

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 477**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/DK2012/000119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO2013068011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12848367 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2788757**

54 Título: **Nuevo método para la evaluación de una diana en una muestra histológica**

30 Prioridad:

08.11.2011 US 201161556916 P
08.11.2011 WO PCT/DK2011/000131

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

DAKO DENMARK A/S (100.0%)
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es:

LOHSE, JESPER;
JENSEN, KRISTIAN;
JØRGENSEN, RIKKE, MALENE;
HOFF, KIRSTEN, DAMGAARD y
JACOBSEN, LARS, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 613 477 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

Nuevo método para la evaluación de una diana en una muestra histológica

Campo de la invención

5 La presente invención se encuentra en el campo de la visualización y cuantificación de dianas inmovilizadas en muestras usando medios inmunoquímicos. En particular, la invención se refiere a un método y a reactivos para la detección, visualización y cuantificación de una diana molecular en muestras histológicas inmunoteñidas usando composiciones particulares del agente de unión específica de diana. Los métodos y las composiciones de la invención son adecuados para cualquier ensayo que use un sistema de visualización de dianas en muestras histológicas basándose en la detección de la diana por el agente de unión específica a la diana. Los métodos y las composiciones son útiles para la evaluación de dianas que son biomarcadores de enfermedades en el diagnóstico médico.

Antecedentes de la invención

15 En el campo de la inmunohistoquímica, IHC, las dianas biológicas de interés se tiñen normalmente con colorantes generados enzimáticamente. Sin embargo, la mayor parte de los sistemas enzimáticos para IHC actuales tienen una capacidad de utilización limitada para la visualización de dianas debido a su sensibilidad restringida: si una diana es de una abundancia muy baja, la cantidad de colorante depositado permanece indetectable. Asimismo, hay un límite de detección superior por encima del cual una deposición de colorante adicional no conduce a tinciones más intensas de manera detectable. Usando una menor concentración de reactivos, el límite de detección superior puede verse comprometido para permitir la diferenciación entre dianas de abundancia alta y muy alta; sin embargo, esto también conduce a un aumento del límite de detección inferior, es decir la pérdida de sensibilidad de detección. Por tanto, la mayor parte de los sistemas actuales tienen un intervalo de detección dinámico limitado. Además, diferencias en la sensibilidad entre diferentes sistemas de visualización del mismo proveedor o de diferentes proveedores hace que resulte difícil la comparación de la tinción.

25 Un reto adicional es la cuantificación de diana teñidas de manera inmunoquímica debido a que la deposición de colorante no es una función lineal de la concentración de diana. Alrededor de la línea base del límite de detección la intensidad aumenta rápidamente como una función directa de la concentración de diana (ya que el paso de una señal no detectable a una señal, incluso de una baja intensidad, representa un aumento infinito. A la inversa, cerca del límite de detección superior, incluso un gran aumento de la concentración de diana conducirá a un aumento prácticamente imperceptible de la señal que ya era intensa.

30 Surge una complicación adicional del hecho de que no existen patrones reconocidos internacionalmente, y es difícil preparar muestras de referencia invariables. Incluso secciones en serie de la misma muestra de tejido presentan habitualmente variación biológica. Las líneas celulares inmortales podrían proporcionar en principio el material de referencia infinito, sin embargo diferencias en las condiciones de cultivo, ciclos de ciclos celulares y variación biológica también conducirán en este caso a cierta variación entre lotes en la expresión de dianas. Pueden usarse portaobjetos de vidrio modificados químicamente con péptidos o proteínas como dianas sustitutas, sin embargo la comparación con muestras de tejido no es sencilla.

Por tanto, existe la necesidad de la detección cuantitativa normalizada de dianas inmovilizadas en muestras biológicas.

40 Métodos descritos recientemente de tinción inmunoquímica de dianas inmovilizadas en muestras biológicas, incluyendo muestras histológicas, (documentos WO2010094284, WO2010094283, WO201047680, WO2012143010) proporcionan un sistema de visualización caracterizado por una sensibilidad extrema, de manera que pueden visualizarse y detectarse unidades individuales de la diana, lo que también permite una cuantificación precisa de la diana (tal como se describe en los documentos WO2012075028, WO2012062318), ya que la cantidad de colorante depositado está en correlación lineal con la expresión de la diana. Sin embargo, estos últimos métodos de visualización debido a su sensibilidad extrema, pueden tener desventajas en algunos casos, por ejemplo los métodos son aplicables de la mejor manera para la visualización de una subfracción de una diana en la muestra, pero no de todo el intervalo de expresión. Esta desventaja puede ser un obstáculo para el uso generalizado de los métodos para la visualización de dianas en muestras histológicas, especialmente cuando se refiere a la robustez del procedimiento y la reproducibilidad de los resultados. Además, la cuantificación precisa de una diana según los métodos puede ser laboriosa. La presente invención resuelve los problemas mencionados anteriormente.

Sumario de la invención

55 El uso de reactivos y métodos desarrollados recientemente que permiten detectar todas o sustancialmente todas las unidades de diana en muestras histológicas, por ejemplo tal como se describe en los documentos WO2010094284, WO2010094283, WO201047680 o WO2012143010, aunque tienen ventajas con la tinción inmunoquímica de dianas presentes en las muestras a niveles de expresión de bajos a medios, también pueden asociarse con inconvenientes tales como tinción excesiva de muestras con dianas presentes a niveles abundantes. Puede ser difícil evaluar, cuantificar y la distribución de dianas abundantes en las muestras y comparar diferentes muestras histológicas que

comprenden la misma diana. Para reducir la señal específica de diana en tales muestras, estos métodos utilizan cantidades muy bajas de agentes de detección específicos de diana, tales como agentes de unión específica de diana, por ejemplo reactivos de anticuerpos. Este enfoque permite reducir la señal específica de diana, pero también hace que la detección de la diana vulnerable a diferentes condiciones y resultados de la evaluación de diana no sea totalmente fiable, especialmente, cuando la precisión de la evaluación es crucial, por ejemplo en diagnósticos médicos.

La presente invención se refiere a un método para la detección, visualización y cuantificación de dianas en muestras, en particular, dianas moleculares, tales como marcadores biológicos de enfermedades, en el que se inmoviliza la diana en o dentro de un soporte sólido. En particular, la invención se refiere a la detección y evaluación de la expresión de la diana en muestras histológicas. La presente invención resuelve los problemas técnicos de los sistemas de detección extremadamente sensibles y potentes mencionados que emplean la inmunotinción de dianas en muestras histológicas. En particular resuelve el problema de la generación de señal específica de diana excesiva producida debido a la amplificación superpoderosa de la señal, y el problema de la insuficiente robustez de los sistemas debido a la necesidad de usar cantidades muy bajas de agentes de detección específicos de diana, proporcionando un método y reactivos que hace que estos sistemas de detección sean robustos sin comprometer sus ventajas.

Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un método para detectar una diana en un sitio diana en una muestra histológica, en el que el sitio diana comprende una pareja de unión para un agente de unión, que comprende

- a) incubar la muestra que comprende presuntamente la diana en uno o más sitios diana en un medio de incubación que comprende un agente de unión que puede unirse de manera específica a la pareja de unión comprendida en dichos uno o más sitios diana, en el que la cantidad del agente de unión en el medio de incubación es suficiente para unirse sustancialmente a todas las unidades de la pareja de unión presente en la muestra, y en el que el agente de unión se caracteriza porque comprende primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión, en el que las primeras moléculas de unión comprenden una parte de unión y una parte detectable, y las segundas moléculas de unión comprenden una parte de unión, en el que la parte de unión de las moléculas de unión tanto primeras como segundas puede unirse de manera específica a la pareja de unión y competir por dicha unión, y en el que las segundas moléculas de unión no comprenden una parte que es sustancialmente idéntica a la parte detectable de las primeras moléculas de unión;
- (b) detectar la parte detectable de las primeras moléculas de unión en la muestra, detectando de ese modo la diana en los sitios diana.

Se da a conocer un kit de partes que comprende una composición que comprende un agente de unión que puede unirse de manera específica a la pareja de unión comprendida en dichos uno o más sitios diana, en el que la cantidad del agente de unión es suficiente para unirse sustancialmente a todas las unidades de la pareja de unión presente en la muestra, y en el que el agente de unión se caracteriza porque comprende primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión, en el que las primeras moléculas de unión comprenden una parte de unión y una parte detectable, y las segundas moléculas de unión comprenden una parte de unión, en el que la parte de unión de las moléculas de unión tanto primeras como segundas puede unirse de manera específica a la pareja de unión y competir por dicha unión, y en el que las segundas moléculas de unión no comprenden una parte que es sustancialmente idéntica a la parte detectable de las primeras moléculas de unión.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ensayo para la evaluación de una diana en una muestra histológica, que comprende una etapa de detección de la diana en una muestra histológica según el método de la invención.

Una ventaja de la invención es que los métodos y kits pueden implementarse para cualquier método para la visualización de dianas en muestras histológicas basándose en el uso de agentes de unión específica de diana para la detección y visualización de la diana.

Otra ventaja es que los métodos de la invención permiten identificar y contar unidades individuales de una diana en una muestra histológica y, permiten determinar la cantidad tanto absoluta como relativa de la diana de manera repetidamente precisa e independientemente del nivel de expresión de la diana. Esto resulta ser una ventaja particular para la cuantificación de dianas de diagnóstico o terapéuticas tales como receptores de factores de crecimiento, por ejemplo Her2 o similar, y por tanto, no puede sobrevalorarse la utilidad de los presentes métodos en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

La invención permite obtener la señal específica de diana de cualquier intensidad deseada, lo que hace que su uso en combinación con nuevos métodos de visualización de dianas potentes sea importante para la implementación satisfactoria de estos métodos de visualización en diagnósticos médicos, cuyos patrones y sistemas de puntuación se han desarrollado basándose en la evaluación de señales específicas de diana producidas en muestras histológicas por sistemas de visualización mucho menos sensibles y cualificados.

La idoneidad de la invención para la evaluación tanto manual como automática de la cantidad de una diana en

muestras es una característica valiosa adicional.

Los métodos también pueden aplicarse a cualquier muestra que comprende una diana inmovilizada en/dentro de un soporte sólido que puede detectarse mediante un agente de unión que tiene afinidad por esa diana. Por tanto, prácticamente cualquier diana inmovilizada que tiene una pareja de unión por afinidad, tal como por ejemplo una molécula química y biológica, partícula, microorganismo, etc., puede detectarse y cuantificarse de manera precisa mediante los métodos de la invención.

Descripción de los dibujos

La figura 1 demuestra realizaciones no limitativas seleccionadas de la invención.

La figura 2 muestra imágenes representativas de células positivas para Her2 1+ (A y C) y 2+ (B y D) inmunoteñidas para Her2 usando el sistema de visualización HRP-DAB (Envision™) y puntuadas según HercepTest™, en las que las muestras se incubaron con un agente de unión que consistía sólo en primeras moléculas de unión de la invención (A y B) y un agente de unión que consistía tanto en las primeras moléculas de unión como en las segundas moléculas de unión (C y D). Los procedimientos de detección y visualización de dianas correspondientes se describen en el ejemplo 3: experimento 4.

Descripción detallada de la invención

1. Método

Un aspecto de la invención se refiere a un método para detectar una diana en un sitio diana en una muestra histológica, en el que el sitio diana comprende una pareja de unión para un agente de unión, que comprende

a) incubar la muestra que comprende presuntamente la diana en uno o más sitios diana en un medio de incubación que comprende un agente de unión que puede unirse de manera específica a la pareja de unión comprendida en dichos uno o más sitios diana, en el que la cantidad del agente de unión es suficiente para unirse sustancialmente a todas las unidades de la pareja de unión presente en la muestra, y en el que el agente de unión se caracteriza porque comprende primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión, en el que las primeras moléculas de unión comprenden una parte de unión y una parte detectable, y las segundas moléculas de unión comprenden una parte de unión, en el que la parte de unión de las moléculas de unión tanto primeras como segundas puede unirse de manera específica a la pareja de unión y competir por dicha unión, y en el que las segundas moléculas de unión no comprenden una parte que es sustancialmente idéntica a la parte detectable de las primeras moléculas de unión;

(b) detectar la parte detectable de las primeras moléculas de unión en la muestra, detectando de ese modo la diana en los sitios diana;

Otro aspecto de la invención se refiere a un ensayo para la evaluación de una diana en una muestra, en particular, una muestra histológica, que comprende una etapa de detección de la diana en un sitio diana de la muestra según el método de la invención.

A continuación se describen diferentes realizaciones de la invención tal como se estableció anteriormente y se ilustra mediante ejemplos de trabajo no limitativos descritos en la sección de ejemplos.

Muestra

El término "muestra" significa una parte representativa o un elemento individual de un todo o grupo más grande, una cantidad o porción de una materia o un objeto que contiene supuestamente una diana de interés, por ejemplo una porción o cantidad de material biológico que comprende una molécula diana, partícula, estructura que va a analizarse, por ejemplo una muestra de tejido corporal, tal como una muestra de biopsia, una muestra de sangre, etc. Una muestra típica muestra cómo es o debe ser el resto de la materia o el objeto. En una realización preferida, una muestra de la invención es una muestra histológica.

Ejemplos no limitativos de una muestra histológica en el contexto de la presente invención pueden ser los siguientes:

1. una muestra que comprende células en suspensión y/o residuos celulares, por ejemplo muestra de sangre, suspensión de células clonadas, homogeneizado de tejido corporal, etc.;
2. una muestra que comprende células intactas o dañadas de un cuerpo de animal, un tejido, frotis o líquido corporal o una muestra de un tumor, por ejemplo una muestra de biopsia; Puede ser una muestra fresca de tejido o muestra conservada de tejido, por ejemplo una muestra de tejido incrustada en parafina y fijada con formalina;
3. una muestra que comprende un organismo vivo, por ejemplo una muestra de un medio que comprende un animal, una planta, bacteria, hongos, etc.;

4. una muestra que comprende partículas virales, residuos de las mismas, o productos virales, por ejemplo, un frotis corporal que comprende ácidos nucleicos, proteínas, péptidos virales, etc.;
5. una muestra que comprende un/os orgánulo(s) celular(es);
6. una muestra que comprende moléculas biológicas naturales o recombinantes, por ejemplo muestra de plasma sanguíneo, medios de cultivo celular condicionados, etc.
7. una muestra que comprende células vegetales o residuos de las mismas.

La invención se refiere a muestras que comprenden una diana inmovilizada, es decir a muestras, en las que se impide la libertad de movimiento de la diana durante un procedimiento de detección de la presente invención, por ejemplo muestras, en las que el movimiento de la diana se reduce sustancialmente o se elimina mediante medios mecánicos o químicos, como por ejemplo en caso de muestras o dianas adheridas a o dentro de un determinado soporte o medio. Por tanto, una muestra que comprende unidades individuales únicas de una diana de interés puede inmovilizarse en una realización sobre un soporte sólido antes del procedimiento de detección, por ejemplo una muestra de tejido corporal sólido inmovilizada en un portaobjetos de vidrio. Los ejemplos de muestras que comprenden dianas inmovilizadas de la invención incluyen, pero no se limitan a, muestras de tejido corporal inmovilizadas en portaobjetos de vidrio o plástico; o muestras que comprenden moléculas biológicas o químicas inmovilizadas sobre membranas, etc. Una diana de una muestra en estas realizaciones puede inmovilizarse o bien dentro de la muestra, por ejemplo una proteína fijada dentro de una muestra de tejido, o bien se inmoviliza en la superficie o dentro de determinado material, tal como por ejemplo una porción de un material sólido o un gel tal como una membrana de nitrocelulosa, etc. En una realización, el soporte sólido puede ser una estructura tridimensional, por ejemplo un bloque de colágeno o agar o similar. En esta realización una diana, por ejemplo molécula o partícula puede inmovilizarse dentro de la estructura. El término "soporte sólido" significa un trozo de cualquier material que es insoluble en las condiciones de los procedimientos según la invención, por ejemplo puede ser una membrana de nitrocelulosa, un portaobjetos de vidrio, etc. Los ejemplos de soportes adecuados para inmovilizar muestras y/o dianas incluyen, pero no se limitan a, soportes de polímero sintético, tales como poliestireno, polipropileno, poliestireno sustituido, por ejemplo poliestireno aminado o carboxilado; poliacrilamidas; poliamidas; poli(cloruro de vinilo).; vidrio; agarosa; nitrocelulosa; nailón; poli(fluoruro de vinilideno); nailón modificado en superficie, etc. La invención se refiere a un soporte sólido que es químicamente inerte en las condiciones descritas en el presente documento, es decir el soporte elegido no puede tener ninguna influencia importante sobre los resultados de detección mediante el método. Por consiguiente, puede seleccionarse cualquiera de tales soportes inertes adecuados para inmovilizar una muestra o diana que se ajustan al formato de ensayo elegido, por ejemplo para IHC, ELISA, transferencia, etc.

La invención también puede aplicarse a muestras ambientales, por ejemplo una muestra de un suelo o una muestra de un vertido; muestras de alimentos; muestras de una biblioteca de moléculas orgánicas; muestras de entornos de guerras.

En una realización, la invención se refiere a una muestra (como cualquiera de las anteriores) que no comprende la diana, es decir una muestra de control negativo. En otra realización, la invención se refiere a una muestra que supuestamente comprende la diana, es decir una muestra de prueba. En una realización, la invención se refiere a una muestra que comprende una cantidad predeterminada de la diana de interés, es decir una muestra de referencia. En una realización, la muestra de referencia es una muestra histológica, por ejemplo una muestra que comprende células que expresan determinados niveles de la diana de interés, por ejemplo una proteína diana o ácido nucleico diana. Puede preferirse que la muestra de referencia se trate o pretrate de la misma manera que la muestra de prueba y la cantidad de diana en la muestra de referencia se determine según el método de la invención.

Diana

El término "diana" significa en el presente contenido un objeto de interés supuestamente presente en una muestra que puede caracterizarse por características físicas y/o funcionales particulares. En el contexto de la invención, el término "diana" se refiere a la combinación completa de entidades sustancialmente idénticas de ese objeto, no a una entidad individual de ese objeto en una muestra; en muestras en las que una diana está representada por la única entidad individual, esta única entidad individual de diana se entiende como diana (es decir, la combinación completa de diana). El término "sustancialmente idénticas" en el presente contexto significa que todas o sustancialmente todas las entidades individuales de la diana en una muestra presentan una o más características que hacen que sean reconocibles como la diana. Por ejemplo, la diana puede ser una proteína particular, incluyendo todas las moléculas de esa proteína particular en una muestra; una diana de la invención puede ser un complejo molecular o estructura particular incluyendo sustancialmente todos los objetos de la muestra que comprenden ese complejo molecular o estructura molecular particular; otro ejemplo de una diana de la invención puede ser una partícula viral o una bacteria, en la que la población total de esas partículas virales o esas bacterias de la muestra es la diana.

Objetos biológicos tales como moléculas, complejos moleculares, estructuras moleculares, partículas u organismos que están asociados con rasgos que son característicos para un tipo de célula, tejido, estructura celular, estado fisiológico particular, etc., se denominan "marcadores biológicos" de ese tipo de célula, tejido, estructura celular o

estado fisiológico particular. Los ejemplos no limitados de tales marcadores biológicos, que pueden ser dianas de la invención, incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos, proteínas u otras moléculas biológicas particulares, por ejemplo hidratos de carbono o lípidos, estructuras cromosómicas o de membrana, virus, bacterias, microorganismos, etc. En algunas realizaciones de la invención, el término “diana” se usa de manera intercambiable con el término “marcador biológico” y se refiere a una molécula, un complejo molecular, una estructura o partícula que es característica para un tipo de célula, tejido, estado fisiológico particular, etc., en el que la población total de cualquiera de estos últimos marcadores biológicos en la muestra de prueba se considera que es la diana.

En una realización, la diana puede ser una proteína, por ejemplo un receptor de membrana celular o una proteína citoplasmática, en otra realización la diana puede ser un ácido nucleico, por ejemplo un ácido nucleico citoplasmático. Derivados de cualquiera de las dianas que acaban de mencionarse, por ejemplo fragmentos, precursores, mutantes de proteínas o ácidos nucleicos diana, etc. también pueden ser dianas en algunas realizaciones de la invención.

Entre las dianas contenidas en muestras químicas y ambientales puede haber diferentes contaminantes, toxinas, sustancias para guerras, miembros de bibliotecas moleculares, compuestos de desecho industriales nocivos, etc.

En una realización, la invención se refiere a unidades individuales de dianas que en diferentes realizaciones pueden estar representadas por moléculas individuales completas de dianas o fragmentos de dichas moléculas individuales de dianas, o estructuras moleculares, partículas individuales, etc.

Mediante el término “unidad individual de diana” quiere decirse una cantidad individual de diana que puede considerarse como la totalidad en el cálculo y que, en algunas realizaciones, puede presentar una función particular (que es también la función de la diana en su totalidad). El término “individual” en el presente contenido significa una unidad de diana en contraposición con o a diferencia de muchas, por ejemplo una molécula de proteína de la proteína diana, es decir una molécula de pluralidad moléculas de la misma clase.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una unidad individual de diana, en la que dicho unidad individual es una parte de una molécula diana, por ejemplo un epítipo, un dominio estructural o funcional de una molécula de proteína, o similar.

En una realización preferida, la diana es un marcador biológico relacionado con cáncer, por ejemplo ácidos nucleicos y polipéptidos de hormonas y factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de adhesión celular, moléculas de transducción de señales, moléculas de regulación del ciclo celular, etc., por ejemplo genes, ARN y proteínas del grupo que incluye los factores de crecimiento PDGF, VEGF, TGF, HGF o EGF, sus receptores y las moléculas relacionadas con rutas, genes y sus productos que están relacionados con rutas de transducción de señales, por ejemplo la ruta de *JAK/STAT* o la ruta de supervivencia celular de *Akt/PKB*, o la ruta de 5-FU, el receptor de estrógenos ER y su gen (*ERS1*), etc. En una realización preferida, la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico, tales como los genes, moléculas de ARN y moléculas de proteína de la familia de receptores ErbB. Se contemplan moléculas de proteína, agregados de dichas moléculas, genes, ARN, fragmentos de genes, proteínas y ARN, dominios estructurales y funcionales de los mismos como dianas de la invención.

La invención permite detectar, visualizar y cuantificar unidades individuales únicas de una diana presente en una muestra histológica en un amplio intervalo dinámico, incluyendo cuantificar unidades de diana individuales. Pueden visualizarse dos o más dianas diferentes en una o la misma muestra, por ejemplo una diana proteica y diana de ácido nucleico, o dos o más dianas proteicas diferentes, o dos o más dianas de ácido nucleico diferentes, etc.

Según la invención, las unidades de diana inmovilizadas están ubicadas en sitios diana diferenciados de una muestra. El sitio diana puede comprender una unidad de diana individual o puede comprender una unidad de diana individual que está asociada directa o indirectamente con uno o más sustancias, por ejemplo una unidad de diana unida directa o indirectamente a uno o más sustancias, por ejemplo una unidad de la diana unida a una molécula de anticuerpo primario, o anticuerpo primario unido a un hapteno conjugado con una unidad de la diana, o un anticuerpo secundario unido a cualquiera de estos anticuerpos primarios, o similar. Las unidades de diana ubicadas en sitios diana de la muestra o sustancias asociadas con las unidades de diana, que pueden detectarse mediante la unidad de diana o los agentes de unión específica de sustancia de la invención se denominan en el presente documento “parejas de unión” de agentes de unión correspondientes. En una realización, la invención se refiere a dianas, y/o sustancias asociadas con dianas que son los primeros miembros de pares de unión específica, en las que los segundos miembros son los agentes de unión específica a la diana o sustancia (de manera correspondiente), es decir las dianas y/o sustancias son parejas de unión específica para los agentes de unión correspondientes.

Agente de unión

El término “agente de unión” en el contexto de la presente invención se refiere a sustancias que pueden unirse de manera específica a otra sustancia presente en una muestra de prueba tal como su pareja de unión presente en un sitio diana de una muestra; preferiblemente, la pareja de unión produce un par de unión específica con su pareja de unión en la muestra, en el que dicho par de unión específica puede caracterizarse por un valor particular de la constante de disociación (Kd). Se conocen en la técnica varios pares de unión específica diferentes, estos son los

pares de dos moléculas diferentes que pueden unirse de manera específica entre sí. Se comentan a continuación ejemplos no limitativos de pares de unión específica adecuados para la invención.

5 En una realización, el agente de unión puede ser un miembro de un par de unión específica con la diana en una muestra. En otra realización, el agente de unión puede ser un miembro de un par de unión específica con una sustancia que está asociada directa o indirectamente con la diana en una muestra.

10 En particular, los agentes de unión de la invención pueden unirse directamente y de manera específica a sus parejas de unión presentes en sitios diana de la muestra. El término "unirse de manera específica" significa, en una realización, que la unión agente de unión-pareja de unión tiene afinidad definida por el valor de K_d correspondiente. Algunos ejemplos de unión por afinidad que ilustran esto último pueden ser la unión anticuerpo primario-antígeno; en otra realización, "unirse de manera específica" puede referirse a la unión de dos secuencias de nucleótidos complementarias en las condiciones de rigurosidad comentadas a continuación.

15 El agente de unión de la invención está representado por dos poblaciones de moléculas de unión denominadas en el presente documento primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión. Según la invención, las moléculas de unión tanto primeras como segundas pueden unirse de manera específica y directa a la misma pareja de unión presente en un sitio de unión de la muestra, en el que la pareja de unión es una diana o una sustancia asociada con la diana en un sitio diana de la muestra. Según la invención, las moléculas de unión primeras y segundas pueden inhibir entre sí la unión específica a la pareja de unión. Esto significa que las primeras moléculas de unión y las segundas moléculas de unión comprendidas en un agente de unión o bien tienen afinidad por la misma unidad individual de la pareja de unión en la muestra (por ejemplo el mismo epítipo o hapteno, o similar) e inhiben de manera competitiva entre sí la unión a dicha pareja de unión, o bien tienen afinidad por diferentes unidades individuales de la pareja de unión (por ejemplo diferentes epítopos, o haptenos o similares) estando las unidades individuales diferentes ubicadas dentro de la molécula de pareja de unión de modo que la unión de una molécula de unión a la primera de las unidades individuales diferentes puede impedir la unión de la otra molécula de unión a la segunda de las unidades individuales diferentes, por ejemplo por motivos de impedimento estérico. El término "inhibir la unión" significa en el presente contenido que una molécula de unión del agente de unión tiene la capacidad de reducir la interacción de otra molécula de unión del agente de unión con la unidad individual de la pareja de unión (o unidad individual de una sustancia que está asociada con la diana) y formar un par de unión específica con la misma. Por consiguiente, la primera molécula de unión y la segunda molécula de unión en una realización tienen afinidad por la misma unidad individual (por ejemplo, el mismo epítipo) de la misma pareja de unión, en otra realización, la primera molécula de unión tiene afinidad por una primera unidad individual de una pareja de unión (por ejemplo, el primer epítipo) y la segunda molécula de unión tiene afinidad por otra unidad individual de la misma pareja de unión (por ejemplo, un segundo epítipo), en la que la primera unidad individual y la segunda unidad individual están ubicadas dentro de la pareja de unión de modo que la unión a la primera unidad individual impide la unión a la segunda unión unidad y viceversa. Esto último es también válido en realizaciones en las que la unidad individual de una pareja de unión es una molécula, estructura, partícula individual completa, etc.; entonces, en una realización, las moléculas de unión primeras y segundas pueden impedir entre sí la unión a dicha molécula, estructura, partícula etc.; en otra realización, las moléculas de unión pueden impedir entre sí la unión a dos unidades individuales únicas de dicha pareja.

40 Según la invención, moléculas de unión primeras y segundas comprendidas en el agente de unión son similares en que ambas comprenden una parte ("parte de unión") que puede unirse de manera específica a una única unidad individual de la pareja de unión presente en un sitio diana de la invención. Esta parte puede ser estructuralmente idéntica en ambas moléculas. En otras realizaciones, las partes de unión de las moléculas de unión primeras y segundas pueden ser estructuralmente diferentes. Por consiguiente, la afinidad de unión de la primera molécula de unión a la pareja de unión puede tener un primer valor de K_d y la unión de las segundas moléculas de unión a la misma pareja de unión puede tener un segundo valor de K_d , en los que los valores de K_d primero y segundo difieren entre sí. Sin embargo, para ambas moléculas de unión la parte de unión define la función de la molécula de unión como miembro de un par de unión específica con la misma pareja de unión.

50 Las moléculas de unión tanto primeras como segundas comprendidas en el mismo agente de unión pueden comprender además una parte que puede tener una función como marcador detectable, es decir poderse detectar mediante la aplicación de los medios de detección apropiados. Sin embargo, en cualquier realización las segundas moléculas de unión no pueden comprender una parte que sea sustancialmente idéntica a la parte detectable de las primeras moléculas de unión. El término "sustancialmente idéntica" significa que la parte detectable de las segundas moléculas de unión no puede detectarse mediante los mismos medios de detección que la parte detectable de las primeras moléculas de unión.

55 La parte detectable de la primera molécula de unión puede ser cualquier sustancia detectable disponible en la técnica, por ejemplo un marcador cromógeno fluorescente o luminiscente (denominados colectivamente marcadores "detectables ópticamente"), marcador radiactivo, magnético, un hapteno, una enzima, un sustrato de enzima, etc. A continuación se comentan algunos ejemplos no limitativos particulares de marcadores adecuados.

60 La parte detectable, en una realización de la invención, puede ser una parte de la misma molécula de unión, por ejemplo el fragmento Fc de un anticuerpo; por consiguiente, en tal realización la segunda molécula de unión

comprendida en el mismo agente de unión no puede comprender el fragmento Fc del mismo anticuerpo, mientras que puede comprender la parte de unión a antígeno (tal como por ejemplo el fragmento F(ab)) de este anticuerpo. Esto último significa que en una realización en la que el agente de unión comprende dos anticuerpos específicos diferentes para el mismo antígeno o epítipo (por ejemplo, un primer y un segundo anticuerpos derivados de diferentes especies de huésped), el primer anticuerpo es la primera molécula de unión y el segundo anticuerpo es la segunda molécula de unión; la región Fc de los primeros anticuerpos es la parte detectable del agente de unión de la invención. La región Fc del segundo anticuerpo no es la parte detectable en el contexto de la presente invención.

Otro ejemplo que ilustra lo anterior puede ser el agente de unión que comprende dos sondas de ácido nucleico (moléculas de unión primeras y segundas), que comprenden, cada una, una secuencia de nucleótidos que puede hibridar en condiciones de rigurosidad similares con el mismo ácido nucleico diana (es decir, la pareja de unión) ubicado en los sitios diana de una muestra. Sólo una de las sondas, la primera molécula de unión, va a comprender la parte detectable, que puede ser una sustancia detectable unida a la parte de unión, tal como cualquiera de las descritas en el presente documento, o puede ser una secuencia de nucleótidos que no puede hibridar con la secuencia diana en las mismas condiciones. Otro sonda, el segundo agente de unión, no puede comprender la misma sustancia detectable o la misma secuencia de ácido nucleico, mientras que puede comprender otra sustancia de nucleótido que no es “detectable” en el contexto de la presente invención.

Miembros de pares de unión específica adecuados para su uso en la práctica de la invención pueden ser de tipo inmunitario o no inmunitario.

Los pares de unión específica no inmunitarios incluyen sistemas en los que los dos componentes comparten una afinidad natural entre sí pero no son anticuerpos. Pares de unión no inmunitarios a modo de ejemplo son biotina-avidina o biotina-estreptavidina, proteína de unión a ácido fólico-folato, ácidos nucleicos complementarios, receptor-ligando, etc. La invención también incluye pares de unión no inmunitarios que forman un enlace covalente entre sí. Los pares de unión covalente a modo de ejemplo incluyen grupos reactivos con sulfhidrilo tales como maleimidas y derivados de haloacetilo y grupos reactivos con amina tales como isotiocianatos, ésteres de succinimidilo, haluros de sulfonilo y colorantes de acoplamiento tales como 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetil-amino)benzoico (DAB), etc.

Los pares de unión específica inmunitarios pueden ejemplificarse mediante sistemas anticuerpo-anticuerpo o sistemas hapteno-anti-hapteno. En una realización, el par de unión específica inmunitario de la invención puede ser un par de unión anticuerpo-anticuerpo que comprende dos o más moléculas de anticuerpo que tienen afinidad entre sí, por ejemplo un par de anticuerpo primario y anticuerpo secundario, en el que el anticuerpo primario representa la pareja de unión y el anticuerpo secundario representa el agente de unión; también pueden usarse sistemas de anticuerpos que comprenden 3 ó 4, o más miembros de anticuerpo. En otras realizaciones de la invención, el par de unión inmunitario puede estar representado por un sistema hapteno-anti-hapteno. En tales realizaciones, el agente de unión puede comprender la primera molécula de unión que es un conjugado que comprende una molécula que tiene afinidad por una pareja de unión en un sitio diana (por ejemplo, una diana) y está unida a un hapteno, por ejemplo un conjugado anticuerpo primario-hapteno o conjugado secuencia de ácido nucleico-hapteno, y el segundo agente de unión que es la misma molécula de anticuerpo o la misma secuencia de ácido nucleico, ambas sin el hapteno. El hapteno (es decir, la parte detectable de la primera molécula de unión) puede detectarse entonces por un agente de detección específico para el hapteno (por ejemplo indirectamente con el uso del anticuerpo anti-hapteno, o directamente mediante observación microscópica, si el hapteno es una sustancia detectable visualmente, por ejemplo un marcador fluorescente).

El término “hapteno” designa una molécula pequeña que puede considerarse un epítipo aislado frente al que puede producirse un anticuerpo, aunque el hapteno solo no inducirá una respuesta inmunitaria si se inyecta en un animal, debe conjugarse con un portador (habitualmente una proteína). Como los haptenos son moléculas pequeñas, pueden unirse múltiples copias de un hapteno a una molécula grande, por ejemplo una molécula de polímero, tal como proteína, secuencia de nucleótidos, dextrano, etc. Los haptenos pueden servir como moléculas marcadoras convenientes para formatos de ensayo en los que es necesario o ventajoso amplificar una señal. Por tanto, las múltiples copias unidas de un hapteno proporcionan sensibilidad potenciada, por ejemplo aumento de la intensidad de señal. Los ejemplos no limitados de haptenos adecuados incluyen fluoresceína (FITC), 2,4-dinitrofenol (DNP), myc-digoxigenina (DIG), tirosina, nitrotirosina-biotina y colorantes, por ejemplo tetrametil-rodamina, Texas Red, dansilo, Alexa Fluor 488, BODIPY FL, amarillo lucifer y los fluoróforos Alexa Fluor 405/Cascade Blue. Se describen haptenos en el documento US20080305497, que también pueden usarse para los fines de la invención.

El término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, designa una inmunoglobulina o una parte de la misma, e incluye cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, el método de producción, y otras características. El término incluye por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, humanizados, de cadena sencilla, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados y con injerto de CDR. La parte de unión a antígeno de un anticuerpo incluye cualquier fragmento de anticuerpo que pueda unirse todavía al antígeno, por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, o fragmentos o derivados de los mismos, por ejemplo moléculas recombinantes, etc. El origen del anticuerpo está definido por la secuencia genética independientemente del método de producción.

- Anticuerpo primario, en el contexto de la presente invención, se refiere a un agente de unión a antígeno, por ejemplo una molécula de anticuerpo primario completa, un fragmento o un derivado de dicha molécula, por ejemplo un conjugado que comprende un anticuerpo primario o un anticuerpo primario polimerizado, que se une de manera específica a su antígeno, por ejemplo molécula diana u otra unidad individual de una diana, hapteno, etc. en algunas realizaciones, un anticuerpo primario puede ser un anticuerpo bivalente que puede unirse a dos (o más) unidades individuales únicas de diferentes dianas, por ejemplo un anticuerpo que puede unirse a un dímero receptor, por ejemplo el dímero Her2/Her3. En esta realización, la unidad individual de una diana según la invención es un único dímero Her2/Her3, y la diana es una población de dímeros Her2/her3 en una muestra, incluyendo todos de dichos dímeros de la muestra.
- Anticuerpo secundario, en el contexto de la presente invención, se refiere a un agente de unión que puede unirse de manera específica al anticuerpo primario correspondiente. Puede ser una molécula de anticuerpo completa, un fragmento o un derivado de dicha molécula, por ejemplo un conjugado que comprende un anticuerpo o un anticuerpo polimerizado, que tiene un dominio de unión a antígeno que se une de manera específica al anticuerpo primario.
- Anticuerpo terciario, en el contexto de la presente invención, se refiere a un anticuerpo que puede unirse al anticuerpo secundario correspondiente. Puede ser una molécula de anticuerpo completa, un fragmento o un derivado de dicha molécula, por ejemplo un conjugado que comprende un anticuerpo o un anticuerpo polimerizado que comprende un dominio de unión a antígeno que se une de manera específica a un anticuerpo secundario o un hapteno unido a un anticuerpo secundario.
- Los anticuerpos usados en la invención, incluyendo anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios y anticuerpos terciarios, pueden derivarse de cualquier especie de mamífero, por ejemplo, una rata, un ratón, una cabra, una cobaya, un asno, un conejo, caballo, llama, camello, o cualquier especie de ave por ejemplo, gallina, pavo. Derivarse de cualquier especie de mamífero o de ave, tal como se usa en el presente documento, significa que al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo particular originado a partir de la secuencia genómica de un mamífero específico, por ejemplo, una rata, un ratón, una cabra, o un conejo o un ave específica por ejemplo, gallina, pavo. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.
- En determinadas realizaciones, cualquier anticuerpo (primario, secundario o terciario) puede conjugarse con un polímero. En algunas realizaciones, 1-20 moléculas de anticuerpo, sus fragmentos o derivados, tales como por ejemplo 5-15 moléculas, 1-10, etc., pueden conjugarse con un polímero, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 moléculas por polímero.
- Pueden usarse anticuerpos modificados mediante ingeniería incluyendo anticuerpos quiméricos, con injerto de CDR y seleccionados artificialmente producidos usando presentación en fago o técnicas alternativas como moléculas de unión comprendidas en el agente de unión de la invención.
- Los anticuerpos comprendidos en agentes de unión o como agentes de detección de la invención pueden producirse mediante cualquiera de numerosos métodos bien conocidos en la técnica por ejemplo, según Harlow y Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Se describen técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpo recombinantes en la referencia anterior y otras referencias varias, por ejemplo, los documentos EP 0623679; EP 0368684; y EP 0436597. Pueden aislarse ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos de una biblioteca de ADNc. Pueden aislarse ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos de una biblioteca de fagos (véanse por ejemplo McCafferty *et al.* 1990, *Nature* 348:552, Kang *et al.* 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363; documento EP 0 589 877 B1). Pueden obtenerse ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos mediante intercambio génico de secuencias conocidas (Mark *et al.* 1992, *Bio/Technol.* 10:779). Pueden aislarse ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos mediante recombinación *in vivo* (Waterhouse *et al.* 1993, *Nucl. Acid Res.* 21:2265). Los anticuerpos usados en los métodos de la invención incluyen inmunoglobulinas humanizadas (véase el documento U.S. 5.585.089, Jones *et al.* 1986, *Nature* 332:323). Los anticuerpos de la invención pueden alterarse de cualquier modo posible, suponiendo que conserven su afinidad de unión, por ejemplo pueden fusionarse con una proteína efectora, toxina, marcador, etc. se conocen bien en la técnica métodos de conjugación de anticuerpo con diferentes agentes.
- En una realización preferida, ambas moléculas de unión del agente de unión son o comprenden un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, y la pareja de unión es una molécula que comprende el antígeno, por ejemplo una entidad antigénica, tal como hapteno o secuencia de aminoácidos o similar.
- En una realización preferida de la invención, la parte detectable de la primera molécula de unión es la región Fc de un anticuerpo, un fragmento o un derivado de la misma; una realización, es del mismo anticuerpo que la parte de unión de la primera molécula de unión; en otras realizaciones, es de otro anticuerpo, es decir de un anticuerpo que tiene la parte de unión a antígeno diferente de la parte de unión del primer agente de unión.
- En una realización preferida, la primera molécula de unión es o comprende una molécula de anticuerpo primario, o un derivado de la misma, específica para un epítipo comprendido en la pareja de unión, y la segunda molécula de

unión se selecciona de una molécula que comprende una porción de unión a antígeno de dicho anticuerpo primario, o una molécula que comprende una porción de unión a antígeno de otro anticuerpo, en el que dicho otro anticuerpo es específico para el mismo epítipo que dicho anticuerpo primario, o puede inhibir la unión de la primera molécula de unión a dicho epítipo.

- 5 En otra realización preferida, el agente de unión comprende moléculas marcadas y no marcadas que comprenden una porción de unión a antígeno del mismo anticuerpo, tales como moléculas normales o derivatizadas marcadas y no marcadas de un anticuerpo primario, moléculas de anticuerpo normales o derivatizadas marcadas y no marcadas de un anticuerpo secundario, o moléculas de conjugado marcadas y no marcadas que comprenden moléculas normales o derivatizadas de un anticuerpo primario o moléculas de conjugado marcadas y no marcadas que comprenden moléculas normales o derivatizadas de anticuerpo secundario.

En una realización de la invención, el agente de unión está representado por moléculas de unión primera y segunda que comprenden una región de unión a antígeno de un anticuerpo, tal como una región Fab, por ejemplo fragmentos F(ab)1 o F(ab)2 de un anticuerpo.

- 15 En una realización preferida, la parte de unión de la primera molécula de unión y la segunda molécula de unión son o comprenden el fragmento F(ab)2 del mismo anticuerpo primario específico para un epítipo comprendido en la pareja de unión, o los fragmentos F(ab)2 de dos anticuerpos primarios diferentes que son específicos para el mismo epítipo, o que pueden inhibir la unión de las primeras moléculas de unión al epítipo.

- 20 En otra realización preferida, la parte de unión de la primera molécula de unión y la parte de unión de la segunda molécula de unión son o comprenden los fragmentos F(ab)2 del mismo anticuerpo secundario o fragmentos F(ab)2 de dos anticuerpos secundarios diferentes que son específicos para el mismo anticuerpo primario.

En algunas realizaciones, el agente de unión puede ser una composición que comprende más de dos moléculas de anticuerpo diferentes, por ejemplo 3, 4, 5, etc. moléculas de anticuerpo diferentes. En esta realización, uno o más anticuerpos pueden ser las primeras moléculas de unión y todas las demás moléculas de anticuerpo comprendidas en el agente de unión son representativas de la población de las segundas moléculas de unión.

- 25 Tal como se mencionó, en algunas realizaciones, la invención se refiere a agentes de unión que comprenden moléculas de unión primeras y segundas que comprenden la parte de unión que es un miembro de un par de unión específica no inmunitario con la pareja de unión en el sitio diana, por ejemplo secuencias de nucleótidos, o moléculas de análogo de ácido nucleico. Una realización preferida de la invención relacionada con un agente de unión que comprende las moléculas de unión primeras y segundas que son o comprenden un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico, cuya pareja de unión es un ácido nucleico en la muestra.

- 30 Un agente de unión que comprende una molécula de ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN, una molécula de ARN, una molécula de PNA, etc., puede ser útil para la detección de dianas de ácido nucleico. Un agente de unión que comprende las moléculas de unión primeras y segundas que son o comprenden una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico, y la pareja de unión es una secuencia de nucleótidos en la muestra puede ser una realización preferida. Además, puede preferirse que las moléculas de unión primeras y segundas que comprenden una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico, o similar, comprendida en la parte de unión que puede hibridar con la misma pareja de unión en las mismas condiciones de rigurosidad, tales como condiciones de rigurosidad baja a media. En alguna realización, las moléculas de unión pueden hibridar preferiblemente con la pareja de ácido nucleico en la muestra en condiciones de alta rigurosidad.

- 35 Las secuencias de ácido nucleico usadas como agentes de unión para los fines de la invención pueden sintetizarse químicamente o producirse en células recombinantes. Ambos modos de producción se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Press). En algunas realizaciones, un agente de unión de ácido nucleico puede comprender un ácido nucleico peptídico (PNA). Un ácido nucleico peptídico es una molécula de ácido nucleico en la que la estructura principal de azúcar de desoxirribosa o ribosa, presente habitualmente en ADN y ARN se sustituye por una estructura principal peptídica. Se conocen en la técnica métodos de preparación de PNA (véase por ejemplo Nielson, 2001, *Current Opinion in Biotechnology* 12:16). En otras realizaciones, el agente de unión puede comprender un ácido nucleico bloqueado (LNA) (Sorenson *et al.* 2003, *Chem. Commun.* 7(17):2130).

- 40 Un agente de unión de ácido nucleico, en algunas realizaciones, puede comprender al menos un oligonucleótido o al menos una secuencia de polinucleótido que hibrida de manera específica con una unidad individual de una secuencia diana en una muestra biológica, por ejemplo una secuencia de ARNm individual, en condiciones de rigurosidad específicas. El término "hibridación en condiciones de rigurosidad," se usa en el presente documento para describir condiciones para hibridación en las que secuencias de nucleótidos que son significativamente complementarias entre sí, tal como complementarias en al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85-90%, permaneces unidas entre sí. Se determina el porcentaje de complementariedad tal como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Se conocen en la técnica condiciones de rigurosidad especificadas y pueden encontrarse en *Current Protocols in*

- Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ausubel *et al.* 1995 eds.), secciones 2, 4 y 6 (incorporado al presente documento como referencia). Adicionalmente, se describen condiciones de rigurosidad especificadas en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Press, capítulos 7, 9, y 11. En algunas realizaciones, las condiciones de hibridación son condiciones de alta rigurosidad. Un ejemplo de
- 5 condiciones de hibridación de alta rigurosidad es la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 4X a 65-70°C o hibridación en SSC 4X más formamida al 50% a 42-50°C, seguido por uno o más lavados en SSC 1X, a 65-70°C. Se entenderá que pueden añadirse reactivos adicionales a los tampones de hibridación y/o lavado, por ejemplo, agentes de bloqueo (BSA o ADN de esperma de salmón), detergentes (SDS), agentes quelantes (EDTA), Ficoll, PVP, etc.
- 10 En algunas realizaciones, los agentes de unión pueden hibridar con una secuencia diana en una muestra en condiciones de rigurosidad moderada. Rigurosidad moderada, tal como se usa en el presente documento, incluye condiciones que pueden determinar fácilmente los expertos habituales en la técnica basándose, por ejemplo, en la longitud del ADN. Se exponen condiciones ejemplificadas por Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. vol. 1, págs. 1,101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (incorporado al presente
- 15 documento como referencia), e incluyen el uso de una disolución de prelavado de SSC 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de formamida al 50%, SSC 6X a 42°C (u otra disolución de hibridación similar, tal como disolución de Stark, en formamida al 50% a 42°C), y condiciones de lavado de 60°C, SSC 0,5X, SDS al 0,1%.
- 20 En algunas realizaciones, los agentes de unión hibridan con una secuencia diana en una muestra en condiciones de baja rigurosidad. Las condiciones de baja rigurosidad pueden incluir, tal como se usa en el presente documento, condiciones que pueden determinar fácilmente los expertos habituales en la técnica basándose, por ejemplo, en la longitud del ADN. Baja rigurosidad puede incluir, por ejemplo, pretratamiento del ADN durante 6 horas a 40°C en una disolución que contiene formamida al 35%, SSC 5x, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. Se llevan a cabo las hibridaciones en la
- 25 misma disolución con las siguientes modificaciones: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, sulfato de dextrano al 10% (p/v), y se usa agente de unión a 5-20x10⁶ CPM. Se incuban las muestras en la mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40°C, y luego se lavan durante 1,5 h a 55°C en una disolución que contiene SSC 2x, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. La disolución de lavado se repone con nueva disolución y se incuba 1,5 h más a 60°C.
- 30 En otras realizaciones, la invención puede referirse a agentes de unión que comprenden moléculas de unión primeras y segundas que comprenden secuencias peptídicas que se derivan de proteínas distintas de anticuerpos, por ejemplo secuencias peptídicas derivadas de dominios de unión a ácido nucleico de diferentes proteínas, ligandos de diferentes receptores celulares y nucleares y sus derivados. Algunos ejemplos no limitativos de tales agentes de unión pueden ser proteína c1q de la ruta clásica de la cascada del complemento que puede unirse a una
- 35 región constante de anticuerpo, una de molécula de CMH, por ejemplo, CMH de clase I y CMH de clase II y CMH no convencional, una molécula que tiene una pareja de unión específica, tal como moléculas implicadas en rutas de señalización celular tales como moléculas que tienen dominios de cremallera de leucina, por ejemplo, fos/jun, myc, GCN4, moléculas que tienen dominios SH1 o SH2, tales como Src o Grb-2; un receptor de inmunoglobulina, por ejemplo, un receptor Fc; una proteína quimérica, es decir, una proteína modificada por ingeniería para que combine
- 40 las características de dos o más parejas de unión específica, por ejemplo, una cremallera de leucina podría modificarse por ingeniería para dar una región Fc de un anticuerpo, un dominio SH2 podría modificarse por ingeniería para expresarse en una región Fc de un anticuerpo. En otras realizaciones, pueden modificarse por ingeniería proteínas de fusión que comprenden una porción Fc de un anticuerpo con un dominio variable sustituido.
- 45 La parte de unión de las moléculas de unión de un agente de unión de la invención también puede ser una molécula pequeña que puede unirse de manera específica a determinadas unidades estructurales de moléculas biológicas grandes.
- 50 Tal como se mencionó, la parte detectable del primer agente de unión puede ser o puede comprender una sustancia detectable, por ejemplo un marcador fluorescente, hapteno, enzima, etc. Se describieron anteriormente marcadores de hapteno no limitativos. Ejemplos no limitativos de marcadores fluorescentes, luminiscentes, radiactivos, cromogénicos o magnéticos pueden ser 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceína)-5-(y 6)-carboxamido-hexanoico, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametil-rodamina, Cy2, Cy3, Cy5, AMCA, PerCP, R-ficoeritrina (RPE), aloficoeritrina (APC), Texas Red, Princeton Red, nanocristalitos de CdSe recubiertos con proteína fluorescente verde (GFP), DNP, digoxigenina, derivados de rutenio, luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas, isótopos radiactivos de hidrógeno, carbono,
- 55 azufre, yoduro, cobalto, selenio, tritio o fósforo; perlas o partículas magnéticas. Ejemplos no limitativos de marcadores de enzima adecuados pueden ser peroxidasa del rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetilglucosaminidasa, β-glucuronidasa, invertasa, xantina oxidasa, luciferasa de luciérnaga, glucosa oxidasa (GO). En una realización preferida, la primera molécula de unión puede comprender HRP como parte detectable.
- 60 La cantidad del agente de unión usado en el método según la invención está predeterminada de modo que las moléculas de unión primeras y segundas del agente de unión se unen conjuntamente a sustancialmente todas las

unidades de su pareja de unión presente en la muestra. El término “sustancialmente todas” significa que el agente de unión satura al menos el 51% de los sitios de unión por afinidad de la muestra (es decir, los sitios en los que la pareja de unión correspondiente está disponible para unión por afinidad), o más; preferiblemente, más del 51% de los sitios de unión, tal como hasta aproximadamente el 66% de los sitios; preferiblemente, más del 60%, tal como hasta aproximadamente el 75% de los sitios o más, por ejemplo hasta aproximadamente el 80% de los sitios, o hasta aproximadamente el 90% de los sitios o más. Esto significa que la cantidad del agente de unión debe ser al menos igual o, preferiblemente, superior al valor de Kd del complejo agente de unión-pareja de unión en la muestra, preferiblemente, superior al valor de Kd, tal como el 10-1000% superior al valor, o más. El valor de Kd del complejo agente de unión-pareja de unión puede definirse para una mezcla de moléculas de unión primeras y segundas o por separado para cada molécula de unión siguiendo las instrucciones correspondientes de la técnica, por ejemplo tal como se ejemplifica en el presente documento en el ejemplo 1 ó 2 para agentes de unión a anticuerpo.

La invención se refiere a una gran variedad de especies de muestra, especies de pareja de unión, especies de molécula de unión, diversos valores de afinidad de unión entre moléculas de unión del agente de unión y su pareja de unión, según las cantidades del agente de unión aplicadas a una muestra en diferentes realizaciones varían dependiendo de la realización. Usando el conocimiento general común, el experto en la técnica puede seleccionar una molécula de agente de unión apropiada y determinar su afinidad por la pareja de unión de interés en la muestra, y, por tanto, la cantidad de agente de unión necesaria para cada realización particular.

En una realización de la invención, el agente de unión puede contener una cantidad de las segundas moléculas de unión que es igual o, preferiblemente, mayor que la Kd del complejo segunda molécula de unión-pareja de unión, tal como el 5-50% mayor que el valor de Kd, tal como el 10-100% mayor, el 20-200% mayor, el 30-300% mayor, el 40-400% mayor, etc.

Según la invención, una gran cantidad del agente de unión que comprende una mezcla de moléculas de unión primeras y segundas (como cualquiera de las descritas anteriormente), en el que una porción de las segundas moléculas de unión está predeterminada como anteriormente, tiene la ventaja de que permite detectar una subpoblación fraccionaria de los sitios diana (que comprende unidades de diana individuales) en la muestra marcada con la parte detectable de las primeras moléculas de unión que está predeterminada por la cantidad predeterminada del segundo agente de unión en la mezcla de agente de unión. Por tanto, la cantidad de la diana de unión correspondiente en la muestra puede determinarse de manera precisa y repetida. Se describen ejemplos no limitativos de uso práctico de la invención para la evaluación de la cantidad de una diana en una muestra histológica en el presente documento en los ejemplos.

Medios de incubación

Según la invención, se incuba una muestra que comprende supuestamente sitios diana de la invención en medios que comprenden un agente de unión de la invención. La incubación de la muestra significa mantener la muestra en medios de incubación durante un periodo de tiempo para permitir que suceda un determinado acontecimiento, por ejemplo un acontecimiento de unión, una reacción química, etc. El término “medios de incubación” significa en el presente contexto una disolución acuosa que comprende compuestos que permiten que suceda el determinado acontecimiento, por ejemplo moléculas de agente de unión.

El tiempo de incubación puede variar, en diferentes realizaciones, una incubación puede durar desde aproximadamente 3 segundos hasta aproximadamente 3 min, por ejemplo aproximadamente 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, o más tiempo, por ejemplo una-dos horas, durante la noche. Por ejemplo, incubar la muestra en una disolución acuosa que comprende un agente de unión (“medios de agente de unión”) puede durar 1-3 minutos.

La incubación puede realizarse a diversas temperaturas, dependiendo del tipo de diana, agente de unión, etc., por ejemplo puede realizarse a una temperatura desde aproximadamente + 4°C hasta aproximadamente + 40°C.

En una realización, la invención se refiere a un agente de unión que comprende anticuerpo o un derivado de un anticuerpo. Por consiguiente, los medios de agente de unión pueden ser un medio acuoso en que el agente de unión es soluble y estable y puede unirse a su pareja de unión en el sitio diana. Normalmente es una disolución acuosa tamponada que tiene un pH en el intervalo de desde 4 hasta 9, tal como entre pH 3,5 y pH 9,5, por ejemplo entre pH 5 y pH 7, entre pH 5,5 y pH 6,5 o entre pH 6,5 y 7,5, o entre pH 7 y pH 8, o entre pH 7,5 y pH 8,5, o pH 8 y pH 9. Puede usarse cualquier tampón con una capacidad tampón adecuada, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS) y tampón imidazol. Pueden encontrarse otros tampones adecuados en Good, NE., *et al* (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochem.* 5(2), 467-477. El valor de pH de los medios puede ser esencial para la unión del agente de unión a la pareja de unión; puede optimizarse dependiendo de la naturaleza del agente de unión y la diana.

En algunas realizaciones, el medio de agente de unión puede comprender una sal orgánica o inorgánica. La sal inorgánica puede seleccionarse de, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio o sulfato de amonio. La sal orgánica puede seleccionarse de, por ejemplo, acetato de sodio, acetato de amonio o sales de imidazol, por ejemplo clorhidrato de imidazol, etc. La cantidad de sal en los

medios de agente de unión puede oscilar entre aproximadamente 10^{-3} M y saturación, por ejemplo entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 200 mM, o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM. En una realización preferida, los medios pueden comprender sal en la cantidad de desde aproximadamente 10 mM hasta 500 mM. En otra realización preferida, el medio puede estar libre de sal.

- 5 En algunas realizaciones, los medios de agente de unión pueden comprender un modificador orgánico (por el término “modificador orgánico” quiere decirse cualquier disolvente no acuoso), por ejemplo N-metil-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), mono- y dietilenglicol, sulfolano, N,N-dimetilformamida (DMF), polietilenglicol (PEG), propilenglicol, etc. La cantidad del modificador orgánico puede variar entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20% (v/v o p/v), o, en algunas realizaciones, ser mayor del 20%.
- 10 En algunas realizaciones, los medios de agente de unión pueden comprender un detergente, por ejemplo p-isooctilfenil éter de polietilenglicol (NP-40) o un tensioactivo (por ejemplo seleccionado de los tensioactivos basados en monolaurato de polioxitileno-sorbitano (Tween), o un tensioactivo basado en copolímeros de bloque (Pluronic, etc.), etc. La cantidad del detergente puede variar entre aproximadamente el 0,001% y aproximadamente el 5% v/v o p/v).
- 15 En algunas realizaciones, los medios de agente de unión pueden comprender un agente de estabilización de agente de unión, por ejemplo albúmina sérica bovina o dextrano. La cantidad del agente de estabilización puede variar entre el 0,01% y el 20% (p/v).

En algunas realizaciones, los medios de agente de unión pueden comprender un quelante de iones (por ejemplo un quelante de tipo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido etilendiaminohidroxifenilacético (EDHPA), etc.). La cantidad del quelante puede variar entre aproximadamente 10^{-9} M y aproximadamente 10^{-6} M.

En algunas realizaciones, los medios de agente de unión pueden comprender uno o más agentes de bloqueo para saturar sitios de unión inespecífica, es decir sitios del soporte sólido que no comprenden la diana. Algunos ejemplos no limitativos de agentes de bloqueo adecuados para diferentes realizaciones pueden ser la disolución de Denhard, albúmina sérica bovina, leche desnatada, etc.

25 Tal como se comentó anteriormente, la invención contempla una gran variedad de especies de dianas, agentes de unión y formatos de ensayo; por consiguiente, la composición del medio de agente de unión puede variar y debe ajustarse para cada realización particular usando los conocimientos de la técnica.

Las cantidades de las moléculas de unión en un agente de unión pueden variar dependiendo de la especie de dichas moléculas de unión, su afinidad por la pareja de unión en la muestra (o en sitios diana de la muestra), especie de la pareja de unión, especie de muestra, composición de los medios, etc. Tal como se comentó anteriormente, la cantidad del agente de unión en los medios está predeterminada para unirse sustancialmente a todas las unidades la pareja del agente de unión presentes en la muestra. Dependiendo de la afinidad de las moléculas de unión primeras y segundas por la pareja de unión, la cantidad de cada una en el agente de unión puede variar, sin embargo, según la invención la cantidad del agente de unión (incluyendo las moléculas de unión tanto primeras como segundas) no debe ser menor, preferiblemente mayor que el valor de Kd de complejo agente de unión-pareja de unión, preferiblemente superior a este valor, tal como aproximadamente el 5-10% mayor que el valor de Kd, preferiblemente más del 10% que el valor de Kd tal como aproximadamente el 11-14%, el 15-20%, el 20-25%, el 25-50%, o más del 50% mayor que el valor de Kd, tal como el 100% mayor, el 200% mayor, por ejemplo el 300%-1000% mayor o más. La cantidad de la segunda molécula de unión en la mezcla de agente de unión puede estar por encima o por debajo del valor de Kd correspondiente (es decir complejo segunda molécula de unión-pareja de unión), sin embargo, en algunas realizaciones puede preferirse que la cantidad de las segundas moléculas de unión en la mezcla sea mayor que la Kd, al menos el 1% mayor, tal como del 5% al 25% mayor, el 10-50% mayor, el 15-75% mayor, etc. La cantidad de la primera molécula de unión puede definirse según la invención individualmente para diferentes realizaciones; en algunas realizaciones puede ser inferior al valor de Kd del complejo primera molécula de unión-pareja de unión, en otras realizaciones igual o superior a la Kd.

Detección

Un método de la invención puede comprender una o más etapas que preceden o siguen a la etapa de incubación de la muestra con el agente de unión de la invención para detectar la parte detectable de las primeras moléculas de unión en la muestra.

50 La parte detectable de la primera molécula de unión puede comprender un marcador detectable ópticamente, una enzima, un miembro de un par de unión específica, una partícula, una sustancia radiactiva, una combinación de cualquiera de los mismos. Por consiguiente, un marcador puede detectarse directamente, es decir observando el marcador usando medios que permitan la observación de este marcador detectable, por ejemplo un microscopio. Para algunas partes detectables de la invención, no existen medios detectables apropiados, de modo que estas partes pueden detectarse, de la manera denominada, “indirectamente”, usando agentes de detección que pueden detectar de manera específica y hacer que sean “detectables”, por ejemplo marcar los sitios de la presencia de las partes detectables de las primeras moléculas de unión con color o fluorescencia o similar. En una realización, la parte detectable puede comprender un miembro de un par de unión específica. La detección de tales partes

detectables puede comprender una o más etapas de uso de agentes de unión que comprenden el miembro correspondiente de este par de unión específica. Este procedimiento de detección puede comprender además una etapa de visualización del sitio diana que comprende el primer agente de unión, por ejemplo el uso de una deposición mediada por enzima de una molécula indicadora en dicho sitio diana. En una realización, la deposición mediada por enzima es una deposición mediada por peroxidasa del rábano (HPR) de un indicador. Puede ser cualquier marcaje tradicional con HRP-DAB (3,3'-diaminobencidina) de los sitios diana bien conocido en la técnica. También puede usarse un procedimiento descrito recientemente en los documentos WO2010094284, WO2010094283, WO201047680 o WO2012143010. En los ejemplos se describen algunos ejemplos de visualización de sitios diana según estos últimos procedimientos.

- 5
- 10 La visualización mediada por HPR de la parte detectable de las primeras moléculas de unión es, en algunas realizaciones, el método de visualización preferido, pero no limitativo, ya que puede usarse cualquier procedimiento de visualización que sea adecuado para detectar la parte detectable de las primeras moléculas de unión en una muestra de la invención. Esta flexibilidad de procedimientos de visualización aplicables es una de las ventajas del método de la invención.
- 15 El procedimiento de detección también puede comprender una o más etapas de bloqueo, lavado, preparación, o similar.

El método de la invención puede usarse en un ensayo para la evaluación de una diana en una muestra histológica, en el que el ensayo comprende una etapa de detección de la diana en la muestra usando un agente de unión que tiene una afinidad específica por la diana. El método puede implementarse en la práctica en cualquiera de tales ensayos, tanto en aquellos que ya existen en la técnica como en aquellos que se desarrollarán en la técnica de evaluación de una diana en una muestra histológica mediante el uso de agentes de unión específica a la diana. Por consiguiente, un ensayo para la evaluación de una diana en una muestra histológica, que comprende una etapa de detección de la diana en la muestra según el presente método es otro aspecto de la invención.

- 20
- 25 El ensayo que comprende la etapa de detección del sitio diana de la invención puede ser para la evaluación tanto cualitativa como cuantitativa de la diana en una muestra. Ambas evaluaciones son realizaciones del ensayo de la invención. El ensayo de la invención puede usarse para una evaluación cualitativa y/o cuantitativa de un marcador biológico, por ejemplo un biomarcador de una enfermedad. En una realización, la invención se refiere a un gen de la familia de ErbB de receptores de factores de crecimiento, o un producto de dicho gen como biomarcador de una enfermedad, por ejemplo Her2, Her2, etc. En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser una combinación de dos o más biomarcadores que pueden funcionar como una unidad de diana individual en el contexto de la invención, por ejemplo los dímeros de receptor ErbB o similares.
- 30

El método de la invención es comparable con métodos y ensayos de visualización y detección automática, semiautomática o manual de dianas.

2. Kit de partes

- 35 También se da a conocer un kit de partes que comprende una composición que comprende un agente de unión que puede unirse de manera específica a la pareja de unión comprendida en dichos uno o más sitios diana, en el que la cantidad del agente de unión es suficiente para unirse sustancialmente a todas las unidades de la pareja de unión presente en la muestra, y en el que el agente de unión se caracteriza porque comprende primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión, en el que las primeras moléculas de unión comprenden una parte de unión y una parte detectable, y las segundas moléculas de unión comprenden una parte de unión, en el que la parte de unión de las moléculas de unión tanto primeras como segundas puede unirse de manera específica a la pareja de unión y competir por dicha unión, y en el que las segundas moléculas de unión no comprenden una parte que es sustancialmente idéntica a la parte detectable de las primeras moléculas de unión.
- 40

En diferentes realizaciones, un kit de partes de la invención puede comprender además uno o más de los siguientes

- 45
- (i) materiales de referencia;
- (ii) reactivos para la detección y/o visualización de la parte detectable de las primeras moléculas de unión;
- (iii) protocolos para la detección y/o visualización de la parte detectable de las primeras moléculas de unión;
- (iv) protocolos para la cuantificación de dianas;
- 50
- (v) instrumento(s) para la visualización de una diana y/o la captura de imágenes o una referencia a tales instrumentos;
- (vi) software para controlar los instrumentos;
- (vii) software para el análisis de imágenes;
- (viii) algoritmos de análisis de imágenes bloqueadas;

- (ix) criterios para evaluar las muestras, por ejemplo criterios de puntuación y directrices de puntuación;
- (x) instrucciones de uso.

Todas las realizaciones del método de la invención referentes al agente de unión, moléculas de unión, muestra, medios, diana, medios de visualización, etc., son también realizaciones del kit de partes de la invención.

5 En particular, el agente de unión de un kit de partes de la invención puede comprender moléculas de unión que son miembros de cualquiera de los pares de unión específica con la diana en la muestra o con una sustancia asociada con la diana (realizaciones de todos estos últimos se comentaron anteriormente).

En una realización preferida, el agente de unión puede comprender un anticuerpo, o un fragmento o un derivado del mismo, en otra realización, puede comprender un ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico.

10 En una realización, las primeras moléculas de unión y las segundas moléculas de unión del agente de unión pueden ser anticuerpos que son (i) específicos para el mismo antígeno; (ii) pueden inhibir entre sí la unión a dicho antígeno, y (iii) tienen diferentes regiones Fc; en otra realización, la primera molécula de unión puede ser un anticuerpo y la segunda molécula de unión es el fragmento F(ab)₂ del mismo anticuerpo.

15 El kit de partes de la invención es, en una realización preferida, para la evaluación de una diana en una muestra histológica. En una realización preferida, para la evaluación cuantitativa de la diana.

La diana puede estar en diferentes realizaciones, ser una molécula biológica o química, partícula, complejo molecular o celular, estructura molecular o celular, virus o microorganismo diana, o un fragmento de dicha molécula, partícula, complejo, estructura, virus o microorganismo diana. En una realización preferida, la diana es un biomarcador de una enfermedad, tal como uno de los comentados anteriormente.

20 En una realización, el kit de partes comprende materiales de referencia, tales como una o más muestras histológicas que comprenden células con cantidades predeterminadas de la diana.

En una realización, el kit de partes puede comprender un agente de unión que comprende una mezcla de las moléculas de unión primeras y segundas, en el que las moléculas de unión están presentes en una razón predeterminada, caracterizado porque la cantidad de las segundas moléculas de unión es mayor que la cantidad de las primeras moléculas de unión.

25

Las realizaciones mencionadas anteriormente no son limitativas.

Ejemplos

30 Lo siguiente es una descripción de ejemplos de trabajo no limitativos que ilustran algunas realizaciones de la invención dada a conocer. Las consideraciones teóricas forman parte de la descripción y no son vinculantes. Las realizaciones descritas son a modo de ejemplo y no limitativas.

Abreviaturas

	MBHA	4-Metilbenzidrilamina
	NMP	N-Metil-pirrolidona
	HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, metenaminio
35	DIPEA	Diisopropil-etilamina
	DCM	Diclorometano
	TFA	Ácido trifluoroacético
	TFMSA	Ácido trifluorometilsulfónico
	Flu	Fluoresceína
40	Dex	Dextrano
	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
	equi.	Equivalente
	L30	1,10,16,25-tetraaza-4,7,13,19,22,28-hexaoxa-11,15,26,30-tetraoxo-triacontano
	L60, L90, L120, L150	diferentes polímeros de L30, que comprenden 2, 3, 4 ó 5 repeticiones de L30

	CIZ	2-cloroZ = 2-cloro-benciloxicarbonilo
	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
	HRP	Peroxidasa del rábano
	GaM	Anticuerpo de cabra anti-ratón
5	DNP	2,4 dinitro-fluorobenceno (dinitrofenilo)
	ACim	Ácido 4-amino-cinámico
	LPR	Rojo permanente líquido (Dako K0540)
	Sin	Ácido sinapínico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-cinámico)
	Caf	Ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxi-cinámico)
10	Alfa-CHC	Ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico
	PNA-X	oligómero de ácido nucleico peptídico (N-(2-aminoetil)-glicina) que comprende diferentes sustituyentes acoplados al nitrógeno central
	A	Ácido adenina-9-acético,
	C	Ácido citosina-1-acético,
15	D	Ácido 2,6-diaminopurina-9-acético,
	G	Ácido guanina-9-acético,
	Gs	Ácido 6-tioguanina-9-acético,
	P	Ácido 2-pirimidinona-1-acético,
	T	Ácido timina-1-acético,
20	Us	Ácido 2-tiouracilo-1-acético.
	Dpr	Ácido 2,3 diamino-propiónico,
	Phe	fenilalanina,
	Tyr	tirosina,
	Trp	triptófano,
25	Lys	lisina,
	Cys	cisteína,
	Betaala	ácido beta-alanina-N,N-diacético
	FFPE	incrustado en parafina y fijado con formaldehído
	SMD	detección de molécula individual
30	Agente de reticulación	un primer sustrato de una enzima con actividad oxidoreductasa
	BAM	Medio de agente de unión

Materiales y protocolos para la visualización de una diana proteica en muestra histológica (según los métodos descritos en ambos documentos WO2010094283 y WO201047680

1. Moléculas indicadoras:

35 1.1. Sin-Lys(Sin)-Lys(Sin)-L150-Lys(Flu) (0328-018/ D21047/D21067)

Se realiza la síntesis en fase de disolución tras síntesis en fase sólida de productos intermedios que portan grupos amino N-terminal libres y grupos amina de cadenas laterales de lisina libres. Se usó alfa-N-Boc-(épsilon-N-2-Cl-Z)-lisina para introducir residuos de lisina dando grupos épsilon-N-amino libres tras la escisión de la resina. El marcaje en fase de disolución es básicamente una ampliación de las técnicas en fase sólida, utilizando que los productos

intermedios de peso molecular relativamente alto pueden precipitarse casi cuantitativamente con dietil éter a partir de una disolución en TFA o NMP.

Se prepara Boc-(Lys(2-CI-Z))₃-L150-Lys(Fmoc) en fase sólida. Se elimina el grupo Fmoc, seguido por marcaje con fluoresceína tal como se describió anteriormente. El producto intermedio NH₂-((Lys(NH₂))₃-L150-Lys(Flu) resulta de la escisión de la resina. Se precipita con dietil éter, se disuelve en TFA, se precipita y luego se disuelve en NMP y se basifica con DIPEA. Se mezcla esta disolución con un volumen igual de 0,2 M ácido sinapínico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-cinámico) en NMP activado por HATU y DIPEA. Después de 10 min, se completa el marcaje y se “depura” adicionalmente el producto en bruto mediante la adición de etilendiamina hasta una concentración del 10% durante 5 minutos. Tras la precipitación con dietil éter, se disuelve además el producto en TFA y se precipita con dietil éter tres veces para retirar los residuos de bajo peso molecular. Antes de la “depuración” con etilendiamina, la espectroscopía de masas muestra dos clases de aductos (y combinaciones de los mismos): + (176)_n que indica ácidos ferúlicos extra (ésteres fenólicos en otros ácidos ferúlicos y fluoresceína) y +98 (aductos de N,N'-tetrametiluronio, asimismo en grupos fenólicos no protegidos). Estos se eliminan por completo mediante el tratamiento con etilendiamina, y asimismo se descomponen en ésteres activos y oligómeros de ácidos ferúlicos.

1.2. Fer-Lys(Fer)-Lys(Fer)-Lys(Fer)-L150-Lys(Flu) (D19185/D120068)

En 1 g de resina de MBHA con química en fase sólida convencional se preparó Boc-Lys(2CIz)-Lys(2CIz)-L₁₅₀-Lys(Fmoc). Se desprotegió la cadena lateral de lisina protegida con Fmoc, con piperidina al 20% en NMP (2 x 5min) y se sometió a marcaje de carboxilo repetido con fluoresceína (3 ml de 0,2 M en NMP, preactivado durante 2 min con 0,9 equi. de HATU, 1 equi. de DIPEA) 3 x 20 min. Se trató la resina con piperidina al 20% en NMP, luego se lavó con NMP, DCM y TFA. Se escindió el producto intermedio de la resina con TFA:TFMSA:tioanisol:m-cresol (6:2:1:1,3 ml, durante 1 h), se precipitó con dietil éter, se resuspendió en TFA, se precipitó con dietil éter, se resuspendió en NMP y se precipitó de nuevo con dietil éter. Se basificó con 200 µl de DIPEA y se disolvió directamente en 2 ml de ácido ferúlico 0,3 M preactivado con 0,9 equi. de HATU y 2 equi. de DIPEA. Después de 10 min. se precipitó el producto en bruto con dietil éter, se redisolvió en 1350 µl de NMP y se añadieron 150 µl de etilendiamina. Después de 2 min. se precipitó el producto con dietil éter. Se resuspendió en TFA, se precipitó con dietil éter, se disolvió en acetonitrilo al 25% en agua (24 ml) y se sometió a purificación por RP-HPLC.

Se describen otras moléculas indicadoras adecuadas (segundo sustrato de HRP) en el documento PCT/DK2010/000137 es decir moléculas indicadoras conjugadas descritas en las páginas 86-100 del documento WO2011047680 (PCT/DK2010/000137).

2. Agentes de unión:

2.1. Anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Dex70 conjugado con HRP (L348.111, fracciones 10-11).

Se hicieron reaccionar 11 nmol de dextrano de 70 kDA de PM con 484 nmol de HRP en 316 microlitros de tampón A (NaCl 100 mM, NaHCO₃ 25 mM, pH 9,5) durante 3 h a 40°C. Después de eso, 44 nmol de anticuerpo de cabra anti-conejo, 196 µL de agua al conjugado dextrano-HRP y se permitió que reaccionasen durante 1 h más a 40°C. Se extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 70 µL de cisteína 0,165 M durante 30 min y se purificó el producto en Sephacryl 300 (GE Medical) en tampón B (NaCl 100 mM, HEPES 10 mM pH 7,2). El producto eluido era un conjugado de dextrano que comprendía anticuerpo de cabra anti-conejo (GaR) y HRP. Se dividió el producto en 4 fracciones basándose en el tamaño de conjugado: Las primeras dos fracciones que contenían producto (frac. 8-9) eluyeron como un primer pico, que contenía presuntamente algunos conjugados reticulados, seguido luego por un hombro ancho que se dividía en las fracciones 10-11 (grandes conjugados homogéneos) y las fracciones 12-21 (conjugados variables más pequeños) y finalmente anticuerpos y enzimas sin conjugar en las fracciones 22-42. Las mediciones con fracciones de producto individuales, así como las fracciones que contenían anticuerpo no conjugado y HRP, mostraron una recuperación de conjugado total del 87%; razón dex:GaM:HRP = 1:0,96:10,9.

2-2. Anticuerpo de cabra anti-ratón-Dex70-HRP (D18033/D18175)

Se activaron 13,7 nmol de divinilsulfona con dextrano de 70 kDA de PM y se hicieron reaccionar con 602 nmol de HRP en 600 µL de tampón (NaCl 100 mM, NaHCO₃ 25 mM, pH 9,5) durante 3 h a 30°C. Luego se añadieron 41,1 nmol de anticuerpo de cabra anti-F(ab)₂ de ratón en 105 µL de agua, y se continuó con la reacción durante 16 h más. Se extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 70 µL de cisteína 0,165 M durante 30 min y se purificó el producto en Superdex 200 en NaCl 100 mM, HEPES 10 mM pH 7,2. El producto eluido era un conjugado de dextrano que comprendía anticuerpo de cabra anti-ratón (GaM) y HRP (razón dex:GaM:HRP = 1:1,1:7,5).

2.3. Anticuerpo anti-HER2 conjugado con Dex70 conjugado con HRP (021100, fracciones 9-10)

Se hicieron reaccionar 4,6 nmol de dextrano de 70 kDA de PM con 202 nmol de HRP en 125 microlitros de tampón A (NaCl 100 mM, NaHCO₃ 25 mM, pH 9,5) durante 3 h a 30°C. Después de eso, se añadieron 18 nmol de anticuerpo anti-Her2 en 489 µL de agua al conjugado dextrano-HRP y se permitió que reaccionase la mezcla durante 21 h más a 30°C. Se extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 70 µL de cisteína 0,165 M durante 30 min y se purificó el producto en Sephacryl 300 (GE Medical) en tampón B (NaCl 100 mM, HEPES 10 mM pH 7,2).

El producto eluido era un conjugado de dextrano que comprendía anticuerpo anti-Her2 y HRP. Se dividió el producto en 4 fracciones basándose en el tamaño de conjugado: Las primeras dos fracciones que contenían producto (frac. 7-8) eluyeron como un primer pico, que contenía presuntamente algunos conjugados reticulados, seguido luego por un hombro ancho que se dividía en las fracciones 9-10 (grandes conjugados homogéneos) y las fracciones 11-19 (conjugados variables más pequeños) y finalmente anticuerpos y enzimas sin conjuguar en las fracciones 20-41. Las mediciones con fracciones de producto individuales, así como las fracciones que contenían anticuerpo no conjugado y HRP, mostraron una recuperación de conjugado total del 68%. Suponiendo una proporcionalidad directa entre HRP y dextrano incorporado se mostró que las fracciones 9-10 contenían 9,1 HRP y 0,6 anticuerpos por dextrano. Sólo se usaron estas dos fracciones para los experimentos.

10 2.3. Anticuerpo anti-FITC conjugado con Dex70 conjugado con HRP (AMM 353-022 fracciones 8-11).

15 Se hicieron reaccionar 11 nmol de dextrano de 70 kDA de PM con 484 nmol de HRP en 316 microlitros de tampón A (NaCl 100 mM, NaHCO₃ 25 mM, pH 9,5) durante 3 h a 40°C. Después de eso, se añadieron 66 nmol de anticuerpo anti-FITC en 196 microL de agua al conjugado dextrano-HRP y se permitió que reaccionasen durante 1 h más a 40°C. Se extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 70 microL de cisteína 0,165 M durante 30 min y se purificó el producto en Sephacryl 300 (GE Medical) en tampón B (NaCl 100 mM, HEPES 10 mM pH 7,2). El producto eluido era un conjugado de dextrano que comprendía anticuerpo anti-FITC y HRP. Se dividió el producto en 3 fracciones basándose en el tamaño de conjugado: Las primeras fracciones (8-11) que contenían producto eluyeron como un primer pico, seguido luego por un hombro ancho (conjugados variables más pequeños, frac. 12-27) y finalmente anticuerpos y enzimas sin conjuguar en las fracciones 28-45. Las mediciones con fracciones de producto individuales, así como las fracciones que contenían anticuerpo no conjugado y HRP, mostraron una recuperación de conjugado total del 90%. Suponiendo una proporcionalidad directa entre HRP y dextrano incorporado se mostró que las fracciones 10-11 contenían 11,7 HRP y 0,8 anticuerpos por dextrano. Sólo se usaron estas dos fracciones para los experimentos.

25 2.4 Otros agentes de unión adecuados para los fines de presente invención se describen en el documento PCT/DK2010/000137, es decir las moléculas de agente de unión descritas en las páginas 100-106 del documento WO2011047680 (PCT/DK2010/000137).

3. *Primer sustrato*

Se usaron DAB, ácido ferúlico y ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (alfa-CHC) como primer sustrato en las siguientes condiciones:

	DAB	Ácido ferúlico	Alfa-CHC
Cantidad óptima (intervalo)	0,14 mM (0,1 mM – menos de 1 mM)	1,5 mM (de 0,5 mM a 5 mM)	5 mM (1,5 mM y 15 mM)
Cantidad óptima de H ₂ O ₂	1,5 mM	0,9 mM	0,6 mM
Tiempo de deposición óptimo	5-10 min	10-15 min	10-15 min
Segundo sustrato óptimo	Contiene Fer o Sin	Contiene Sin	Contiene Fer
Diámetro de punto	3-4 micrómetros	3-4 micrómetros	2-3 micrómetros

30 En comparación con DAB, se obtuvieron puntos de un diámetro similar con ácido ferúlico cuando se duplicó el tiempo de incubación; con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, el tiempo de incubación fue como para DAB, sin embargo los puntos fueron más pequeños (2-3 micrómetros de diámetro en comparación con 3-4 micrómetros para DAB).

4. *Medios de incubación*

35 Medio de agente de unión (BAM)

4-aminoantipurina al 0,1%, Procline al 0,2%, BSA al 2%, caseína al 0,2%, PEG al 2%, Tween20 al 0,1%, NaCl 0,1 M, HEPES 10 mM, pH 7,2. (tampón ABCPT)

5. Medio de deposición de indicador (RDM):

40 Imidazol HCl 50 mM pH 7,5, Nonidet P40 al 0,1%, cloruro de benzalconio al 0,1%, peróxido de hidrógeno al 0,005% (1,5 mM).

6. *Otros reactivos*

Disolución cromogénica de DAB (Dako K3465)
Disolución cromogénica de LPR (Dako K0640)
Contratinción de hematoxilina (Dako S3301)

Tampón de lavado (Dako S3306)
 Disolución de recuperación de diana (Dako S1699)
 Medios de preparación Dako Fairmount (S3025)

7. Instrumentos.

5 Autostainer Classic de Dako. Este instrumento es un instrumento para IHC automatizado totalmente abierto y programable libremente en el que pueden usarse y ajustarse a voluntad los reactivos y tiempos de incubación. El instrumento realiza cuatro acciones básicas

1. Aspira el reactivo.

2. Expulsa el tampón de lavado del portaobjetos colocado horizontalmente.

10 3. Dispensa el reactivo sobre el portaobjetos. (Conocido como "sip and spit" (*absorber y soltar*)).

4. Lavar un portaobjetos enjuagándolo con tampón de lavado.

Se describe un programa típico para un portaobjetos individual en el protocolo 1 (véase el ejemplo 1). Para todos los experimentos con SMD, las etapas de bloqueo con peroxidasa inicial y visualización de dianas se mantuvieron invariables.

15 Ejemplo 1. Cuantificación de una diana en una muestra histológica. Determinación de Kd1, Kd2 y Pr (método I)

Consideraciones teóricas:

Para definir varias entidades individuales de una diana en una muestra y, en particular, el número total de dichas unidades, por ejemplo moléculas de proteína diana individuales, pueden realizarse varios experimentos de equilibrio complejo, que emplean:

20 1. Varias muestras de referencia de un material de prueba con niveles idénticos, pero desconocidos, de una molécula de proteína inmovilizada, Pr. (por ejemplo, secciones en serie de un bloque individual de líneas celulares de referencia Her2 homogéneas);

2. Un anticuerpo primario, Ac1 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-HER2 de alta afinidad) con una constante de disociación desconocida, Kd1 que se une a dicha proteína,

25 3. Un anticuerpo secundario marcado con enzima, Ac2 con una constante de disociación desconocida, Kd2, que se une a dicho anticuerpo primario.

30 4. Tecnologías para visualizar casi cada molécula individual de dichos anticuerpos secundarios como puntos diferenciados distinguibles visualmente (denominados en el presente documento "puntos de molécula individual" o "SMD") (por ejemplo tal como se describe en el documento PCT/DK2010/000137 o en el presente documento).

Según la presente invención, el nivel de diana inmovilizada en una muestra, por ejemplo una proteína, puede expresarse como SMD contados por núcleo (por ejemplo en muestras de líneas celulares de referencia), o por área o volumen de una muestra de tejido, etc.; el número de moléculas puede traducirse a través del número de Avogadro en la concentración de dichas moléculas en la muestra.

35 Se acepta generalmente el marco teórico para la interacción anticuerpo-proteína es un equilibrio complejo. El anticuerpo alcanzará el equilibrio con la proteína diana:



Regido por la constante de disociación, Kd1 del anticuerpo:

$$\frac{[Ac1] \times [Pr]}{[Ac1:Pr]} = Kd1 \quad F2$$

40 En tales condiciones de equilibrio, la proteína total, PrTotal y el anticuerpo total, Ac1Total se distribuirán entre proteína libre y complejo y anticuerpo libre y complejo

$$PrTotal = Pr + Ac1:Pr \quad F3$$

$$Ac1Total = Ac1 + Ac1:Pr \quad F4$$

A partir de F2, se deduce:

$$[\text{Pr}] = \frac{[\text{Ac1} : \text{Pr}] \times \text{Kd1}}{[\text{Ac1}]} \quad \text{F5}$$

La sustitución de F5 en F3 proporciona:

$$\text{PrTotal} = \frac{[\text{Ac1} : \text{Pr}] \times \text{Kd1}}{[\text{Ac1}]} + [\text{Ac1} : \text{Pr}] \quad \text{F6}$$

F6 puede reorganizarse luego como sigue:

$$5 \quad \text{PrTotal} = [\text{Ac1} : \text{Pr}] \times \frac{\text{Kd1} + [\text{Ac1}]}{[\text{Ac1}]} \quad \text{F7}$$

10 El primer reto experimental reside en la determinación de cuándo se ha alcanzado este primer equilibrio. [Ac1:Pr] puede detectarse y determinarse mediante un segundo experimento de equilibrio posterior con Ac2 marcado con enzima seguido por visualización mediante SMD. La primera serie de experimentos, Exp1, puede usarse para establecer que una aplicación secuencial de una concentración constante de Ac1 a muestras con una cantidad constante de proteína inmovilizada dará como resultado eventualmente una cantidad constante de Ac1:Pr que se detectará en una segunda etapa de visualización posterior usando Ac2 marcado con enzima y detección SMD.

15 La necesidad de usar adiciones secuenciales múltiples de Ac1 surge del hecho de que una única adición de Ac1 a una muestra con proteína inmovilizada dará como resultado la formación del complejo Ac1:Pr, y por tanto una disminución de la concentración tanto de Ac1 como de Pr. El primer equilibrio puede alcanzarse aparentemente, pero deben usarse adiciones secuenciales de Ac1 a muestras de referencia idénticas hasta que se detecta un nivel constante de Ac1:Pr para tener acceso a cuándo se ha alcanzado un verdadero equilibrio que refleje la concentración de Ac1, es decir cuándo adiciones adicionales de Ac1 ya no darán como resultado que se detecte un aumento de Ac1:Pr. Una única adición o unas pocas adiciones de Ac1 darán como resultado equilibrios que reflejan la cantidad total de proteína en las muestras inmovilizadas en vez de la concentración de Ac1. Ac1 se agotará debido a la formación del complejo y la concentración eficaz en equilibrio será significativamente menor que la concentración de Ac1 aplicada.

Puede ignorarse la fórmula 4 que refleja los efectos de la disminución de la concentración de anticuerpo libre, si adiciones múltiples de anticuerpo confirman que no es el caso agotamiento o una cinética lenta.

25 La configuración experimental para confirmar la teoría anterior puede diseñarse tal como sigue: Se aplica secuencialmente una concentración constante de Ac1 a muestras con concentración constante de proteína inmovilizada. Posteriormente se detectan los complejos Ac1:Pr formados usando un anticuerpo secundario marcado con enzima y visualización mediante SMD. Por tanto, puede establecerse un verdadero equilibrio que refleja la concentración de Ac1, no la cantidad de proteína inmovilizada. (El experimento que confirma esta teoría se describe a continuación en el experimento 3a, que muestra que, después de cuatro a cinco incubaciones de 10 min 30 secuenciales de muestras de referencia con Ac1 no se detecta un aumento adicional de los complejos Ac1:Pr).

La teoría subyacente a la segunda etapa de equilibrio complejos idéntica a la teoría referente a la primera (comentado anteriormente).

Se establece el segundo equilibrio entre el anticuerpo secundario marcado con enzima y el complejo anticuerpo primario inmovilizado-proteína:



Regido por la constante de disociación, Kd2 del anticuerpo secundario marcado:

$$\frac{[\text{Ac2}] \times [\text{Ac2} : \text{Pr}]}{[\text{Ac2} : \text{Ac1} : \text{Pr}]} = \text{Kd2} \quad \text{F9}$$

$$\text{Ac1:PrTotal} = \text{Ac1:Pr} + \text{Ac2:Ac1:Pr} \quad \text{F10}$$

$$\text{Ac2Total} = \text{Ac2} + \text{Ac2:Ac1:Pr} \quad \text{F11}$$

40 A partir de F9, se deduce:

$$[\text{Ac1Pr}] = \frac{[\text{Ac2} : \text{Ac1} : \text{Pr}] \times \text{Kd2}}{[\text{Ac2}]} \quad \text{F12}$$

La sustitución de F12 en F10 proporciona:

$$Ac1 : PrTotal = \frac{[Ac2 : Ac1 : Pr] \times Kd2}{[Ac2]} + [Ac2 : Ac1 : Pr] \quad F13$$

F13 puede reorganizarse luego para dar F14

$$Ac1 : PrTotal = [Ac2 : Ac1 : Pr] \times \frac{Kd2 + [Ac2]}{[Ac2]} \quad F14$$

- 5 Este segundo equilibrio sólo puede establecerse si la concentración de Ac1:Pr permanece esencialmente constante durante el segundo experimento de equilibrio, es decir que no tiene lugar una disociación significativa entre proteína y anticuerpo primario durante las etapas de lavado y la incubación con anticuerpo secundario marcado con enzima. Si se cumple esta condición, es posible sustituir Ac1:PrTotal de la fórmula 14 por [Ac1:Pr] de la fórmula 7.

Esto proporciona la siguiente ecuación (fórmula 15):

$$10 \quad PrTotal = [Ac2 : Ac1 : Pr] \times \frac{Kd1 + [Ac1]}{[Ac1]} \times \frac{Kd2 + [Ac2]}{[Ac2]} \quad F15$$

- La fórmula 15 puede considerarse como el fundamento teórico de los experimentos de recuentos absolutos, es decir experimentos en los que se determina el número total de moléculas dianas en una muestra, debido a que describe una relación entre Kd1 y Kd2, que puede determinarse en experimentos de equilibrio en relación con las titulaciones de anticuerpos, y la concentración de proteína total y los complejos de la proteína con los anticuerpos que se visualizan como puntos.

- Estos experimentos pueden realizarse tal como sigue: Se aplica secuencialmente una concentración constante de Ac1 muestras con concentración constante de proteína inmovilizada. Posteriormente se detectan los complejos Ac1:Pr formados usando un anticuerpo secundario marcado con enzima y visualización mediante SMD. El anticuerpo secundario marcado con enzima (una cantidad constante del mismo) se aplica asimismo secuencialmente múltiples veces. El experimento que confirma esta teoría (descrito en el experimento 3b) ha mostrado que después de cuatro a cinco incubaciones de 10 min secuenciales de Ac2 marcado con enzima con muestras de referencia equilibrado previamente con anticuerpo primario, no se detecta un aumento adicional de la formación de complejos Ac2:Ac1:Pr, ni una disminución (que resulta potencialmente de una disociación significativa de proteína-Ac1 durante las etapas de lavado y el establecimiento del segundo equilibrio). Por tanto, puede establecerse un verdadero equilibrio que refleja la concentración de proteína inmovilizada, [Ac1] y [Ac2] marcado con enzima que confirma la ecuación de la fórmula 15.

- Por los mismos motivos comentados para la fórmula 4, ahora puede ignorarse la fórmula 11. Los efectos de la disminución de la concentración de anticuerpo marcado con enzima secundario libre pueden ignorarse si adiciones múltiples de este anticuerpo confirman que no es un problema el agotamiento o una cinética lenta.

- 30 Pueden incubarse de manera rutinaria muestras de tejido con un nivel de concentración de proteína desconocido, con anticuerpos primarios para determinar dicha concentración de proteína desconocida. Esta etapa puede estar seguida por etapas de incubación con anticuerpo secundario marcado con enzima seguidas por, todavía, etapas de visualización extra.

- 35 Como norma, en procedimientos de tinción para IHC de rutina, sólo se usan incubaciones individuales con anticuerpos primarios y secundarios, y una agitación física, o bien no controlada (debido a la gravedad, evaporación o efecto mecha) o bien controlada mediante agitación activa de reactivos en el portaobjetos, es una práctica establecida. Sin embargo, usando mezclado y/o concentraciones relativamente altas de anticuerpo tanto primario como secundario, pueden alcanzarse condiciones de pseudoequilibrio mediante una única aplicación de reactivo, dando como resultado resultados reproducibles (esto es cómo funcionan ahora los sistemas de tinción histológica bien conocidos, por ejemplo el sistema Envision). Adiciones consecutivas de un reactivo de anticuerpo (primario o secundario marcado con enzima) dan como resultado equilibrios relativamente estables, y por tanto también pueden actuar como salvaguarda frente al agotamiento del anticuerpo y permiten, a diferencia de la tinción para IHC tradicional, la evaluación precisa de la cantidad de la diana en una muestra para IHC.

- 45 Tal como se describe en los experimentos a continuación, la necesidad de usar bajas cantidades de anticuerpo primario de alta afinidad surge del bajo valor de Kd1 del clon de Her2 sometido a prueba en combinación con la necesidad de usar concentraciones inferiores a Kd1 para medir Kd1. Para el uso de rutina, puede usarse una concentración muy inferior a Kd1, reduciendo la necesidad de adiciones múltiples. En caso del anticuerpo secundario, es la necesidad de reducir el solapamiento de puntos lo que impide el uso de una mayor concentración. A mayores concentraciones, los puntos solapantes pueden impedir un recuento de puntos exacto, al menos cuando

el recuento se realiza manualmente.

5 Cuando se cumplen las condiciones de tinción que conducen a la formación de SMD no solapantes, puede contarse SMD como Pr, y, si PrTotal puede mantenerse constante (por ejemplo en caso de uso de secciones secuenciales del mismo material de referencia), experimentos con [Ac1] variable y [Ac2] constante permitirán determinar Kd1; PrTotal y Kd2 seguirán siendo desconocidos, pero constantes. Esto permite la reorganización de la fórmula 15 para dar fórmula 16:

$$\text{Puntos} = \text{Constante} \times \frac{[\text{Ac1}]}{\text{Kd1} + [\text{Ac1}]} \quad \text{F16}$$

10 La constante (C) refleja el valor de PrTotal de la muestra y la fracción de complejos Ac1:Pr que se detectan en la segunda reacción de equilibrio con [Ac2] constante. Y es el número absoluto de puntos que pueden detectarse en esas condiciones. La ecuación de F16 significa que a [Ac1] alta y creciente, el número de puntos se aproximará, pero nunca alcanzará un nivel constante. A [Ac1] baja y decreciente, el número de puntos, que es una función hiperbólica de [Ac1], se aproximará a una función lineal de [Ac1].

15 El número de puntos en función de [Ac1] es una función hiperbólica, y se usa la fórmula 16 para determinar Kd1 mediante el ajuste de los datos experimentales que correlacionan los puntos con [Ac1] en los experimentos con material de referencia constante y [Kd2] constante. Sin embargo, el uso de adiciones secuenciales de Ac1 a concentraciones próximas a Kd1 permite de manera reproducible la determinación exacta de Kd1 mediante un ajuste excelente a la fórmula 16.

20 La configuración experimental que permite la determinación de Kd2 es ligeramente más compleja. El reto es que concentraciones de anticuerpo secundario marcado con enzima que son próximas a Kd2 conducirán invariablemente a la formación de puntos cuyo número será demasiado alto como para contarlos debido a problemas de solapamiento. El uso de una concentración muy baja de anticuerpo primario y/o el uso de material de referencia con una baja concentración de proteína no sería una solución, ya que el fondo de altas concentraciones de anticuerpo secundario proporcionarían un ruido de fondo muy alto debido a anticuerpos secundarios unidos de manera inespecífica, por tanto no reflejaría exactamente la concentración de proteína. Esto se complica además por las dificultades al establecer el equilibrio a concentraciones muy bajas de anticuerpo primario. Un enfoque para superar estos retos es usar anticuerpo tanto primario como secundario en concentraciones relativamente altas, en caso del anticuerpo secundario con concentraciones alrededor de Kd2, y visualizar el anticuerpo secundario unido mediante IHC convencional. Por IHC convencional quiere decirse que se usan los anticuerpos secundarios marcados con enzima para generar un depósito de color marrón de 3,3'-diaminobencidina (DAB), por ejemplo usando el sistema Envision, en vez de visualización mediante SMD. La intensidad de tales depósitos de DAB convencionales no es lineal y no refleja correctamente la cantidad de moléculas de una diana en la muestra, sin embargo la intensidad de dos depósitos puede compararse visualmente y determinarse que son aproximadamente de la misma intensidad. En efecto, esto es cómo se interpretan en la actualidad los resultados de tinción para IHC: se evalúan comparando la intensidad del depósito marrón en muestras de prueba y muestras de referencia y siguiendo las directrices gráficas o descriptivas para la interpretación.

35 Usando material de referencia idéntico, PrTotal (de F15) puede mantenerse constante. Si [Ac1] y [Ac2] son también constantes, y Ac2:Ac1:Pr se visualiza mediante IHC convencional como un depósito marrón, la tinción será de intensidad constante. Evidentemente, la intensidad tiene que estar dentro del intervalo dinámico de IHC convencional de modo que se reflejen variaciones en Ac2:Ac1:Pr en la intensidad variable del depósito marrón. Normalmente se puntúan los portaobjetos para IHC en una escala: +0 (sin color en absoluto), +1 (intensidad débil), +2 (intensidad moderada), y +3 (la mayor intensidad/negro pardo). Para que refleje exactamente [Ac1:Ac2:Pr], la puntuación debe estar dentro del intervalo de +0,5 a + 2,5, de modo que se detecte la variación ascendente o descendente, y, preferiblemente, dentro del intervalo de +1 a +2, en el que la variación de intensidad en función de [Ac1:Ac2:Pr] es la más pronunciada y el ruido de fondo es mínimo.

45 Habiéndose establecido un sistema de referencia en el intervalo dinámico deseado (es decir dentro de +1 a +2 y [Ac2] alrededor de [Kd2]), el experimento 3d (descrito a continuación) se lleva a cabo usando una menor concentración constante de Ac1, [Ac1]₂ con concentración variable y creciente de Ac2 con relación al experimento de referencia inicial.

50 Aumentando [Ac2], la concentración de [Ac2:Ac1:Pr] alcanzará en cierto momento un nivel idéntico al nivel de referencia establecido previo, dando como resultado una intensidad idéntica del depósito marrón. Cuando la intensidad de los depósitos de DAB marrones de intensidad idéntica a la del depósito formado con [Ac1]₁ y [Ac2]₁, ha de concluirse que:

$$[\text{Ac2:Ac1:Pr}]_1 = [\text{Ac2:Ac1:Pr}]_2$$

55 Por tanto, se han alcanzado los niveles de tinción idénticos por dos combinaciones diferentes de [Ac1] y [Ac2] y PrTotal constante. Se deduce la ecuación:

$$\frac{Kd1 + [Ac1]_1}{[Ac1]_1} \times \frac{Kd2 + [Ac2]_1}{[Ac2]_1} = \frac{Kd1 + [Ac1]_2}{[Ac1]_2} \times \frac{Kd2 + [Ac2]_2}{[Ac2]_2}$$

Como se conoce Kd1, así como [Ac1]₁ y [Ac1]₂ a partir de las condiciones experimentales, la ecuación puede reducirse a la fórmula 17 (C1 y C2 son constantes):

$$C_1 \times \frac{Kd2 + [Ac2]_1}{[Ac2]_1} = C_2 \times \frac{Kd2 + [Ac2]_2}{[Ac2]_2} \quad F17$$

5 Dividiendo entre C₁ proporciona:

$$\frac{Kd2 + [Ac2]_1}{[Ac2]_1} = C_3 \times \frac{Kd2 + [Ac2]_2}{[Ac2]_2} \quad F18$$

La fórmula 18 puede reorganizarse para mostrar el aislamiento de Kd2:

$$(Kd2 \times [Ac2]_2) + ([Ac2]_1 \times [Ac2]_2) = (C_3 \times Kd2 \times [Ac2]_1) + (C_3 \times [Ac2]_1 \times [Ac2]_2)$$

que puede reducirse a:

$$10 \quad Kd2 = \frac{(1 - C_3) \times ([Ac2]_1 \times [Ac2]_2)}{(C_3 \times [Ac2]_1) - [Ac2]_2} \quad F19$$

Donde C₃ (que es igual a C₂/C₁, véase anteriormente) está definido por:

$$C_3 = \frac{(Kd1 + [Ac1]_2) \times [Ac1]_1}{[Ac1]_2 \times (Kd1 + [Ac1]_1)} \quad F20$$

15 C₃ se refiere a dos funciones hiperbólicas una encima de otra que refleja un nivel constante de la tinción marrón que se deriva de dos conjuntos diferentes de condiciones experimentales: en primer lugar, se establece un nivel de referencia al alcanzar un primer equilibrio que refleja [Ac1]₁ y [Ac2]₁; luego, se alcanza el mismo nivel de referencia usando [Ac1]₂ y [Ac2]₂. Se conoce Kd1, por tanto puede determinarse Kd2.

Puede producirse un nivel de referencia de la intensidad de tinción convencional usando [Ac1]₁ y [Ac2]₁. Usando una concentración diferente de Ac1, [Ac1]₂ permite la titulación de [Ac2] hasta que se alcanza un nivel de intensidad tinción idéntica por [Ac2]₂. Esto permite la determinación de Kd2 a partir de la fórmula 19.

20 Volviendo a la fórmula 15 original, habiendo determinado Kd1 y Kd2, cualquier experimento de tinción con SMD que satisfaga la condición de alcanzar el equilibrio en ambas etapas y que permita un recuento exacto de puntos SMD, permitirá la determinación de PrTotal en la(s) muestra(s) de referencia usadas.

Cualquier muestra de referencia, en la que se haya determinado PrTotal de este modo, obtiene un estatus de "referencia absoluta".

25 El número absoluto de proteínas (o cualquier otro compuesto diana inmovilizado) en la muestra inmovilizada se ha contado y puede expresarse en términos absolutos tales como moléculas por área/volumen/célula etc. dependiendo de la naturaleza de la muestra inmovilizada.

Evidencias experimentales

30 Como material de prueba, se usaron secciones en serie de sedimentos de las líneas celulares incrustadas en parafina y fijadas con formalina sk45, df45, df23 que expresan Her2 (estas líneas celulares se denominarán además la línea celular 0+, la 1+ y la 3+, de manera correspondiente). Estas líneas celulares son el material de control 0+, 1+ y 3+ para HercepTest de Dako aprobado por la FDA para cáncer de mama. Se incrustaron los sedimentos de las líneas celulares en un bloque individual de parafina para proporcionar secciones en las que las que estaban todas las líneas celulares presentes. La elección del material de prueba refleja la disponibilidad del material (por ejemplo, cada bloque individual proporciona cientos de secciones en serie, la presencia de tres muestras celulares diferentes en cada portaobjetos de prueba permite una intercorrelación entre los resultados de un procedimiento de tinción de

tres muestras de prueba diferentes).

5 Los portaobjetos con secciones FFPE de bloques que contienen las tres líneas celulares (denominados además “los portaobjetos”) se desparafinaron mediante emersión en xileno (2 x 5 min) seguido por etanol al 96% (2 x 2 min) y etanol al 70% (2 x 2 min). Luego, se lavaron los portaobjetos con agua desionizada y se transfirieron a disolución de recuperación de diana, o bien la disolución de alto pH (Dako S2375), diluida 10x (ejemplos 1 y 2 con anticuerpo anti-citoqueratina) o bien la disolución de bajo pH (Dako S1700) (véanse los ejemplos 10.3-10.8 a continuación). Luego se calentaron los portaobjetos a ebullición en un horno de microondas (aprox. 5 min) y se dejaron en ebullición suave durante 10 min. Más tarde, se permitió que se enfriaran los portaobjetos durante min 20 min y luego se transfirieron a un tampón de lavado (Dako S3006) diluido 10x.

10 Se usó anticuerpo anti-citoqueratina pan-específico (Dako M3515, de ratón monoclonal) tanto como concentrado como disolución diluida. Se prepararon diluciones de anticuerpos basándose en la concentración de proteína total (indicada en cada vial) y considerando el peso molecular del anticuerpo (150 kDa/mol). Este anticuerpo se denomina además “anticuerpo anti-citoqueratina”.

15 El anticuerpo anti-Her2 era un anticuerpo de conejo monoclonal (Dako clon 25-11-3). Se prepararon diluciones basándose en la concentración de proteína total calculada en una disolución concentrada y el peso molecular del anticuerpo de (150 kDa/mol). El anticuerpo se denomina en el presente documento “anticuerpo anti-HER2”.

Protocolo de tinción 1

Bloqueo con peroxidasa, 5 min en Dako S2023

Lavado

20 (a) Formación de sitios diana:

Anticuerpo primario,
Lavado
Anticuerpo secundario marcado con HRP.
Lavado.

25 (b) Formación de punto de indicador de depósitos en los sitios diana

Incubación de muestras (a) 10 minutos con 0,28 mM DAB y 5 µM indicador (D21047) en RDM.
Lavado

c) Detección de puntos de los depósitos de indicador en los sitios diana individuales

30 *Anticuerpo anti-FITC-AP, 10 min, D20036 20 nM en BAM*
Lavado
LPR, 10 min, Dako K0640
Lavado

d) Contratinción con hematoxilina

35 *Hematoxilina, 5 min*
Lavado con agua desionizada

f) Preparación

40 Pueden introducirse lavados adicionales en el protocolo automatizado. El temporizador automatizado mantendrá el tiempo de protocolo global al mínimo, reduciendo la duración de las etapas de lavado al mínimo; sin embargo, la duración de las etapas de lavado dependerá de la carga del instrumento. Si está programado para teñirse un único portaobjetos, podría reducirse una etapa de lavado individual a 20 segundos, mientras que una carga completa de 48 portaobjetos aumenta significativamente el tiempo de lavado. Para mantener al mínimo esta variación de tiempo, se tiñeron 10 portaobjetos en promedio en cada ejecución. Por consiguiente, se mantuvo la duración de la etapa de lavado en aproximadamente 2 min por etapa. Múltiples lavados tras la deposición del indicador y la incubación de los depósitos con anticuerpo anti-FITC-AP garantiza una tinción de fondo con LPR mínima. A pesar de la amplificación masiva (se estima que cada punto rojo derivado de una única molécula de anticuerpo-dextrano-HRP unida a la diana comprende en promedio 100 mil millones de moléculas de LPR) no puede detectarse prácticamente fondo.

Podría recomendarse un lavado extra para alcanzar el mayor nivel de amplificación y la menor tinción de fondo, mientras que se usan el indicador y agente de unión a indicador en cantidades relativamente altas.

Evaluación de la tinción

50 El recuento de punto se realizaba inicialmente de forma manual, mediante inspección visual de portaobjetos teñidos

y sus imágenes. Se realizó un análisis de imágenes automatizado usando el software libre JMicrovision vs. 1.27. En una realización a modo de ejemplo, se contaron automáticamente puntos rojos de LPR producidos tal como se describe y los núcleos teñidos con hematoxilina. Se verificaron los recuentos automatizados mediante inspección visual y recuentos manuales. La segmentación y abstracción de objetos pudo basarse en el matiz solo en el espacio de color de matiz, saturación, intensidad (HSI), es decir se fijaron tanto la intensidad como la saturación al intervalo completo de 0-255. Se fijó el matiz de punto a 188(violeta)-255 y 0-16 (naranja), el matiz nuclear a 76 (verde) a 163 (azul). Se potenció el contraste punto-núcleo mediante sobreexposición de rojo (1,2), verde neutro (1,0) y subexposición de azul (0,56) durante la captura de imágenes realizada con un microscopio Olympus BX51 dotado de una cámara DP50 de 5,5 megapíxeles y el software de captura de imágenes CellID.

5

10 Experimento 1. Determinación de Kd de anticuerpo anti-citoqueratina

Se pretrataron 8 portaobjetos con secciones FFPE de líneas celulares +0, +1 y +3 y se tiñeron tal como se describió anteriormente (véase el pretratamiento y el protocolo 1).

Se aplicó el anticuerpo primario (anti-citoqueratina) durante 20 min en concentraciones variables tal como se describe en la tabla:

Número de portaobjetos	Concentración de M3115 en BAM
1	40 nM
2	33 nM
3	25 nM
4	20 nM
5	13 nM
6	10 nM
7	5 nM
8	2,5 nM

15 Luego se prepararon los portaobjetos con Faramount acuoso. Se capturaron 3 imágenes de cada sedimento de línea celular en cada portaobjetos, se contaron manualmente los puntos de color rojo en cada imagen y se comparó el número de puntos contados con un número de puntos calculado teóricamente en las muestras.

Suponiendo que una molécula anti-citoqueratina (cAc) se asocia con un punto, puede calcularse el número de puntos teórico (Npunto) usando la siguiente fórmula

20

$$N_p = \frac{[cAc_c] \times N_{punto_{m\acute{a}x}}}{K_d + [cAc]} \quad (\text{F\acute{o}rmula 1})$$

donde [cAc] es la concentración de anticuerpo anti-citoqueratina, y Kd es la constante de disociación del anticuerpo anti-citoqueratina, es decir cAc, y Npunto_{máx} es una constante.

25

La constante nombrada como Npunto_{máx} significa el número máximo de puntos y en el presente contenido significa que el número de puntos se aproxima al valor máximo cuando la concentración usada de un anticuerpo es significativamente inferior a su valor de Kd, es decir cuando el anticuerpo anti-citoqueratina se usa a una concentración que está mucho más allá que el valor de Kd.

30

Esta fórmula se deriva de la fórmula para las constantes de disociación para los anticuerpos primarios y secundarios con el requisito previo de que la concentración absoluta de proteína en cada muestra de prueba (es decir, muestras de células +0, +1 y +3, 8 portaobjetos de cada línea celular con diferentes concentraciones del anticuerpo tal como se indica en la tabla a continuación) es constante y la concentración del anticuerpo secundario se mantiene invariable entre los portaobjetos.

La tabla (1) muestra el número de puntos obtenidos experimentalmente y calculados teóricamente para cada muestra 1-8 para las tres líneas celulares de prueba:

Portaobjetos	Concen- tración de anticuerpo primario, nM	Puntos contados y calculados, total de 3 imágenes en línea celular +0		Puntos contados y calculados, total de 3 imágenes en línea celular +1		Puntos contados y calculados, total de 3 imágenes en línea celular +3	
		contados	calculados	contados	calculados	contados	calculados
1	2,25	165	170	318	316	376	389
2	5	293	292	445	542	627	667
3	10	384	411	731	765	879	941
4	13,3	487	458	920	851	1043	1048
5	20	502	518	968	962	1140	1185
6	25	581	547	1026	1015	1333	1250

7	30	669	567	1159	1054	1546	1297
8	40	629	595	1269	1106	1663	1361

Mediante el ajuste de las curvas generadas a partir de la fórmula a las curvas generadas a partir de los datos experimentales, pueden determinarse valores aproximados de K_d1 y $N_{punto_{máx}}$. Por tanto, se fijó K_d1 a 7nM, para las tres series calculadas, $N_{punto_{máx}}$ a 700 (+0), 1300 (+1) y 1600 (+3).

5 Un valor de K_d de 7 nM concuerda bien con el recuento experimental a lo largo de las tres líneas celulares. En caso de las líneas celulares +1 y +3, los valores calculados son ligeramente inferiores a los valores medidos para altas concentraciones de anticuerpo. El anticuerpo anti-citoqueratina M 3515 tiene una amplia especificidad y reconoce varios subtipos de citoqueratina diferentes. Teóricamente, para cada subtipo de citoqueratina, el anticuerpo puede tener una K_d ligeramente diferente puesto que los alrededores del antígeno pueden ser diferentes y puede influir en la unión al anticuerpo. Esto explica un "ajuste no perfecto" con la curva hiperbólica. Además, que podría tener lugar
10 cierta unión inespecífica a concentraciones muy por encima del valor de K_d .

Conclusión

15 Puede considerarse que la cuantificación realizada es precisa porque pueden compararse directamente los resultados de los experimentos en los que se usaron diferentes portaobjetos y diferentes líneas celulares, es decir el patrón de tinción de puntos proporciona una evaluación cuantitativa digitalizada fácil y rápida de muestras, es decir mediante el recuento de puntos visualmente distintos, por ejemplo 600 puntos son fácilmente distinguibles de 300 puntos en otra muestra.

20 El valor de K_d del anticuerpo secundario usado (D20168) no se conoce, y se ha mostrado que se alcanza un equilibrio en esta etapa de unión por afinidad, sin embargo experimentos de control mostraron que una incubación adicional con anticuerpo primario (tiempo de incubación prolongado y porciones adicionales de anticuerpos) no condujo a un aumento significativo de la señal. Por tanto, si se reconoce una fracción constante de anticuerpos primarios por el anticuerpo secundario durante el experimento, esto último tiene no influencia sobre la medición de la K_d . Usando múltiples aplicaciones de anticuerpos secundarios, puede producirse el doble de puntos. En estas aplicaciones, también se duplica el número máximo de puntos por portaobjetos ($N_{punto_{máx}}$), pero esto no influye en la medición de la K_d .

Experimento 2. Determinación de K_d de un segundo agente de unión (conjugado anticuerpo de cabra anti-ratón-dextrano-HRP (D20168).)

Se realizó este experimento usando tinciones para IHC convencionales (sistema Envision de Dako).

Se pretrataron los portaobjetos tal como se describe, y se sometieron al siguiente protocolo de tinción 2:

1. Bloqueo con peroxidasa, 5 min

30 Lavado

2. Anticuerpo anti-citoqueratina, 20 min en medios de incubación 1

Lavado

3. Anticuerpo secundario marcado con HRP (D20168), 20 min en medios de incubación 1

Lavado

- 35 4. Disolución cromogénica de DAB, 10 min

Lavado

5. Tinción de hematoxilina, 5 min

Lavado con agua

Lavado

40 Lavado con agua desionizada.

Se dividieron 12 muestras de cada una de las tres líneas celulares_(+0, +1 y +3) en dos series, en las que se incubaron seis de los portaobjetos de la primera serie con anticuerpo anti-citoqueratina 2,5 nM y se incubaron además con 6 concentraciones diferentes de D20168 (100 nM, 50 nM, 25 nM, 15 nM, 10 nM y 5 nM), y se incubaron seis portaobjetos de la segunda serie con anticuerpo anti-citoqueratina 10 nM y se incubaron además con 6
45 concentraciones diferentes de D20168 (100 nM, 50 nM, 25 nM, 15 nM, 10 nM y 5 nM). Entonces se tiñeron los portaobjetos de ambas series con DAB (como cromógeno) y hematoxilina según el protocolo anterior.

Para las tres líneas celulares, la intensidad de tinción aumentó con concentración creciente, pero se niveló dentro

del intervalo dinámico de la tinción para IHC (por debajo de una puntuación de +2,5).

5 Tal como se esperaba, el uso de una mayor concentración de anticuerpo primario dio como resultado mayores intensidades de tinción. Se comparó la tinción del portaobjetos tratado con anticuerpo anti-citoqueratina 2,5 nM y D20168 100 nM (denominado además portaobjetos A) (de cada línea celular) con la tinción de los portaobjetos con anticuerpo anti-citoqueratina 10 nM (dentro de cada línea celular). Se usaron dos observadores simulados independientes para estimar la intensidad de tinción. Encontraron que para las tres líneas celulares, la intensidad de tinción del portaobjetos A era idéntica a la intensidad de tinción del portaobjetos tratado con anticuerpo anti-citoqueratina 10 nM y D20168 15 nM (el portaobjetos B). Dado que el material de referencia era constante (mismos portaobjetos de control de línea celular) y se observó aproximadamente la misma intensidad de tinción en los
10 portaobjetos tratados con diferentes cantidades del anticuerpo primario y secundario, se concluyó que el número de complejos citoqueratina-anticuerpo anti-citoqueratina-D20168 presentes en los portaobjetos A y B (dentro de una línea celular) era el mismo. Por consiguiente, pudo usarse la siguiente ecuación para calcular la Kd (es decir, Kd2) del anticuerpo secundario de D2068:

$$Kd2 = \frac{(1 - C_3) \times ([Ac2]_1 \times [Ac2]_2)}{(C_3 \times [Ac2]_1) - [Ac2]_2}$$

15 donde C₁, C₂ y C₃; [Ac1]₁ = 2,5 nM, [Ac1]₂ = 10nM, [Ac2]₁ = 100 nM, [Ac2]₂ = 15 nM,

y donde C3 se definió a partir de la siguiente ecuación:

$$C_3 = \frac{C_2}{C_1} = \frac{(Kd1 + [Ac1]_2) \times [Ac1]_1}{[Ac1]_2 \times (Kd1 + [Ac1]_1)}$$

Por tanto, se calculó que la Kd2 de D20168 era de 25 nM.

Experimento 3a: Establecimiento de condiciones de equilibrio para anticuerpo primario contra HER2.

20 Debido a un bajo valor de Kd (es decir, alta afinidad) para el clon de anticuerpo contra HER2 sometido a prueba, los intentos iniciales para determinar el valor de Kd mediante medios similares a los del ejemplo 1 podrían proporcionar resultados que no ajustarían bien con las condiciones de equilibrio: una única aplicación de concentraciones muy bajas (100 pM) del anticuerpo primario puede conducir a la formación de un equilibrio incompleto. Por tanto, para definir y garantizar las condiciones de condiciones de equilibrio para los anticuerpos contra HER2, se aplicaron
25 adiciones secuenciales del anticuerpo primario a las muestras de las tres líneas. Los portaobjetos tratados con la menor concentración (100 pM) del anticuerpo, en los que se esperaba que los problemas de agotamiento de anticuerpo y equilibrio incompleto fueras los más graves, se trataron también con dos adiciones secuenciales de altas concentraciones del anticuerpo secundario, para compensar el agotamiento en la etapa con anticuerpo primario.

30 Se realizó la tinción según el protocolo 1 con las concentraciones, tiempos de incubación y número de adiciones secuenciales específicos para los anticuerpos primarios y secundarios, tal como sigue.

- anticuerpo contra HER2 100 pM, 1-6 incubaciones secuenciales, 10 minutos cada una:

Número de portaobjetos	Número de adiciones
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6

Siguió un lavado a cada adición (antes de la siguiente adición);

35 - Anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con HRP 5 pM (L348-11 frac. 9-10), dos incubaciones secuenciales, 10 min cada una.

Se tomaron tres imágenes (aumento 10x) de cada muestra de línea celular +0 y +1 y se contó el número de puntos SMD por núcleo. No se consideraron las muestras de la línea celular 3+ debido a una tinción muy intensa que no permitió un recuento exacto de los puntos. Se presentan los resultados en la tabla 2 a continuación:

Adiciones de anticuerpo anti-HER2	Puntos/núcleo (0+) (serie 1 de la figura 5)	Puntos/núcleo (0+) (serie 2 de la figura 5)
1	0,158	0,407

2	0,258	0,665
3	0,305	1,031
4	0,42	1,309
5	0,532	1,536
6	0,532	1,513

A partir de los resultados del experimento, se concluyó que se requieren al menos 5 adiciones de la disolución de anticuerpo primario contra HER2, si la cantidad del anticuerpo es de 100 pM, para evitar el agotamiento y establecer una condición de verdadero equilibrio en las muestras sometidas a prueba.

Experimento 3b: Establecimiento de condiciones de equilibrio para anticuerpo secundario.

5 Para definir las condiciones de equilibrio para el anticuerpo secundario, se usó una alta concentración del anticuerpo primario contra HER2 en la primera etapa del procedimiento que se esperaba que proporcionase un alto nivel de anticuerpo primario unido a la diana, y se realizó una serie de aplicaciones de baja concentración del anticuerpo secundario (L348-111, fracciones. 9-10), en la que se esperaba que el agotamiento del anticuerpo fuese el más grave, en la segunda etapa del procedimiento.

10 Se realizó la tinción según el protocolo 1 con las concentraciones, tiempos de incubación y número de adiciones específicos para los anticuerpos primarios y secundarios descritos a continuación:

- anticuerpo contra HER2 500 pM, 2 adiciones secuenciales, 10 min cada una;

Lavado

- L348-111 5 pM, 1-5 adiciones secuenciales, 10 min cada una:

Número de portaobjetos	Número de adiciones
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

15 Se aplicó un lavado después de cada adición, antes de la siguiente adición.

Se tomaron tres imágenes (aumento 10x) de cada muestra celular +0 y +1 y se contó el número de puntos SMD por núcleo. No se consideraron las muestras de la línea celular 3+ debido a una tinción muy intensa que no permitió un recuento exacto de los puntos.

Adiciones de anticuerpo anti-HER2	Puntos/núcleo (0+) (serie 1 de la figura 5)	Puntos/núcleo (0+) (serie 2 de la figura 5)
1	0,077	0,327
2	0,083	0,609
3	0,195	0,889
4	0,318	1,216
5	0,364	1,21

20 A partir de los resultados del experimento, se concluyó que se requerían al menos 5 adiciones de L348-111 1,5 pM, frac. 9-10 para alcanzar el equilibrio.

Experimento 3c: Determinación del valor de Kd del anticuerpo anti-HER2.

25 A partir de los ejemplos 3a y 3b, se ha sabido que se requerían 6 adiciones secuenciales de anticuerpo contra HER2 100 pM y posteriormente 5 adiciones de L348-111 5 pM para alcanzar las condiciones de equilibrio y medir los valores de Kd. Por consiguiente, se realizó la tinción mediante SMD de 12 portaobjetos de muestras de las tres líneas celulares según el protocolo 1 con las concentraciones, tiempos de incubación y número de adiciones específicos para los anticuerpos primarios y secundarios tal como se describe a continuación:

- 6 concentraciones del anticuerpo contra HER2, 6 adiciones secuenciales, 10 minutos cada una:

Número de portaobjetos	Número de adiciones
1 y 2	100 pM
3 y 4	200 pM
5 y 6	300 pM
7 y 8	400 pM
9 y 10	500 pM
11 y 12	1 nM

Se aplicó una etapa de lavado después de cada adición y antes de la siguiente;

- L348-111 5 pM, 5 adiciones secuenciales, 10 min cada una.

5 Se tomaron tres imágenes (aumento 10x) de muestras de cada una de las líneas celulares +0 y +1 y se contó el número de puntos SMD por núcleo. No se consideró la línea +3 debido a una tinción muy intensa, asimismo, los portaobjetos incubados con la mayor concentración del anticuerpo primario (1 nM).

Se presentan los resultados del experimento con muestras de la línea celular +0 en la tabla 4:

Concentración de anticuerpo anti-HER2	Número de puntos calculado teóricamente, Kd 280, máx. 0,7 puntos/núcleo (0+) (serie 1 de la figura 7)	Puntos/núcleo contados experimentalmente en la línea celular +0 (serie 2 de la figura 7)
100	0,183246	0,186
200	0,290456	0,305
300	0,360825	0,358
400	0,410557	0,416
500	0,44757	0,451
1000	0,546022	0,69

10 El uso de concentraciones muy bajas tanto de anticuerpos primarios como de secundarios (100-500 pM y 5 pM de manera correspondiente), combinado con adiciones secuenciales múltiples es necesario para alcanzar las condiciones de equilibrio tal como se demuestra en los experimentos 3a y 3b. La adición de 6 veces de anticuerpo primario a una concentración muy por encima de Kd (1 nM) debe conducir a cierto fondo, que se espera, sin embargo que el ajuste obtenido a partir de las 5 determinaciones dobles alrededor de Kd sea muy bueno.

Experimento 3d: Determinación de Kd de conjugado anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano-HRP L348-111.

Se realizó este experimento usando tinciones para IHC convencionales. Se pretrataron los portaobjetos tal como se describe, y se sometieron al siguiente protocolo de tinción 3:

15 1. Bloqueo con peroxidasa, 5 min

Lavado

2. Anticuerpo anti-HER2 en medios de incubación 1, 6 adiciones, 10 min cada una;

Lavado

3. L348-111 en medios de incubación 1, 3 adiciones, 10 min cada una;

20 Lavado

4. Tinción de DAB, 10 min

Lavado

5. Tinción de hematoxilina, 5 min

Lavado con agua

25 Lavado

Lavado con agua desionizada.

30 Para cada una de las tres líneas celulares, se tiñeron tres portaobjetos (por triplicado) con anticuerpo anti-HER2 100 pM y 50 nM L348-111. Se tiñeron los otros seis portaobjetos con anticuerpo anti-HER2 500 pM y con concentraciones decrecientes de L348-111 (50 nM, 25 nM, 17 nM, 11 nM, 7,5 nM y 5 nM de manera correspondiente). Dos observadores independientes de los resultados de tinción encontraron que para las tres líneas celulares, la intensidad de la tinción por triplicado (anticuerpo anti-HER2 100 pM y L348-111 50 nM) era idéntica a la del portaobjetos tratado con anticuerpo anti-HER2 500 pM y L348-111 11 nM. Como el material de referencia era constante (mismos portaobjetos de control de línea celular) y se observó una intensidad de tinción constante, pudo concluirse que estaba presente el mismo número de complejos HER2-anticuerpo anti-HER2-L348-111. Por
35 consiguiente, se usó la siguiente fórmula para calcular la Kd del anticuerpo secundario:

$$Kd2 = \frac{(1 - C_3) \times ([Ac2]_1 \times [Ac2]_2)}{(C_3 \times [Ac2]_1) - [Ac2]_2}$$

donde $[Ac1]_1$ y $[Ac1]_2$ son dos concentraciones diferentes del anticuerpo primario, y $[Ac2]_1$ y $[Ac2]_2$ son concentraciones diferentes del anticuerpo secundario.

Calculando C_3 a partir de la siguiente ecuación:

$$C_3 = \frac{C_2}{C_1} = \frac{(Kd1 + [Ac1]_2) \times [Ac1]_1}{[Ac1]_2 \times (Kd1 + [Ac1]_1)}$$

- 5 Y usando los valores de $[Ac1]_1 = 100$ pM, $[Ac1]_2 = 500$ pM, $[Ac2]_1 = 50$ nM, $[Ac2]_2 = 11$ nM, se encontró que la $Kd2$ de L348-111 era igual a 28 nM.

En la titulación de equilibrio del ejemplo 3c, se ajustaron los resultados a 0,70 puntos por núcleo (en condiciones de saturación con anticuerpo primario y el uso de L348-111 a una concentración de 1,5 pM). Por consiguiente, usando la siguiente ecuación es posible calcular cantidad total de HER2 (PrTotal) presente en células +0:

10
$$PrTotal = [Ac2 : Ac1 : Pr] \times \frac{Kd1 + [Ac1]}{[Ac1]} \times \frac{Kd2 + [Ac2]}{[Ac2]}$$

donde $[Ac2:Ac1:Pr]$ es la concentración de complejos HER2-anticuerpo anti-HER2-L348-111, $Kd1$ es la constante de disociación de anticuerpo anti-HER2, y $Kd2$ es la constante de disociación de L348-111, $[Ac1]_1$ y $[Ac1]_2$ dos concentraciones diferentes del anticuerpo anti-HER2, y $[Ac2]_1$ y $[Ac2]_2$ son dos concentraciones diferentes de L348-111.

- 15 Fijando $[Ac2:Ac1:Pr]$ a 0,70 puntos SMD/núcleo, la primera fracción a 1 y $Kd2$ a 28 nM y $[Ac2]$ a 1,5 pM, se calcula que el valor de PrTotal es de 13.000 moléculas/núcleo.

Este valor concuerda bien con los datos del campo (véase, por ejemplo, David G. Hicks, D.G. y Schiffhauer, L. Assessment of HER2 Status by Immunohistochemistry: Routine Use of Controls for IHC Testing-Laboratory Medicine. 2011;42(8):459-467) que la línea celular 0+ expresa 21.600 ± 6700 copias del receptor Her2 en la superficie de estas células.

20

Ejemplo 2. Cuantificación de una diana en una muestra histológica (método II)

1. Consideraciones teóricas

El método (II) para la estimación del número total (absoluto) de moléculas diana en células tiene varios enfoques similares en comparación con el método (I), sin embargo también tiene algunas diferencias.

- 25 Uno de los problemas asociados con el método descrito previamente es que deben establecerse condiciones de equilibrio tanto para el anticuerpo primario como para el anticuerpo secundario marcado. En caso de altas concentraciones de diana, esto puede ser un problema ya que se producirá el agotamiento de los agentes de unión durante las incubaciones y por tanto se requerirán incubaciones múltiples y prolongadas con los agentes de unión.
- 30 El presente método utiliza que usando una concentración muy alta de agentes de unión puede establecerse un nivel de unión "superior" (que significa que esencialmente todos los sitios de unión en la muestra se saturarán con el agente de unión correspondiente) sin tener los problemas de agotamiento. Evidentemente nunca el 100%, pero puede alcanzarse una unión del 90-99% de una proteína diana con un anticuerpo primario de alta afinidad, y una unión del 50-75% del anticuerpo primario con anticuerpo secundario marcado. Dentro de estos intervalos, pueden usarse experimentos con una concentración variable pero alta de reactivos para establecer niveles de unión más
- 35 precisos.

Además, usando una mezcla que contiene una alta concentración de un anticuerpo secundario marcado y baja concentración de anticuerpo secundario marcado (el mismo), pueden alcanzarse condiciones de equilibrio, mientras que sólo se marcará una pequeña fracción de los anticuerpos primarios unidos a la diana.

- 40 El presente método utiliza además la posibilidad proporcionada por el presente método de visualización de que puede visualizarse el anticuerpo secundario marcado de varios modos, dependiendo del grado de amplificación. En caso de bajas cantidades del anticuerpo primario unido a la diana, puede usarse un anticuerpo secundario marcado (o una mezcla de anticuerpo marcado y no marcado) para producir puntos que pueden contarse. En caso de altas cantidades del anticuerpo primario unido a la diana, puede usarse el mismo reactivo (o mezcla) para producir una tinción convencional. Por tanto, el experimento puede comprender varias etapas:

- 45 1. Se usan incubaciones con altas concentraciones de agentes de unión para establecer condiciones de equilibrio que conducen al reconocimiento de una fracción elevada y conocida de dianas. Tales experimentos se llevan a cabo con anticuerpo tanto primario como secundario marcado. Tales condiciones se denominarán además condiciones de "nivel superior".

2. Luego, se prepara una mezcla de anticuerpo secundario marcado y secundario no marcado que reconoce una fracción desconocida de anticuerpos primarios y se usa para la incubación de una muestra de tejido con una alta expresión de la diana que se ha tratado con un anticuerpo primario en las condiciones de nivel superior. La incubación está seguida por visualización del anticuerpo secundario unido marcado con una tinción convencional.

5 3. Usando tinción convencional, se realiza la titulación del anticuerpo primario unido a la diana mediante el anticuerpo secundario marcado en las condiciones de nivel superior. La cuestión importante es que no es necesario establecer condiciones de equilibrio entre la diana y el anticuerpo primario. Basta con usar material de prueba constante (el material de prueba constante se refiere a un material de prueba en el que la cantidad de la diana es constante), se reconoce una cantidad reproducible de la diana. A cierta concentración baja de anticuerpo primario, se obtiene una intensidad de tinción que es idéntica al nivel de tinción que se observa en la etapa 2.

10 4. Usando un método para visualizar moléculas individuales como puntos (tal como se describe en la presente invención), se usa una mezcla de anticuerpo secundario marcado y no marcado para acceder a una fracción de la diana reconocida por la misma baja concentración del anticuerpo primario que en la etapa 3, con relación a la fracción de la diana reconocida por las condiciones de nivel superior de anticuerpo primario.

15 5. Usando el bajo nivel de anticuerpo primario como en la etapa 3, y la mezcla de anticuerpo secundario marcado y no marcado como en la etapa 2, se tiñen moléculas individuales como puntos y se evalúa el número de puntos por núcleo.

A partir de estos experimentos, puede determinarse el número absoluto de dianas. A partir de los experimentos de las etapas 1 y 4, se sabe qué fracción de la diana se reconoce por la baja concentración del anticuerpo primario. A partir de los experimentos de las etapas 1 y 3, es posible deducir qué fracción de los anticuerpos primarios se reconoce por la mezcla de anticuerpo secundario marcado y no marcado usada en el experimento 2. Se usa el hecho de que se obtienen los niveles de tinción convencional idénticos en los experimentos de las etapas 2 y 3 (lo que significa que hay un número idéntico de anticuerpos secundarios marcados unidos en las muestras). Por tanto, se conocen ahora tanto la fracción de las moléculas diana reconocida por la baja concentración del anticuerpo primario, como la fracción de los anticuerpos primarios reconocida por la mezcla de anticuerpo secundario marcado y no marcado del experimento en la etapa 5. La multiplicación de estos dos factores proporciona la fracción de moléculas diana visualizadas como puntos (véase la descripción del experimento 1c a continuación). Como se ha contado además el número de puntos por núcleo, se conoce el número de moléculas diana presentes por núcleo. Por tanto, se ha realizado un recuento absoluto.

30 2. Evidencias experimentales

Los materiales y métodos usados en los siguientes experimentos, si no se dan a conocer de manera específica, son tal como se describieron anteriormente.

35 Se establece que la K_d del anticuerpo primario anti-Her2 es de 280 pM. (Véase el experimento 3c) Usando el anticuerpo en condiciones de equilibrio (adiciones múltiples hasta que no se observa un aumento de señal adicional) a una concentración de 13,3 nM dará como resultado un marcaje de 13,3 nM/(13,3 nM + 0,28 nM) que es igual a aproximadamente el 97,9% de las moléculas diana primarias.

40 Asimismo, se establece que la K_d del anticuerpo secundario marcado es de 28 nM. (Véase el experimento 3d). Usando el anticuerpo secundario marcado en condiciones de equilibrio (adiciones múltiples hasta que no se observa un aumento de señal adicional) a una concentración de 25 nM dará como resultado un marcaje de 25 nM/(25 nM + 28 nM) que es igual a aproximadamente el 47,1% de los anticuerpos primarios unidos.

Experimento 1a.

Como material de prueba constante se usaron secciones en serie de sedimentos de las líneas celulares incrustadas en parafina y fijadas con formalina. Las líneas celulares usadas fueron material de control 3+ de HercepTest de Dako.

45 Se desparafinaron los portaobjetos con secciones FFPE de bloques que contenían las líneas celulares, denominados a partir de ahora "portaobjetos" mediante emersión en xileno (2 x 5 min) seguido por etanol al 96% (2 x 2 min) y etanol al 70% (2 x 2 min). Se lavaron los portaobjetos con agua desionizada y se transfirieron a disolución de recuperación de diana de bajo pH (Dako S1700). Luego se calentaron los portaobjetos ebullición en un horno de microondas (aprox. 5 min) y luego se dejaron en ebullición suave durante 10 min. Se permitió que se enfriaran los portaobjetos durante min 20 min antes de transferirse a un tampón de lavado, Dako S 2343.

Luego se tiñeron los portaobjetos en el Autostainer usando el siguiente protocolo:

Bloqueo con peroxidasa, Dako S2023, 5 min

Lavado

Varias adiciones secuenciales de 10 minutos de anticuerpo primario anti-HER2 13,3 nM

55 Lavado

ES 2 613 477 T3

Varias adiciones secuenciales de 10 minutos de anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano-HRP 100 pM (L348.111) mezclado con anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado 5 nM.

Lavado

DAB (Dako 5007), 10 min

5 Lavado

Hematoxilina (Dako S3301), 5 min

Lavado con agua

Lavado

Resultados:

- 10 Tres adiciones de 10 minutos de anticuerpo anti-HER2 13,3 nM fueron suficientes para alcanzar condiciones de equilibrio. Una cuarta adición no condujo a un aumento del nivel de tinción. Dos adiciones de 10 minutos de anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano-HRP 100 pM (L348.111) mezclado con anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado 5 nM fue suficiente para alcanzar condiciones de equilibrio. Una tercera adición no condujo a un aumento del nivel de tinción. El máximo nivel de tinción alcanzado correspondió a aproximadamente +1. (Aunque esta línea celular se denomina +3, el uso de baja concentración de anticuerpo secundario marcado mezclado con una alta concentración de anticuerpo secundario no marcado conduce al marcaje de una pequeña fracción de anticuerpos primarios).
- 15

Experimento 1 b.

- 20 Se pretrataron los portaobjetos como en el experimento 1a, y se sometieron al siguiente protocolo (tinción con DAB convencional:

Bloqueo con peroxidasa, Dako S2023, 5 min

Lavado

10 minutos con anticuerpo primario anti-HER2 en concentración variable en el intervalo de 30 a 50 pM.

Lavado

- 25 Dos adiciones secuenciales de 10 minutos de anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano-HRP 25 nM (L348.111). Un portaobjetos de control mostró que una tercera adición no condujo a un aumento de la señal.

Lavado

DAB (Dako K5007), 10 min

Lavado

- 30 Hematoxilina (Dako S3301), 5 min

Lavado con agua

Lavado

Resultados:

- 35 Una incubación con anticuerpo anti-HER2 40 pM durante 10 minutos dio como resultado una intensidad de tinción (+1) idéntica al máximo nivel de tinción alcanzado en el experimento 1a. La incubación a 43 pM dio como resultado una intensidad de tinción visiblemente mayor, mientras que la incubación a 37 pM proporcionó una intensidad de tinción visiblemente menor.

Experimento 1c

- 40 Se pretrataron los portaobjetos como en el experimento 1a y se sometieron al siguiente protocolo (tinción mediante SMD):

Bloqueo con peroxidasa, 5 min con Dako S2023

Lavado

Anticuerpo primario anti-HER2. O bien 3 adiciones secuenciales de 10 minutos de 13,3 nM (portaobjetos 1) o bien una adición de 10 minutos de 40 pM (portaobjetos 2-5)

- 45 Lavado

Dos adiciones secuenciales de 10 minutos de anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano-HRP 500 femtoM (L348.111) mezclado con anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado 5 nM (portaobjetos 1-3) o dos adiciones secuenciales de 10 minutos de anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano-HRP 100 pM (L348.111) mezclado con anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado 5 nM (portaobjetos 4-5)

- 50 Lavado

Depósito de FITC-indicador: 10 min con medios de incubación 2 con DAB 0,28 mM y D21067 10 microM,

Tres lavados

Anticuerpo anti-FITC-AP: incubación de 10 min, D20036 20 nM en BAM

Tres lavados

- 55 LPR 10 min con Dako K0640

Lavado

Hematoxilina (Dako S3301), 5 min

Lavado con agua

Lavado

- Se sometieron los portaobjetos a análisis de imágenes. Se capturaron imágenes de los sedimentos celulares completos a 20X (aprox. píxeles de 300 x 300 nm) usando un aparato de exploración de portaobjetos ScanScope (Aperio). Se analizaron las imágenes usando el software JMicrovision vs. 1.27. Se identificaron los puntos rojos en el espacio de color de intensidad, matiz, saturación como (I = 0-234, H = 187-37, S = 52-255), se identificaron los núcleos azules como (I = 0-201, H = 148-221, S = 0-190). Se aplicó además un umbral de tamaño a los puntos, los objetos mayores de 30 píxeles se contaron como dos puntos, los objetos mayores de 45 píxeles se contaron como tres puntos. Se aplicó un umbral menor de 100 píxeles a los núcleos para eliminar por filtrado los residuos y fragmentos más pequeños de los núcleos.
- 10 Obsérvese que el solapamiento parcial de los espacios de color permite identificar píxeles individuales como parte tanto de un punto rojo como de un núcleo, lo que concuerda con el aspecto violeta oscuro de los puntos encima de los núcleos.

Resultados y conclusiones:

Portaobjetos	Puntos	Núcleos	Puntos/núcleo
1	56918	12388	4,59
2	151	13917	0,0109
3	177	13925	0,0127
4	52011	13618	3,82
5	61040	12939	4,72

- 15 La comparación del portaobjetos 1 con el promedio de los portaobjetos 2 y 3 muestra 388 veces menos anticuerpo primario unido. Como el portaobjetos 1 representa aproximadamente el 97,9% (el valor se deriva de la Kd1 del anticuerpo anti-HER2) de moléculas diana unidas, la aplicación de anticuerpo primario 40 pM durante 10 minutos con el mismo material de prueba (portaobjetos 2 y 3) da lugar a que 1 de cada 396 moléculas diana está unida al anticuerpo primario (o el 0,252%).

Estos datos pueden usarse ahora para analizar los resultados de los experimentos 1a y 1b.

- 20 Tal como se mencionó, la aplicación de anticuerpo primario 40 pM durante 10 minutos da como resultado el marcaje del 0,252% de la diana primaria. Posteriormente, una unión del 47,1% (el valor se deriva de la Kd del anticuerpo secundario) de los anticuerpos primarios unidos a la diana con respecto al anticuerpo secundario da como resultado que el 0,119% de la diana está unida (indirectamente) al anticuerpo secundario. Esto corresponde al experimento 1c, es decir usando anticuerpo primario 40 pM durante 10 min. Este también debe ser el caso (ya que los niveles de tinción son idénticos) para el experimento 1b, en el que la incubación con anticuerpo primario 13,3 nM (el 97,9% de las dianas primarias unidas) estaba seguida por la incubación con la mezcla de anticuerpo secundario marcado 100 pM con anticuerpo secundario no marcado 5 nM. Por tanto, puede concluirse que el uso de esta mezcla conduce a que el $0,119\%/0,979 = 0,121\%$ de los anticuerpos primarios están unidos al anticuerpo secundario marcado; el 0,121% del 0,252% de la diana es igual a 3,06 ppm (partes por millón). Por consiguiente, los 4,27 puntos (en promedio) por núcleo observados en los portaobjetos 4 y 5 suman 1.395.000 molécula diana por núcleo (esto se deduce a partir del siguiente cálculo: $4,27/0,00000306 = 1.395.000$).

- 35 Puede obtenerse la precisión de esta evaluación comparando los portaobjetos 2 y 3 con los portaobjetos 4-5. Se observaron 362 veces más puntos (en promedio) usando la mezcla con anticuerpo secundario marcado 100 pM (portaobjetos 2-3) que con 500 fM (portaobjetos 4-5). Como la mezcla con 100 pM da como resultado que el 0,121% de anticuerpos primarios están marcados, la mezcla con 500 fM debe conducir a 362 veces menos marcaje de la diana con anticuerpo, es decir el $0,121\%/362 = 3,34 \text{ ppm}$. Puede calcularse que el nivel de marcaje de moléculas diana en este portaobjetos: el 97,9% de 3,34 ppm proporciona 3,27 ppm, y los 4,59 puntos por núcleo observados corresponde a 1.402.000 moléculas diana por núcleo ($4,59/0,00000327 = 1.402.000$).

40 Ejemplo 3: Uso de un agente de unión que comprende una mezcla de primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión

Experimento 1. Agente de unión que comprende una mezcla de un anticuerpo de conejo anti-HER2 con un anticuerpo de ratón anti-HER2 específico para el mismo epítipo

- 45 Se desparafinaron en xileno y etanol 8 portaobjetos con secciones FFPE de carcinoma de mama con una puntuación de intensidad para HercepTest™ de entre 1+ y 2+ y se recuperaron los epítipos en PT-Link (Dako) a 97 grados durante 20 min en HEPES 10 mM pH 8,0 con NP-40 al 0,1%.

Luego se tiñeron los portaobjetos según el siguiente protocolo (A) en el Autostainer (Dako):

(a) Bloqueo con peroxidasa, 5 min en Dako S2023
Lavado

(b) Incubación con el agente de unión:

Una mezcla de la primera molécula de unión anticuerpo de conejo anti-HER2 (anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 humano, clon DAK-HcT-2:DG44) y la segunda molécula de unión anticuerpo de ratón anti-HER2 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-HER2 humano, clon DAK-H2-3B4, F11, G4, C9)

5 Lavado

(c) Detección de la primera molécula de unión:

Incubación con anticuerpo secundario marcado con HRP frente a anticuerpo de conejo anti-HER2

Lavado.

10 Deposición de una molécula indicadora (indicador Fer-Lys(Fer)-Lys(Fer)-Lys(Fer)-L150-Lys(Flu) (D19185/D120068)

(d) Detección del indicador en los sitios diana

DAB, 2x5 min, Dako K0640

Lavado

(e) Contratación con hematoxilina

Hematoxilina, 3 min

15 Lavado con agua desionizada

(f) Preparación

20 Mediante mezclado del anticuerpo de conejo anti-HER2 con el anticuerpo de ratón anti-HER2 específico para el mismo epítipo, se manipuló la porción de dianas unidas al anticuerpo de conejo anti-HER2 mediante el cambio de la razón entre el anticuerpo de conejo anti-HER2 y el anticuerpo de ratón anti-HER2, mientras que se mantenían las condiciones de equilibrio. Por tanto, también se manipuló la intensidad de señal puesto que la capa de detección conjugada con anticuerpo de conejo-HRP sólo detecta anticuerpos de conejo anti-HER2 unidos a Her2, pero no anticuerpos de ratón anti-HER2 unidos a Her2.

Se trataron los portaobjetos con mezclas del anticuerpo de conejo anti-HER2 y el anticuerpo de ratón anti-HER2 que tenían las razones mostradas en la tabla:

Número de portaobjetos	Anticuerpo de conejo anti-Her2	Anticuerpo de ratón anti-Her2
1	200	0
2	200	50
3	200	100
4	200	200
5	200	300
6	200	400
7	200	800
8	200	1600

25 Se analizaron los portaobjetos y se puntuaron dentro del intervalo de puntuación de intensidad desde 0, sin intensidad, hasta 4, alta intensidad. Se presentan los resultados en la tabla a continuación:

Número de portaobjetos	Resultados de intensidad
1	1,8
2	1,6
3	1,6
4	1,4
5	1,4
6	1,4
7	1,2
8	1

A partir de los resultados del experimento se concluyó que puede usarse una mezcla de anticuerpo de conejo anti-Her2 y anticuerpo de ratón anti-Her2, para ajustar la intensidad de señal mientras que se mantiene la reacción en condiciones de equilibrio.

30 Experimento 2. Agente de unión que comprende una mezcla de anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 con fragmento f(ab)₂ del anticuerpo.

35 La tinción de 4 portaobjetos de carcinoma de mama con una puntuación para HercepTest de 2+ pretratados e inmunoteñidos como anteriormente (experimento 1, protocolo A) usando el agente de unión que comprende una mezcla de anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 (véase el experimento 1) con el fragmento f(ab)₂ del anticuerpo. Las concentraciones específicas fueron tal como se indican en la tabla a continuación.

Número de portaobjetos	Anticuerpo de conejo anti-HER2 conjugado con HRP (ng/ml)	Anticuerpo de conejo anti-HER2 fragmentado con f(ab) ₂
1	500	0
2	500	1000
3	500	1500
4	500	2000

Se capturaron imágenes de los portaobjetos con Aperio Scanscope. Se analizaron las imágenes con el software ISH-vs. 1.2 de Indica Labs. Se evaluaron los portaobjetos y se evaluó una puntuación de intensidad (que oscilaba entre 0, sin intensidad y 4, alta intensidad). Se presentan los resultados en la tabla a continuación:

Número de portaobjetos	Resultados de intensidad 0 = ninguna, 4 = alta
1	2,2
2	1,8
3	1,6
4	1,6

5 A partir de los resultados del experimento, se concluye que puede usarse una mezcla de anticuerpo de conejo anti-Her2 y el fragmento f(ab)₂ del anticuerpo para ajustar la intensidad de señal mientras que se mantiene la reacción en condiciones de equilibrio

Experimento 3. Agente de unión que comprende una mezcla de anticuerpos marcados y no marcados (moléculas de unión primeras y segundas) - visualización de la primera molécula de unión en el sitio diana según el documento WO2012143010 (incorporado como referencia).

10 Se desparafinaron en xileno y etanol 18 portaobjetos con secciones FFPE de líneas celulares de control Her2 +1 y se recuperaron los epítomos en PT-Link (Dako) a 97 grados durante 20 min en HEPES 10 mM pH 8,0 con NP-40 al 0,1%. Se tiñeron los portaobjetos según el siguiente protocolo en el Autostainer (Dako):

1. Bloqueo con peroxidasa, peróxido de hidrógeno al 3%, 10 min. Lavado Dako S3006.
- 15 2. Anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2, 6,6 nM en medios de incubación 1 (Tris:HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 0,3 M, albúmina sérica bovina al 2%, Bronidox al 0,02%, 4-aminoantipirina 2,44 mM, polietilenglicol de PM 3.000 al 3%, caseína al 0,05%, Tween 20 al 0,1%), lavado de 20 min. Dako S3006.
- 20 3. Anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano 70-HRP (D18033/D18 75), 200 fM + anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado en concentraciones variables en medios de incubación 1), lavado de 20 min. Dako S3006.
4. Se trataron de nuevo 9 portaobjetos con el anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano 70-HRP, 200 fM + anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado en concentraciones variables en los medios de incubación, lavado de 20 min. Dako S3006. (idéntica a la etapa 3) Los otros 9 portaobjetos no se sometieron a esta etapa.
- 25 5. Indicador D 9185/D120068 2 microM, alfa-CHC 5,3 mM, peróxido de hidrógeno 0,59 mM en 50 mM en imidazol:HCl pH 6,8, 10 min. Lavado Dako S3006.
6. Anticuerpo anti-FITC-fosfatasa alcalina, 40 nM en medios 1, lavado de 10 min Dako S3006.
7. Rojo permanente líquido, Dako K0640, lavado de 10 min Dako S3006.
8. Contratación de hematoxilina, Dako S3301, lavado de 5 min con agua, lavado Dako S3006.

30 Se deshidrataron los portaobjetos en etanol al 99,9% durante 1 min y se taparon con cubreobjetos con cubreobjetos Tissue-Tek Film (Sakura).

35 Se capturaron imágenes de los portaobjetos con Aperio Scanscope. Se analizaron las imágenes con el software ISH-vs. 1.2 de Indica Labs. Se ajustaron los parámetros para detectar núcleos azules (rojo 0,650, verde 0,704, azul 0,291) y puntos rojos (rojo 0,072, verde 0,952, azul 0,296). Aunque estos dos tipos de objetos muestran una transmisión de luz azul casi idéntica (azul = 0,291 frente a 0,296) los núcleos tenían una baja transmisión tanto de rojo como de verde (0,650 y 0,704) mientras que los puntos rojos tenían una transmisión muy alta de rojo y una transmisión muy baja de verde (0,072 y 0,952). Esto proporcionó una identificación inequívoca (tal como se confirmó mediante inspección visual) de núcleos y puntos. Para potenciar adicionalmente la identificación correcta de los puntos rojos localizados en membrana, se aplicó un filtro lógico de modo que sólo se contaron los puntos dentro de 5 micrómetros de un núcleo. En cada portaobjetos se contaron aproximadamente 15.000 células para garantizar
40 datos estadísticamente válidos. Se resumen los resultados en la tabla a continuación:

Concentración de anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado en las etapas 3 y 4	0 nM	3 nM	10 nM
Promedio de 3 portaobjetos sometidos sólo a la etapa 3	0,134 puntos/célula	0,073 puntos/célula	0,033 puntos/célula
Promedio de 3 portaobjetos sometidos a las etapas 3 y 4	0,242 puntos/célula	0,087 puntos/célula	0,036 puntos/célula
Aumento en los puntos/célula en la etapa 4	81%	19%	9%

Resultados y discusión:

Tal como se muestra en otros ejemplos, cuando se usan bajas concentraciones de un agente de unión solo, se requieren adiciones múltiples para alcanzar el equilibrio. En este ejemplo, se observa un aumento del 81% mediante la segunda adición de anticuerpo de cabra anti-conejo-Dex-HRP, lo que muestra que una única adición dista mucho de ser suficiente para alcanzar un equilibrio estable. En cambio, cuando se usa una mezcla de moléculas de unión marcada y no marcadas, se detectan significativamente menos puntos que marcan los sitios diana mediante una única adición, aunque una segunda adición sólo conduce a un pequeño aumento del número de puntos. Comparando 2 agentes de unión que comprenden moléculas de unión no marcadas 3 nM y 10 nM, puede extraerse la conclusión de que cuanto mayor es la concentración de las moléculas de unión no marcadas, menos sitios de unión que comprenden la diana se visualizan (es decir, se detectan menos puntos) mediante una única adición y menos es el aumento de los sitios diana visualizados mediante una segunda adición.

El hecho de que se detecten menos puntos, y puedan detectarse adicionalmente incluso menos mediante una segunda adición, usando mezclas de moléculas de unión marcadas y no marcadas dirigidas a la misma diana, muestra que tiene lugar la saturación de la diana por las moléculas de unión. Por tanto, el ensayo se ha transformado de una medición de equilibrio (como la del ejemplo 1 y el ejemplo 2 descritos anteriormente), lo que requiere adiciones múltiples del agente de unión o un tiempo prolongado para alcanzar condiciones de equilibrio estables, a un ensayo de saturación competitiva en el que la diana puede saturarse esencialmente mediante una única adición de mezcla de moléculas marcadas y no marcadas de un mismo agente de unión. Esto es evidentemente ventajoso, ya que el procedimiento es significativamente más rápido, menos laborioso y mucho más robusto con respecto a fluctuaciones menores en el tiempo, la temperatura, la calidad de los reactivos, la instrumentación o la variación del operario humano. Tales ensayos de saturación competitiva no excluyen ensayos que miden dianas inmovilizadas en términos absolutos, es decir una concentración de diana por célula o volumen de muestra inmovilizada. Como pueden usarse experimentos de equilibrio con anticuerpo primario y anticuerpo secundario marcado con material de prueba constante, es decir una línea celular específica, para determinar la concentración absoluta de diana en esa línea celular, pueden calibrarse otros ensayos que usan una mezcla de agentes de unión "detectables" y "no detectables" frente al material de prueba constante, es decir si se ha determinado que una línea celular dada tiene 50.000 unidades de la diana por célula, y un ensayo de saturación robusto con agente de unión marcado-no marcado produce 0,10 puntos/célula (1 punto correspondiente a una unidad individual (véase para su explicación el documento WO20110476680 o el documento WO2012062318, puede concluirse que el ensayo detecta 1 unidad de diana en una muestra que comprende 500.000 unidades de diana.

Experimento 4: Agente de unión que comprende una mezcla de anticuerpos marcados y no marcados (moléculas de unión primeras y segundas) - visualización de la primera molécula de unión en el sitio diana mediante tinción con HRP-DAB convencional (Envision™)

Se desparafinaron en xileno y etanol 6 portaobjetos con secciones FFPE de líneas celulares de control Her2 +0, +1, +2 y +3 y se recuperaron los epítomos en PT-Link (Dako) a 97 grados durante 20 min en HEPES 10 mM pH 8,0 con NP-40 al 0,1%.

Luego se tiñeron según el siguiente protocolo en el Autostainer (Dako):

1. Bloqueo con peroxidasa, peróxido de hidrógeno al 3%, lavado de 10 min Dako S3006.
2. Anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2, 6,6 nM en medios 1 (véase anteriormente), lavado de 20 min. Dako S3006.
3. Anticuerpo de cabra anti-conejo-dextrano 70-HRP(D18033/D18175), 25nM + anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado en concentraciones variables (0,8, 13, 21, 34 y 55 nM) en medios 1, lavado de 20 min. Dako S3006.
4. DAB, K5007 Dako, lavado de 5 min Dako S3006.
5. Contratinción de hematoxilina, Dako S3301, lavado de 5 min con agua, lavado Dako S3006.

Después de la tinción, se deshidrataron los portaobjetos en etanol al 99,9% durante 1 min y se taparon con cubreobjetos con cubreobjetos Tissue-Tek Film, (Sakura).

Se capturaron imágenes de los portaobjetos con Aperio Scanscope. Se analizaron las imágenes usando “Membrane vs. 9.0” de Aperio. Se usaron los parámetros originales de Aperio, con la única excepción de que se redujo la “completitud de membrana” desde el 50% hasta el 20%. Esta característica ajusta el grado de completitud de membrana requerido para que se puntúe una célula como +3. Esta reducción proporcionó una mejor separación entre células +2 y +3 ya que prácticamente todas las células intensas se puntuaron como +3 con un requisito de completitud del 20%, mientras que con un requisito de completitud del 50% sólo condujo a aproximadamente el 50% de células +3 incluso en caso de tinciones muy intensas.

El algoritmo tiene tres resultados básicos:

1. Una puntuación de intensidad basada en el promedio de la tinción de intensidad de la membrana. El intervalo dinámico en el caso de las líneas celulares es desde aproximadamente 35 (membranas muy intensas) hasta 170-180 (sin tinción de membrana).
2. Una “puntuación histológica”. Basándose en la intensidad de membrana, se agrupan las células como cualquiera de +3, +2, +1 o +0. Se calcula la puntuación como (% de +3 X 3)+(% de +2 X 2) + (% de +1 X 1) + (% de +0 X 0). Por tanto, el intervalo dinámico es desde 300 (todas las células +3) hasta 0 (todas las células +0).
3. Una puntuación categórica. Basándose en la distribución de puntuación histológica se clasifica toda la muestra (sedimento celular) como cualquiera de +3, +2 +1 o +0. En casos (raros) de material extremadamente homogéneo; es decir todas las células son de la misma categoría, la puntuación categórica es idéntica a la puntuación histológica. En la mayor parte de los casos lo que decide la puntuación categórica es la “regla del 10%”. Esto implica que más del 10% de las células son +3, la puntuación será +3, si más del 10% de las células son +2 (pero menos del 10% son +3), la puntuación será +2, si más del 10% de las células son +1(pero menos del 10% son +2 o +3), la puntuación será +1, en otros casos (menos del 10% son +1,+2 o +3) la puntuación será +0.

Se resumen los resultados de la evaluación de 4 líneas celulares diferentes y el agente de unión que comprende 6 concentraciones diferentes de anticuerpo de cabra anti-conejo anticuerpo no marcado en la tabla a continuación: I=intensidad, H = puntuación histológica y C = puntuación categórica.

[GaR]	Línea celular +3	Línea celular +2	Línea celular +1	Línea celular +0
0 nM	38(I),297(H),+3(C)	67(I),297(H),+3(C)	123(I),157(H),+3(C)	176(I),47(H),+1(C)
8 nM	39(I),298(H),+3(C)	77(I),290(H),+3(C)	139(I),131(H),+3(C)	172(I),27(H),+1(C)
13 nM	39(I),298(H),+3(C)	79(I),277(H),+3(C)	148(I),124(H),+2(C)	176(I),10(H),+0(C)
21 nM	44(I),298(H),+3(C)	89(I),174(H),+3(C)	164(I),94(H),+2(C)	177(I),4(H),+0(C)
34 nM	49(I),298(H),+3(C)	101(I),251(H),+3(C)	180(I),62(H),+1(C)	174(I),1(H),+0(C)
55 nM	51(I),298(H),+3(C)	110(I),230(H),+3(C)	182(I),40(H),+1(C)	175(I),0(H),+0(C)

Discusión de los resultados:

Cada uno de los tres resultados de puntuación representa diferentes “vistas” matemáticas de la misma imagen, ninguna la visión completa. Sin embargo, está claro que sin adición de anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado, el nivel de tinción es excesivamente intenso con escasa discriminación entre (especialmente) las líneas celulares +3 y +2. Además la línea +1 se categoriza como +3 y la +0 como +1.

Se obtienen los mejores resultados con el anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado o bien 34 nM o bien 55 nM. A todas las líneas celulares, excepto a la línea +2, se le proporciona la puntuación categórica correcta y es posible fácilmente la discriminación entre estas dos líneas celulares mediante los valores de intensidad o puntuación histológica. En efecto, la puntuación histológica discrimina fácilmente entre las cuatro líneas celulares con anticuerpo de cabra anti-conejo no marcado 34 nM o 55 nM, mientras que la puntuación de intensidad es de escaso valor para células teñidas muy débilmente ya que la morfología celular y la intensidad de contratinción de hematoxilina afecta sutilmente a la intensidad de membrana.

Se proporcionan ejemplos ilustrativos de la atenuación de la intensidad de señal mediante la adición de anticuerpo de cabra anti-ratón no marcado en la figura 2.

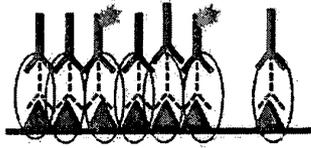
REIVINDICACIONES

1. Método para detectar una diana en un sitio diana en una muestra histológica, en el que el sitio diana comprende una pareja de unión para un agente de unión, que comprende
 - 5 (a) incubar la muestra que comprende presuntamente la diana en uno o más sitios diana en un medio de incubación que comprende un agente de unión que puede unirse de manera específica a la pareja de unión comprendida en dichos uno o más sitios diana, en el que la cantidad del agente de unión es suficiente para unirse sustancialmente a todas las unidades de la pareja de unión presente en la muestra, y en el que el agente de unión se caracteriza porque comprende primeras moléculas de unión y segundas moléculas de unión, en el que las primeras moléculas de unión comprenden una parte de unión y una parte detectable, y las segundas moléculas de unión comprenden una parte de unión, en el que la parte de unión de las moléculas de unión tanto primeras como segundas puede unirse de manera específica a la pareja de unión y competir por dicha unión, y en el que las segundas moléculas de unión no comprenden una parte que es sustancialmente idéntica a la parte detectable de las primeras moléculas de unión;
 - 15 (b) detectar la parte detectable de las primeras moléculas de unión en la muestra, detectando de ese modo la diana en los sitios diana.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la pareja de unión es la diana o una sustancia asociada con la diana.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el agente de unión y la pareja de unión son miembros de un par de unión específica.
4. Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que las moléculas de unión primeras y segundas son o comprenden un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, y la diana es una molécula que comprende el antígeno.
- 25 5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la primera molécula de unión es o comprende una molécula de anticuerpo primario, o un derivado de la misma, específica para un epítipo comprendido en la pareja de unión, y la segunda molécula de unión se selecciona de una molécula que comprende una porción de unión a antígeno de dicho anticuerpo primario, o una molécula que comprende una porción de unión a antígeno de otro anticuerpo, en el que dicho otro anticuerpo es específico para el mismo epítipo que dicho anticuerpo primario, o puede inhibir la unión de la primera molécula de unión a dicho epítipo.
- 30 6. Método según la reivindicación 1 ó 4, en el que la parte de unión de la primera molécula de unión y la segunda molécula de unión son o comprenden el fragmento F(ab)₂ del mismo anticuerpo primario específico para un epítipo comprendido en la pareja de unión, o los fragmentos F(ab)₂ de dos anticuerpos primarios diferentes que son específicos para el mismo epítipo, o que pueden inhibir la unión de las primeras moléculas de unión al epítipo.
- 35 7. Método según la reivindicación 1 ó 4, en el que la parte de unión de la primera molécula de unión y la parte de unión de la segunda molécula de unión son o comprenden los fragmentos F(ab)₂ del mismo anticuerpo secundario o fragmentos F(ab)₂ de dos anticuerpos secundarios diferentes que son específicos para el mismo anticuerpo primario.
- 40 8. Método según la reivindicación 5, 6 ó 7, en el que la parte detectable de las primeras moléculas de unión es la región Fc, un fragmento o un derivado de la misma, del mismo anticuerpo que la parte de unión de dicha molécula de unión.
9. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad del agente de unión en el medio de incubación está por encima del valor de K_d (constante de disociación) del complejo agente de unión-pareja de unión.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, en el que la cantidad de las segundas moléculas de unión es igual o está por encima del valor de K_d del complejo segunda molécula de unión-pareja de unión.
11. Método según la reivindicación 3, en el que agente de unión comprende las moléculas de unión primeras y segundas que son o comprenden una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico, y la pareja de unión es una secuencia de nucleótidos en la muestra.
- 50 12. Método según la reivindicación 11, en el que las moléculas de unión primeras y segundas comprenden la parte de unión que puede hibridar con la misma pareja de unión en las mismas condiciones de rigurosidad, tales como condiciones de rigurosidad baja a media.
13. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte detectable de la primera

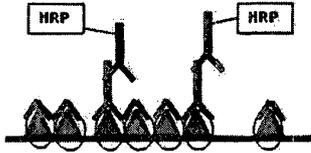
molécula de unión comprende una enzima, un marcador detectable ópticamente, un miembro de un par de unión específica, una partícula, una sustancia radiactiva, una combinación de cualquiera de los mismos.

- 5
14. Método según la reivindicación 1 ó 13, en el que la etapa (b) comprende una o más etapas de detección, que comprenden una etapa de visualización del sitio diana usando una deposición mediada por enzima de una molécula indicadora en dicho sitio diana.
 15. Ensayo para la evaluación de una diana en una muestra histológica, que comprende una etapa de detección de la diana en un sitio diana de la muestra según el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

A



B



C

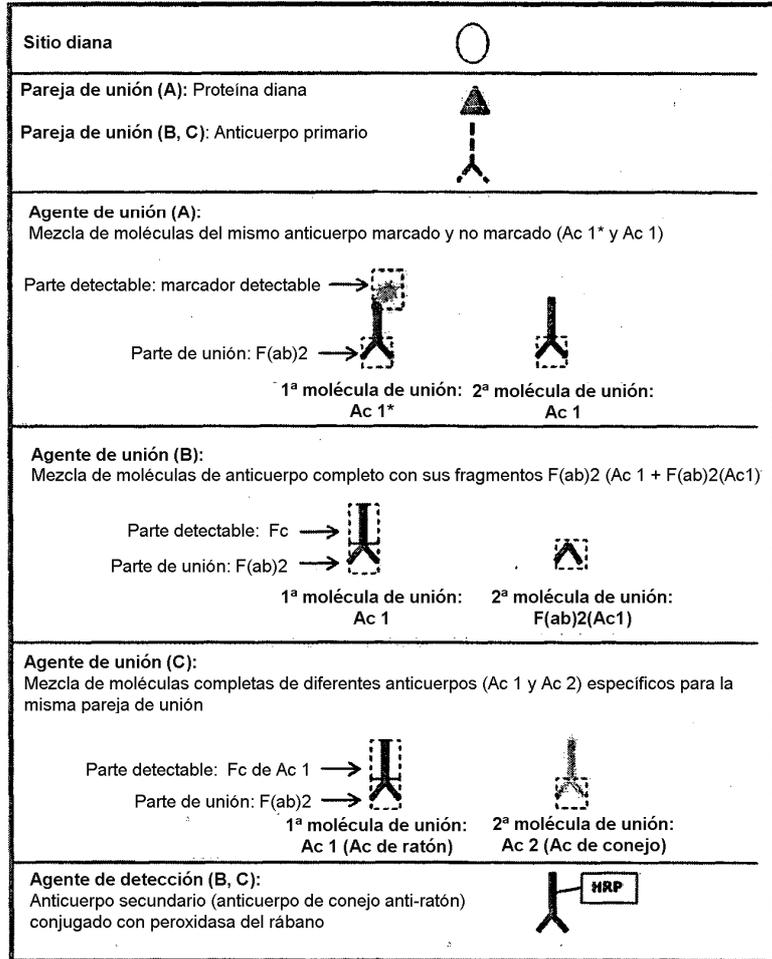
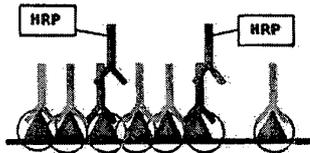


Figura 1

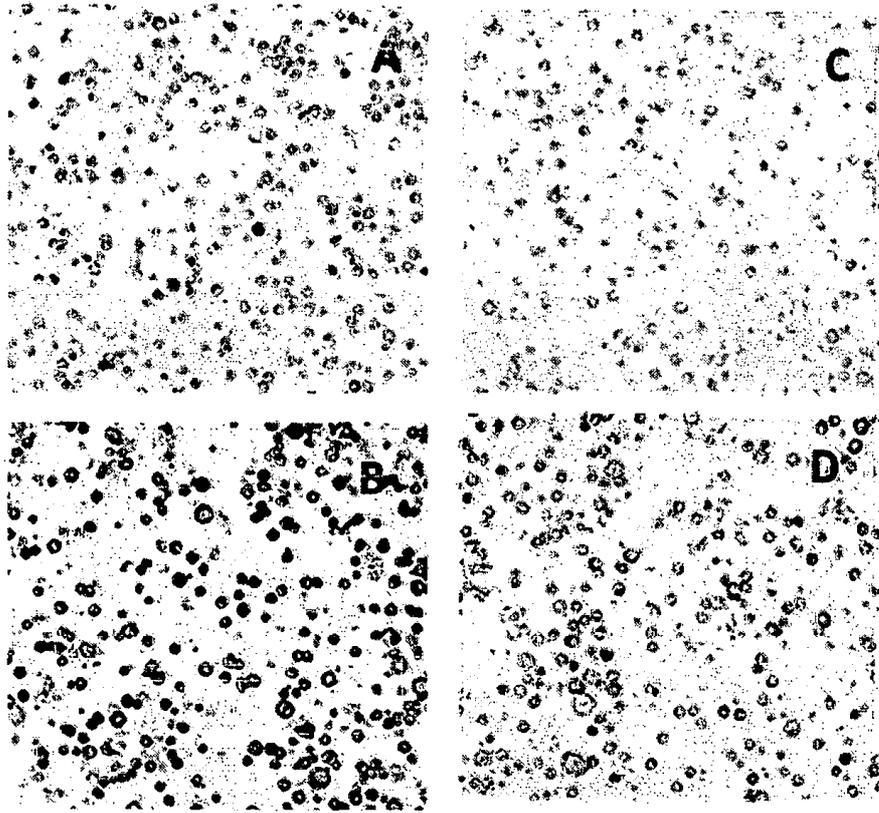


Figura 2