticuerpo recombinante (por ejemplo los fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv de cadena simple ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (ya conocidos en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nº 6,015,695; 6,005,079; 5,874,541; 5,840,526; 5,800,988; y 5,759,808). Los ejemplos de conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos anti-DNP, anti-biotina, anti-FITC, anti-DIG, anti-NP, anti-NCA, anti-DPQ, anti-BF, anti-HQ, anti-DABSYL, anti-Rot, anti-BD, anti-DCC, anti-TS y anti-Podo, que están conjugados con una enzima que reacciona con las formas de ejecución de los compuestos descritos. En otras formas de ejecución, el anticuerpo anti-hapteno puede ser un primer anticuerpo que no está conjugado con una enzima. En estas formas de ejecución, un anti-anticuerpo secundario (por ejemplo un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón) que contiene una enzima, que se emplea para generar una señal detectable.

Algunas formas de ejecución de los compuestos descritos son útiles para los procedimientos de la inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica (IHC) es la localización del antígeno o de las proteínas en secciones de tejido mediante el uso de anticuerpos marcados como reactivos específicos por interacciones entre antígeno y anticuerpo que se visualizan con un marcador, por ejemplo un compuesto fluorescente (p. ej. un fluoróforo, un punto cuántico, una partícula fluorescente, etc.), una enzima (p. ej. en combinación con sustratos y cromógenos para la deposición cromogénica), el oro coloidal o un marcador de masa (mass tag). Por ejemplo, un anticuerpo primario se une a un antígeno específico; se une el complejo de anticuerpo y antígeno mediante un anticuerpo secundario, conjugado con una enzima; y en presencia de sustrato y cromógeno, la enzima forma un depósito coloreado en los sitios de la unión entre anticuerpo y antígeno. Los métodos adecuados para la IHC ya son conocidos en la técnica.

En algunas formas de ejecución de detección directa, la enzima está conjugada con un primer reactivo de unión elegido entre una proteína que se fija sobre un antígeno, un ácido nucleico y un hapteno. En algunas formas de ejecución, el primer reactivo de unión es una proteína que se fija sobre el antígeno, por ejemplo un anticuerpo, que es específico de un péptido diana. En algunas formas de ejecución de detección indirecta, se emplea un primer anticuerpo que se une a un péptido diana. El primer anticuerpo se detecta entonces con un segundo anticuerpo que está conjugado con la enzima. En algunas formas de ejecución de detección indirecta, el primer anticuerpo contiene un hapteno y la enzima está conjugada con un anticuerpo anti-hapteno. En estas formas de ejecución, el anticuerpo anti-hapteno se une al primer anticuerpo haptenilado. En otras formas de ejecución de detección indirecta se emplean anticuerpos adicionales. Por ejemplo, en algunas formas de ejecución, el segundo anticuerpo es un anticuerpo de conejo, de ratón o de cabra anti-hapteno y el tercer anticuerpo es un anticuerpo anti-conejo, anti-ratón o anti-cabra conjugado con una enzima, respectivamente. Los ejemplos de engarce adecuado y químicas de unión se han descritos en la publicación de patentes U.S. nº 2006/0246524; 2006/0246523 y la solicitud de patente provisional U.S. nº 60/739,794. Las proteínas que se unen a los antígenos no se limitan a los anticuerpos. Se puede emplear cualquier proteína adecuada de unión a un antígeno. Los ejemplos de moléculas adecuadas de unión a un antígeno incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, inmunoglobulinas o moléculas similares a las inmunoglobulinas (incluidas a título de ejemplo y sin limitación, la IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), los fragmentos de anticuerpo tales como los fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab ya conocidos en la técnica, los fragmentos de anticuerpo recombinante (por ejemplo los fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv de cadena simple ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (ya conocidos en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nº 6,015,695; 6,005,079; 5,874,541; 5,840,526; 5,800,988; y 5,759,808).

Algunas formas de ejecución de los compuestos descritos se emplean en combinación con otras tecnologías de detección, incluidas, pero sin limitarse a ellas, la detección de marcador fluorescente, la detección de punto cuántico, los soles metálicos, los marcadores de masa y otras tecnologías similares. En algunas formas de ejecución se emplean los compuestos en combinación con otros sustratos cromógenos y/o enzimas en aplicaciones multicolores. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a las fosfatasas, por ejemplo la fosfatasa alcalina y

la fosfatasa ácida. Los ejemplos particulares de sustratos enzimáticos y sistemas de sustrato enzimático útiles para los ensayos de detección cromogénica incluyen, pero no se limitan al fosfato de naftol, fosfato de naftol / Fast Red (y variaciones de los mismos, por ejemplo el Fast Red TR / naftol AS, fosfato de naftol / fucsina, Fast Blue BB (tetraclorocincato de 4-(benzoilamino)-2,5-dietoxibencenodiazonio), fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), BCIP/NBT y BCIP/INT.

IV. Kits

Se describen formas de ejecución de kits para la detección de una diana en una muestra biológica. En algunas formas de ejecución, los kits comprenden por lo menos una forma de ejecución de un compuesto dihidrogenofosfato de pirazolilo aquí descrito y una sal de diazonio apropiada. En algunas formas de ejecución, los kits contienen además uno o más reactivos para la detección de la diana. En algunas formas de ejecución, el reactivo de detección es un ácido nucleico conjugado con una enzima, por ejemplo con una fosfatasa alcalina. En algunas formas de ejecución, el reactivo de detección contiene una enzima, por ejemplo una fosfatasa alcalina, conjugada con una proteína que se fija sobre un antígeno específico de un péptido diana. En algunas formas de ejecución, los reactivos de detección permiten la detección indirecta de una diana. Por ejemplo, en algunas formas de ejecución, los reactivos de detección contienen una sonda de ácido nucleico haptenilado y un anticuerpo anti-hapteno conjugado con una enzima, por ejemplo con una fosfatasa alcalina. En algunas formas de ejecución, los kits contienen un primer anticuerpo haptenilado, específico de una diana y un anticuerpo anti-hapteno conjugado con una enzima, por ejemplo con una fosfatasa alcalina. En otras formas de ejecución, los kits contienen un primer anticuerpo haptenilado, específico de una diana, un segundo anticuerpo anti-hapteno, específico del hapteno y un tercer anticuerpo conjugado con una enzima, por ejemplo con una fosfatasa alcalina, dicho tercer anticuerpo es específico del segundo anticuerpo (p. ej. el segundo anticuerpo es un anticuerpo de cabra y el tercer anticuerpo es un anticuerpo anti-cabra). Los expertos podrán ver con facilidad otras combinaciones de detección indirecta. En algunas formas de ejecución, los kits contienen una combinación de reactivos de detección, de tal manera que se puede detectar más de una diana en una muestra (p. ej. para la detección múltiple de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en un tejido).

V. Dianas y sondas

Una molécula de ácido nucleico diana puede ser cualquier ácido nucleico elegido, por ejemplo un DNA o RNA. En algunas formas de ejecución, se detecta el ácido nucleico diana en una célula fijada sobre un portaobjetos. En algunas formas de ejecución, el ácido nucleico diana se detecta en un tejido fijado sobre un portaobjetos.

En formas particulares de ejecución, la secuencia diana es una secuencia diana genómica o una subsecuencia genómica, por ejemplo de un genoma eucariota, por ejemplo un genoma humano. En algunas formas de ejecución, el ácido nucleico diana es el RNA citoplasmático. En algunas formas de ejecución, la molécula de ácido nucleico diana se elige entre un patógeno, por ejemplo un virus, bacteria o un parásito intracelular, por ejemplo un genoma viral. En algunas formas de ejecución, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia genómica, por ejemplo una secuencia genómica eucariota (p. ej. de un mamífero) o viral. Pueden generarse sondas de ácido nucleico diana que correspondan esencialmente a cualquier secuencia de diana genómica, que incluya por lo menos una porción de DNA único no repetitivo. Por ejemplo, la secuencia diana genómica puede ser una porción de un genoma eucariota, por ejemplo un genoma de mamífero (p. ej. humano), fúngico o de parásito intracelular. Como alternativa, una secuencia diana genómica puede ser un genoma procaríota (por ejemplo el genoma de una bacteria) o viral o una porción del mismo. En un ejemplo específico, la secuencia diana genómica está asociada con un organismo infeccioso (p. ej. virus, bacteria, hongo).

En algunas formas de ejecución, la molécula de ácido nucleico diana contiene una secuencia asociada con (p. ej. correlacionada con, implicada causalmente en, etc.) una enfermedad. En algunas formas de ejecución, se elige una secuencia diana asociada con una enfermedad o estado patológico, de tal manera que la detección de la hibridación puede emplearse para extraer información (por ejemplo información diagnóstica o pronóstica del sujeto, del que se ha obtenido la muestra) relativa a la enfermedad o estado patológico. En ciertas formas de ejecución, la molécula elegida de ácido nucleico diana es una molécula de ácido nucleico diana asociada a una enfermedad neoplásica (o cáncer). En algunas formas de ejecución, la secuencia diana genómica incluye por lo menos un gen asociado con el cáncer (p. ej. HER2, c-Myc, n-Myc, Abl, Bcl2, Bcl6, R1, p53, EGFR, TOP2A, MET, IGF1R) o genes que codifican a otros receptores y/o moléculas señalizadores, etc., o una región cromosómica asociada con un cáncer. En algunas formas de ejecución, la secuencia de ácido nucleico diana está asociada con una anomalía cromosómica estructural, p. ej. una translocación, una delección o una reduplicación (p. ej. amplificación de genes o polisomía), que se ha relacionado con un cáncer. En algunas formas de ejecución, la secuencia de ácido nucleico diana abarca una secuencia genómica, que se ha reduplicado o se ha borrado por lo menos en algunas células neoplásicas.

La secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) puede abarcar cualquier número de pares de bases. En algunas formas de ejecución, la secuencia de ácido nucleico diana abarca por lo menos 1000 pares de bases. En algunas formas de ejecución, la secuencia de ácido nucleico diana tiene una longitud por lo menos de 20 pares de bases, una longitud por lo menos de 100 pares de bases, una longitud por lo menos de 1000 pares de bases, una longitud por lo menos de 50.000, por lo menos de 100.000, o incluso una

longitud total por lo menos de 250.000 pares de bases. En los ejemplos específicos, una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. una secuencia genómica de ácido nucleico diana) tiene una longitud por lo menos de 10.000, por lo menos de 50.000, por lo menos de 100.000, por lo menos de 150.000, por lo menos de 250.000, o por lo menos de 500.000 pares de bases (por ejemplo entre 100 kb y 600 kb, entre 200 kb y 500 kb, o entre 300 kb y 500 kb). En los ejemplos, en los que la secuencia de ácido nucleico diana es de un genoma eucariota (por ejemplo un genoma de un mamífero, p. ej. un genoma humano), la secuencia diana representan normalmente una pequeña porción del genoma (o una pequeña porción de un cromosoma individual) del organismo (por ejemplo, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, o menos del 1% del DNA genómico (o de un cromosoma individual) del organismo). En algunos ejemplos, en los que la secuencia diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) es de un organismo infeccioso (por ejemplo de un virus), la secuencia diana puede representar una proporción mayor (por ejemplo, el 50% o más) o incluso todo el genoma del organismo infeccioso.

En los ejemplos específicos no limitantes se elige una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. una secuencia genómica de ácido nucleico diana) asociada con un neoplasma (por ejemplo, un cáncer). En las células neoplásicas se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluidas las translocaciones y otros reordenamientos, reduplicación o delección), en especial en células cancerosas, por ejemplo en leucemias de células B y de células T, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de pulmón (p. ej. cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas), cánceres neurológicos y similares. Por lo tanto, en algunos ejemplos, por lo menos una porción de la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) está reduplicada o borrada por lo menos en un subconjunto de células de una muestra.

Las translocaciones en las que intervienen oncogenes ya son conocidas en varias enfermedades humanas malignas. Por ejemplo, los reordenamientos cromosómicos en los que interviene el gen SYT situado en la región de punto de rotura del cromosoma 18q11.2 son frecuentes entre tumores de tejido blando de sarcoma sinovial. La translocación t(18q11.2) puede identificarse, por ejemplo, empleando sondas con diferentes marcadores: la primera sonda incluye moléculas de ácido nucleico generadas a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende en sentido distal desde el gen SYT y la segunda sonda incluye el ácido nucleico generado a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende desde 3' o en sentido proximal al gen SYT. Cuando se emplean sondas correspondientes a estas secuencias de ácido nucleico diana (p. ej. las secuencias genómicas de ácido nucleico diana) para un procedimiento de hibridación "in situ", las células normales, que carecen de una t(18q11.2) en la región del gen SYT, presentan dos señales de fusión (generadas por los dos marcadores en estrecha proximidad), que reflejan las dos copias intactas del SYT. Las células normales que tienen una t(18q11.2) presentan solamente una señal de fusión.

Se han observado numerosos ejemplos de reduplicación de genes que intervienen en la transformación neoplásica y pueden detectarse citogenéticamente por hibridación "in situ" empleando las sondas descritas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. una secuencia genómica de ácido nucleico diana) incluye un gen (p. ej. un oncogén) que está reduplicado en una o más enfermedades malignas (p. ej. una enfermedad maligna humana). Por ejemplo, el HER2, también conocido como c-erbB2 o HER2/neu, es un gen de desempeña un papel en la regulación del crecimiento celular (una secuencia genómica representativa del HER2 humano se proporciona en el GENBANK™ n° de referencia NC_000017, nucleótidos 35097919-35138441). El gen HER2 codifica un receptor de superficie de células transmembrana de 185 kd, que pertenece al grupo de las tirosina-quinasa. El HER2 se amplifica en los cánceres humanos de mama, de ovarios, de estómago y otros. Por lo tanto, el gen HER2 (o una región del cromosoma 17, que incluye al gen HER2) puede emplearse como secuencia genómica ácido nucleico diana para generar sondas que incluyan moléculas de ácido nucleico con regiones de unión específicas del HER2.

En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. una secuencia genómica de ácido nucleico diana) es un gen supresor tumoral que se borra (se pierde) en las células malignas. Por ejemplo, la región p16 (incluidos los D9S1749, D9S1747, p16(INK4A), p14(ARF), D9S1748, p15(INK4B) y D9S1752) ubicada en el cromosoma 9p21 se borra o se pierde en ciertos cánceres de vejiga. Las delecciones cromosómicas que afectan la región distal del brazo corto del cromosoma 1 (que abarca, por ejemplo, el SHGC57243, TP73, EGFL3, ABL2, ANGPTL1 y SHGC-1322) y la región pericentromérica (p. ej. 19p13-19q13) de cromosoma 19 (que abarca, por ejemplo, al MAN2B1, ZNF443, ZNF44, CRX, GLTSCR2 y GLTSCR1) son rasgos moleculares característicos de ciertos tipos de tumores sólidos del sistema nervioso central.

Por consiguiente, en algunas formas de ejecución se proporcionan conjuntos de sondas de "rotura y despiece" (break-apart). En algunas formas de ejecución, los conjuntos de sondas de "rotura y despiece" comprenden una primera sonda que se hibrida con un lado de un punto de rotura conocido para la translocación cromosómica y una segunda sonda que se hibra con el otro lado del punto de rotura conocido. Se emplean diferentes reactivos de detección cromogénica para cada una de las sondas del conjunto de sondas de rotura y despiece, de manera que puedan detectarse las translocaciones. Los ejemplos de conjuntos de sondas de "rotura y despiece" incluyen, pero no se limitan a los conjuntos de tejido linfóide asociado con mucosa (MALT), la quinasa linfóide anaplásica (ALK), el gen afín al ETS (ERG) y los participantes en reordenamientos afines a andrógenos, por ejemplo el TMPRSS2 (serina-2-proteasa específica de la próstata, regulada por andrógenos), que sugiere un cáncer de próstata.

Los ejemplos mencionados previamente se proporcionan meramente con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Los expertos ya conocen muchas otras anomalías citogenéticas que guardan relación con la transformación y/o crecimiento neoplásicos. Las secuencias de ácido nucleico diana (p. ej. las secuencias genómicas de ácido nucleico diana), que se ha constatado que guardan relación con la transformación neoplásica y que son útiles para los métodos descritos y para los que se han preparado las sondas descritas incluyen también el gen EGFR (7p12; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000007, nucleótidos 55054219-55242525), el gen C-MYC (8q24.21; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000008, nucleótidos 128817498-128822856), D5S271 (5p15.2), el gen de la lipoproteína lipasa (LPL) (8p22; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000008, nucleótidos 19841058-19869049), RB1 (13q14; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000013, nucleótidos 47775912-47954023), p53 (17p13.1; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000017, complemento, nucleótidos 7512464-7531642), N-MYC (2p24; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000002, complemento, nucleótidos 151835231-151854620), CHOP (12q13; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000012, complemento, nucleótidos 56196638-56200567), FUS (16p11.2; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000016, nucleótidos 31098954-31110601), FKHR (13p14; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000013, complemento, nucleótidos 40027817-40138734), así como, por ejemplo: ALK (2p23; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000002, complemento, nucleótidos 29269144-29997936), cadena larga de Ig, CCND1 (11q13; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000011, nucleótidos 69165054... 69178423), BCL2 (18q21.3; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000018, complemento, nucleótidos 58941559-59137593), BCL6 (3q27; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000003, complemento, nucleótidos 188921859-188946169), MALF1, AP1 (1p32-p31; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000001, complemento, nucleótidos 59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000017, complemento, nucleótidos 35798321-35827695), TMPRSS (21q22.3; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000021, complemento, nucleótidos 41758351-41801948), ERG (21q22.3; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000021, complemento, nucleótidos 38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000007, complemento, nucleótidos 13897379-13995289), EWS (22q12.2; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000022, nucleótidos 27994271-28026505); FLI1 (11q24.1-q24.3; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000011, nucleótidos 128069199-128187521), PAX3 (2q35q37; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000002, complemento, nucleótidos 222772851-222871944), PAX7 (1p36.2p36.12; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000001, nucleótidos 18830087-18935219), PTEN (10q23.3; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000010, nucleótidos 89613175-89716382), AKT2 (19q13.1-q13.2; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000019, complemento, nucleótidos 45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000001, complemento, nucleótidos 40133685-40140274), REL (2p13-p12; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000002, nucleótidos 60962256-61003682) y CSF1R (5q33-q35; p. ej. GENBANK™ n° de referencia NC_000005, complemento, nucleótidos 149413051-149473128). Una sonda de ácido nucleico diana o un método aquí descritos pueden incluir una región del correspondiente cromosoma humano que contenga por lo menos uno cualquiera (o más, si procede) de los genes recién mencionados. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana de algunas sondas o métodos descritos incluye uno cualquiera de los genes recién mencionados y una secuencia genómica contigua adicional suficiente (ya sea 5' del gen, ya sea el 3' del gen, o una combinación de los mismos) para un total de por lo menos 100.000 pares de bases (por ejemplo por lo menos 250.000, o por lo menos 500.000 pares de bases) o para un total comprendido entre 100.000 y 500.000 pares de bases.

En ciertas formas de ejecución se ensaya la sonda específica de la molécula de ácido nucleico diana (en la misma muestra o en otra muestra diferente pero similar) en combinación con una segunda sonda que proporciona una indicación del número de cromosomas, por ejemplo una sonda específica de cromosoma (p. ej. un centrómero). Por ejemplo, puede emplearse una sonda específica de una región del cromosoma 17 que contenga por lo menos el gen HER2 (una sonda HER2) en combinación con una sonda del cromosoma 17 (CEP 17) que se hibrida con el DNA alfa-satélite situado en el centrómero del cromosoma 17 (17p11.1-q11.1). La inclusión de la sonda CEP 17 permite determinar el número relativo de copias del gen HER2. Por ejemplo, las muestras normales tendrán una relación HER2/CEP 17 menor que 2, mientras que las muestras en las que el gen HER2 se haya reduplicado tendrán una relación HER2/CEP17 mayor que 2,0. De igual manera pueden emplearse también las sondas de centrómero CEP correspondientes a la ubicación de cualquier otra secuencia diana genómica elegida en combinación con una sonda para una diana única del mismo cromosoma (o de un cromosoma diferente).

En otros ejemplos se elige una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) de un virus o de otro microorganismo asociado con una enfermedad o estado patológico. La detección de la secuencia de ácido nucleico diana derivada del virus - o del microorganismo - (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) de una célula o de una muestra de tejido indica la presencia del organismo. Por ejemplo, la sonda puede elegirse entre el genoma de un virus oncogénico o patógeno, un a bacteria o un parásito intracelular (por ejemplo el *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* y también las especies *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* y *Babesia*).

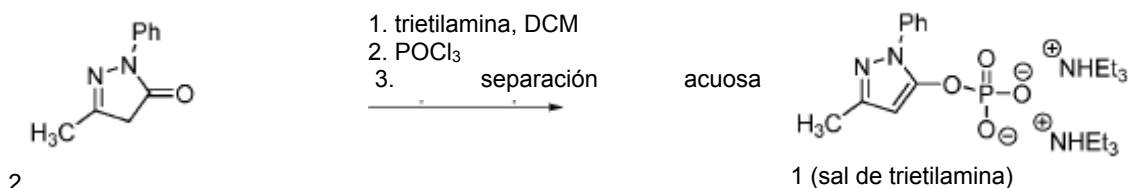
En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. una secuencia genómica de ácido nucleico diana) es un genoma viral. Los ejemplos virus y de las correspondientes secuencias genómicas (GENBANK™ RefSeq n° de referencia entre paréntesis) incluyen el adenovirus A humano (NC_001460), el adenovirus B humano (NC_004001), el adenovirus C humano (NC_001405), el adenovirus D humano (NC_002067), el adenovirus E humano (NC_003266), el adenovirus F humano (NC_001454), el astrovirus humano (NC_001943), el poliomavirus BK humano (V01109; GI:60851) el bocavirus humano (NC_007455), el coronavirus 229E humano (NC_002645), el

5 coronavirus HKU1 humano (NC_006577), el coronavirus NL63 humano (NC_005831), el coronavirus OC43 humano (NC_005147), el enterovirus A humano (NC_001612), el enterovirus B humano (NC_001472), el enterovirus C humano (NC_001428), el enterovirus D humano (NC_001430), el eritrovirus V9 humano (NC_004295), el virus espumado humano (NC_001736), el herpesvirus 1 humano (virus de herpes simple de tipo 1) (NC_001806), el herpesvirus 2 humano (virus de herpes simple de tipo 2) (NC_001798), el herpesvirus 3 humano (virus de la Varicella zoster) (NC_001348), el herpesvirus 4 humano de tipo 1 (virus de Epstein-Barr de tipo 1) (NC_007605), el herpesvirus 4 humano de tipo 2 (virus de Epstein-Barr de tipo 2) (NC_009334), la cepa de herpesvirus 5 humano AD169 (NC_001347), la cepa de herpesvirus 5 humano, cepa Merlin (NC_006273), el herpesvirus 6A humano (NC_001664), el herpesvirus 6B humano (NC_000898), el herpesvirus 7 humano (NC_001716), el herpesvirus 8 humano de tipo M (NC_003409), el herpesvirus 8 humano de tipo P (NC_009333), el virus 1 de la inmunodeficiencia humana (NC_001802), el virus 2 de la inmunodeficiencia humana (NC_001722), el metapneumovirus humano (NC_004148), el papilomavirus-1 humano (NC_001356), el papilomavirus-18 humano (NC_001357), el papilomavirus-2 humano (NC_001352), el papilomavirus-54 humano (NC_001676), el papilomavirus-61 humano (NC_001694), el papilomavirus-cand90 humano (NC_004104), el papilomavirus RTRX7 humano (NC_004761), el papilomavirus humano de tipo 10 (NC_001576), el papilomavirus humano de tipo 101 (NC_008189), el papilomavirus humano de tipo 103 (NC_008188), el papilomavirus humano de tipo 107 (NC_009239), el papilomavirus humano de tipo 16 (NC_001526), el papilomavirus humano de tipo 24 (NC_001683), el papilomavirus humano de tipo 26 (NC_001583), el papilomavirus humano de tipo 32 (NC_001586), el papilomavirus humano de tipo 34 (NC_001587), el papilomavirus humano de tipo 4 (NC_001457), el papilomavirus humano de tipo 41 (NC_001354), el papilomavirus humano de tipo 48 (NC_001690), el papilomavirus humano de tipo 49 (NC_001591), el papilomavirus humano de tipo 5 (NC_001531), el papilomavirus humano de tipo 50 (NC_001691), el papilomavirus humano de tipo 53 (NC_001593), el papilomavirus humano de tipo 60 (NC_001693), el papilomavirus humano de tipo 63 (NC_001458), el papilomavirus humano de tipo 6b (NC_001355), el papilomavirus humano de tipo 7 (NC_001595), el papilomavirus humano de tipo 71 (NC_002644), el papilomavirus humano de tipo 9 (NC_001596), el papilomavirus humano de tipo 92 (NC_004500), el papilomavirus humano de tipo 96 (NC_005134), el virus de parainfluenza 1 humano (NC_003461), el virus de parainfluenza 2 humano (NC_003443), el virus de parainfluenza 3 humano (NC_001796), el parecovirus humano (NC_001897), el parvovirus 4 humano (NC_007018), el parvovirus B19 humano (NC_000883), el virus sincitial respiratorio humano (NC_001781), el rinovirus A humano (NC_001617), el rinovirus B humano (NC_001490), el espumaretrovirus humano (NC_001795), el virus 1 linfotrópico-T humano (NC_001436), el virus 2 linfotrópico-T humano (NC_001488). En ciertos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) es de un virus oncogénico, por ejemplo del virus de Epstein-Barr (EBV) o de un virus de papiloma humano (HPV, p. ej. HPV16, HPV18). En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej. la secuencia genómica de ácido nucleico diana) es de un virus patógeno, por ejemplo de un virus sincitial respiratorio, de un virus de hepatitis (p. ej. del virus de la hepatitis C), de un coronavirus (p. ej. del virus SARS), de un adenovirus, de un poliomavirus, de un citomegalovirus (CMV), o de un virus de herpes simple (HSV).

V. EJEMPLOS

40 Ejemplo 1

Síntesis de la sal de bis-trietilamina del fosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo (1)



45 En un matraz de 100 ml de fondo redondo con varilla agitadora, embudo de adición y septo se introducen 1,05 ml de oxiclورو de fósforo (11,5 mmoles, 2,0 equiv., Fluka 79580) y 5 ml de diclorometano (Sigma). Se purga el matraz con nitrógeno. En un recipiente separado se disuelven 1,0 g de la 3-metil-1-fenil-pirazolin-5-ona (2) (5,7 mmoles, 1,0 equiv., Sigma M70800) y 2,4 ml de trietilamina (17,2 mmoles, 3,0 equiv., Sigma T0886) en 20 ml de diclorometano. Se introduce la mezcla en el embudo de adición y se añade por goteo a la mezcla reaccionante durante un período de 1 hora. Después de 4 horas se elimina el disolvente, se disuelve el residuo en 25 ml de una solución acuosa saturada de carbonato amónico y se agita durante una noche. Se lava la mezcla reaccionante con diclorometano y se concentra la fase acuosa con vacío. Se purifica el material en bruto por HPLC preparativa (mezcla 10:90 de ACN : trietilamina (TEA) al 0,05% en agua, gradiente de 90:10 durante 60 minutos, seguimiento del progreso de la reacción a 254 nm). Se reúnen las fracciones, se congelan y liofilizan, obteniéndose el producto en forma de polvo blanco en un rendimiento del 20%. Los resultados de la RMN son los siguientes. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ = 7,64 (ddd, J = 11,1, 6,0, 4,4 Hz, 2H), 7,40 (ddd, J = 8,3, 4,1, 2,1 Hz, 2H), 7,26 (dd, J = 9,1, 5,9 Hz, 1H), 5,99 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 3,09 (q, J = 7,3 Hz, 8H), 2,19 (d, J = 4,5 Hz, 3H), 1,23 (t, J = 7,3 Hz, 12H). Un ejemplo de traza de la

HPLC se aporta en la figura 10 y las trazas de la resonancia magnética nuclear se ilustran en la figura 11 (H^1) y la figura 12 (C^{13}).

Ejemplo 2

Detección inmunohistoquímica de dianas en tejidos de amígdalas con varias sales de diazonio

La figura 4 contiene una serie de imágenes que presentan la detección IHC de la proteína Ki-67 en tejido de amígdalas visualizadas empleando el compuesto 1 y cinco sales de diazonio diferentes. La tinción IHC se lleva a cabo en un banco de pruebas Benchmark XT con reactivos de Ventana Medical System, Inc., empleando una versión modificada del protocolo estándar de detección con AP Red para la Ki-67. En lo fundamental se incubaba tejido de amígdalas, fijado con formalina y sumergido en parafina, con el anticuerpo primario CONFIRM anti-Ki67 (30-9) (VMSI 790-4286) durante 16 minutos. Se añade el UltraView Universal AP Red Multimer (VMSI 253-4327) y se incuban los tejidos durante 12 minutos más. Se valoran manualmente los reactivos de detección del modo siguiente: se añaden 100 μ l de una solución 10 mM del compuesto 1, inmediatamente después 100 μ l de la solución de la sal de diazonio (5 mM) y a continuación se realiza la incubación durante 12 minutos. Se exploran y evalúan cinco soluciones de sales de diazonio: Fast Red KL, Fast Red B, Diazo Red RC, Variamine Blue RT y Fast Blue BB. Se lavan los portaobjetos en una solución muy diluida de Dawn/agua (una gota de detergente lavavajillas Dawn líquido en 50-100 ml de agua), se secan en la estufa a 55°C durante 15 minutos y se tapan con el cubreobjetos.

Ejemplo 3

Detección inmunohistoquímica de dianas en tejidos de amígdalas con una sal de diazonio ilustrativa

La figura 5 contiene una serie de imágenes que representan la detección IHC de la proteína Ki-67 en tejido de amígdalas visualizada empleando una concentración constante del compuesto 1 (10 mM) y concentraciones variables del Fast Blue BB: 10 mM, 5 mM, 2,5 mM y 1 mM. La tinción IHC se lleva a cabo en un banco de pruebas Benchmark XT con reactivos de Ventana, empleando una versión modificada del protocolo estándar de detección con AP Red para la Ki-67. En lo fundamental se incubaba tejido de amígdalas, fijado con formalina y sumergido en parafina, con el anticuerpo primario CONFIRM anti-Ki67 (30-9) (VMSI 790-4286) durante 16 minutos. Se añade el UltraView Universal AP Red Multimer (VMSI 253-4327) a los tejidos y se incuban los portaobjetos durante 12 minutos más. Se valoran manualmente los reactivos de detección del modo siguiente: se añaden 100 μ l de una solución 10 mM del compuesto 1, inmediatamente después se añaden a los tejidos 100 μ l de la solución del Fast Blue BB (10, 5, 2,5 ó 1 mM) y se incuban los tejidos durante 12 minutos. Se lavan los portaobjetos en una solución muy diluida de Dawn/agua, se secan en la estufa a 55°C durante 15 minutos y se tapan con el cubreobjetos.

Ejemplo 4

Inmunohistoquímica y detección por hibridación "in situ" de dianas en tejidos xenograft

En la figura 7 se representa la detección de dianas múltiples en campo claro en injertos ajenos (xenografts) MCF7 y Calu-3. Se lleva a cabo la tinción de la diana múltiple en un banco de pruebas Benchmark XT con reactivos de Ventana sobre portaobjetos de control de xenograft de HER2 3-en-1 (VMSI 783-4332). Se detecta la proteína diana por IHC empleando en primer lugar el PATHWAY anti-HER-2/neu de Ventana (clon 4B5, VMSI 790-100) y se visualiza con los reactivos de detección AP de color amarillo - dorado descritos previamente. A continuación se detecta el gen diana con la sonda INFORM HER2 DNA (VMSI 780-4332) y se visualiza con el kit de detección UltraView SISH (VMSI 780-001). Se detecta el centrómero del cromosoma 17 con la sonda INFORM Chromosome 17 (VMSI 780-4331) y se visualiza con el kit de detección UltraView Alkaline Phosphatase Red (VMSI 760-501). Se somete el tejido a una tinción de contraste con hematoxilina II (VMSI 790-2208) y con el reactivo llamado Bluing Reagent (VMSI 760-2037), después se lava con Dawn/agua, se seca con aire y se tapa con un cubreobjetos.

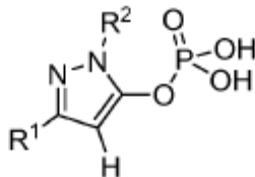
Ejemplo 5

Inmunohistoquímica y detección por hibridación "in situ" de dianas existentes en muestras clínicas humanas

En las figuras 8 y 9 se representa la detección de dianas múltiples en campo claro de dos casos clínicos (gen HER2 no amplificado y amplificado). Se lleva a cabo la tinción de dianas múltiples en un banco de pruebas Benchmark XT con reactivos de Ventana en las dos muestras de tejido de mama clínico. Se detecta la proteína diana por IHC empleando en primer lugar el PATHWAY anti-HER-2/neu de Ventana (clon 4B5, VMSI 790-100) y se visualiza con los reactivos de detección AP de color amarillo - dorado descritos previamente. A continuación se detecta el gen diana con la sonda INFORM HER2 DNA (VMSI 780-4332) y se visualiza con el kit de detección UltraView SISH (VMSI 780-001). Se detecta el centrómero del cromosoma 17 con la sonda INFORM Chromosome 17 (VMSI 780-4331) y se visualiza con el kit de detección UltraView Alkaline Phosphatase Red (VMSI 760-501). Se somete el tejido a una tinción de contraste con hematoxilina II (VMSI 790-2208) y con el reactivo llamado Bluing Reagent (VMSI 760-2037), después se lava con Dawn/agua, se seca con aire y se tapa con un cubreobjetos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto descrito mediante la siguiente fórmula:



5

incluidas las sales del mismo; e incluidas las dos formas enantioméricas R y S y las mezclas racémicas del mismo; en el que R¹ se elige entre el grupo formado por hidrógeno, halógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo; y en el que R² se elige entre el grupo formado por hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo.

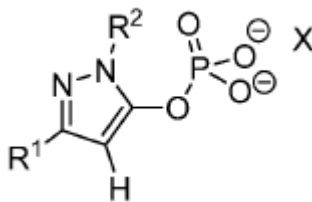
10

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho halógeno se elige entre el grupo formado por cloro, flúor, bromo e yodo.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es CH₃, o en el que R² es fenilo.

15

4. El compuesto de la reivindicación 1, dicho compuesto se describe mediante la siguiente fórmula:



20

en la que X es dos cationes monovalentes o un catión divalente.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que dicho catión monovalente se elige entre el grupo formado por hidrógeno, Na⁺, K⁺ o NH₄⁺, o en el que dicho catión divalente es el Mg²⁺.

25

6. Un kit que contiene el compuesto de la reivindicación 1; y una sal de diazonio.

7. El kit de la reivindicación 6, que contiene además una enzima que descompone catalíticamente dicho compuesto, opcionalmente en el que dicha enzima es una fosfatasa.

30

8. El kit de la reivindicación 7, en el que dicha enzima está conjugada con un hapteno, o con una proteína que se fija sobre un antígeno, o con un ácido nucleico.

9. El kit de la reivindicación 8, en el que dicha proteína que se fija sobre un antígeno es una proteína anti-hapteno que se fija sobre un antígeno.

35

10. Un método de detección de una diana en una muestra biológica que consiste en: poner en contacto dicha muestra con un reactivo de detección que contiene una fosfatasa, que descompone catalíticamente al compuesto según la reivindicación 1, dicho reactivo de detección se une directa o indirectamente a dicha diana, y una sal de diazonio, dicha fosfatasa descompone dicho compuesto en presencia de dicha sal de diazonio para producir un compuesto coloreado; y detectar la presencia de dicho compuesto coloreado.

40

11. El kit de la reivindicación 6, o el método de la reivindicación 10, en los que dicha sal de diazonio es el tetraclorocincato de 4-(benzoilamino)-2,5-dietoxibencenodiazonio (Fast Blue BB).

45

12. El método de la reivindicación 10, en el que dicha diana es un ácido nucleico o una proteína.

13. El método de la reivindicación 10, en el que dicho reactivo de detección contiene un primer reactivo de unión conjugado con dicha fosfatasa.

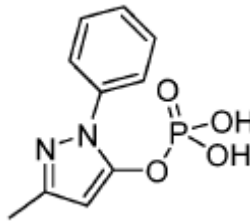
50

14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho primer reactivo de unión se elige entre el grupo formado por una proteína que se fija sobre un antígeno, un ácido nucleico y un hapteno.

5 15. El método de la reivindicación 14, en el que dicho reactivo de detección contiene una fosfatasa conjugada con un ácido nucleico, dicha diana es un ácido nucleico y dicho reactivo de detección se hibrida con dicha diana, o en el que dicho reactivo de detección contiene una fosfatasa conjugada con una proteína que se fija sobre un antígeno, dicha diana es una proteína y dicho reactivo de detección se une a dicha diana.

10 16. El método de la reivindicación 14, en el que dicho reactivo de detección se une indirectamente a dicha diana y dicho reactivo de detección contiene una fosfatasa conjugada con una proteína que se fija sobre un antígeno específico de un hapteno.

17. El compuesto de la reivindicación 1, o el kit de la reivindicación 6, o el método de la reivindicación 10, en los que dicho compuesto es:



15