

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 450**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/28** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2008 PCT/DK2008/000327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2009 WO09036760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2008 E 08801362 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2201058**

54 Título: **Método rápido y sensible para la detección de dianas biológicas**

30 Prioridad:

**18.09.2007 US 994206 P**

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

**14.07.2017**

73 Titular/es:

**DAKO DENMARK A/S (100.0%)  
PRODUKTIONSVEJ 42  
2600 GLOSTRUP, DK**

72 Inventor/es:

**LOHSE, JESPER y  
PETERSEN, KENNETH HEESCHE**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 624 450 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método rápido y sensible para la detección de dianas biológicas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método de marcaje biológico que se produce por medio de una reacción en cadena de radicales libres. La reacción de marcaje descrita en el presente documento puede usarse generalmente para detectar dianas en una multitud de esquemas experimentales para detectar y visualizar una diana biológica o química, incluyendo inmunohistoquímica (IHC), hibridación *in situ* (ISH), métodos de tinción basados en anticuerpos tales como ELISA, transferencia de tipo Southern, Northern y Western, y otros.

**Antecedentes**

10 La detección de dianas biológicas o químicas en una muestra usando un marcador detectable es un procedimiento en el corazón de muchos métodos de detección y diagnóstico biológicos. En algunos casos la diana puede ser una secuencia de polinucleótido particular o un gen, una mutación de un gen, un patrón de expresión genética, detectado a nivel de ADN o ARN, o bien *in situ* o bien tras extracción o aislamiento. En otros casos, la diana puede ser un péptido, una proteína, un antígeno u otra sustancia, de nuevo detectada *in situ* o tras el aislamiento o la manipulación en laboratorio. La diana también puede ser una partícula o residuo de origen orgánico.

Muchos métodos de detección convencionales, por ejemplo IHC, ISH, ELISA o transferencia, emplean esquemas de marcaje para detectar las dianas deseadas (véanse, por ejemplo, el documento US 7.252.955; Piris J., & Whitehead R. 1974 J. Clin. Path., 27:798-799; documento W02007/015168; Caldwell JP *et al.*, 2002 J Forensic Sci. 45:785-794; documento US 7.183.072; documento W099/43846). Normalmente, estos esquemas implican incubar una muestra experimental que contiene potencialmente la diana detectable con una sonda, luego detectar la unión entre sonda y diana con un marcador detectable que puede emitir un color, una señal fluorescente, o radioactividad, por ejemplo. Una o muchas moléculas de sonda pueden unirse a cada diana, dependiendo de los detalles del esquema usado. En algunos casos, especialmente cuando la diana está presente en baja concentración, es necesario amplificar la señal de la unión diana-sonda añadiendo una o más capas de amplificación al sistema. Por ejemplo, si la sonda es un anticuerpo primario que reconoce la diana, puede añadirse un anticuerpo secundario que reconoce a la sonda de anticuerpo primario de manera que muchos anticuerpos secundarios se unen a cada anticuerpo primario. Si los anticuerpos secundarios se unen a un marcador detectable tal como un fluoróforo o cromóforo, entonces, por medio de amplificación, cada molécula diana en la muestra puede unirse eficazmente a múltiples fluoróforos o cromóforos en lugar de solo a uno o unos pocos fluoróforos o cromóforos. Por tanto, la diana producirá una señal de detección más fuerte tras la amplificación. Sin embargo, algunos experimentos de detección tienen una tendencia a producir señales de aspecto relativamente difuso, especialmente si se permite que la muestra repose durante un periodo de tiempo antes del análisis. Por ejemplo, la una o más sondas y/o marcadores detectables unidos a una diana pueden difundirse lentamente de la diana, o entre sí a lo largo del tiempo. En algunos casos cambios de tampón que afectan a la afinidad de unión de la diana, sonda y capas de amplificación también pueden provocar difusión de la señal. Muchos marcadores detectables se unen a las dianas mediante interacciones no covalentes tales como unión de proteína-ligando o hibridación de polinucleótidos. Los cambios de tampón tras el marcaje pueden reducir la afinidad entre la diana, la sonda y el marcador detectable, provocando que los diversos componentes se disocien. La difusión simple a lo largo de un periodo de tiempo, tal como varios días, también puede provocar disociación entre la diana, la sonda y el marcador detectable, haciendo que la señal sea difusa.

40 La técnica anterior describe sólo muy pocas técnicas que permiten superar los problemas mencionados anteriormente, aunque aún sólo parcialmente. Un ejemplo de tales técnicas es un método de deposición de indicador catalizada (CARD) descrito en los documentos WO 03002733, US 5.863.748; 5.688.966; 5.767.287; 5.731.158; 5.583.001, 5.196.306, 6.372.937 o 6.593.100. Este método utiliza el denominado "sistema de activación de enzimas dependiente de analito" (ADEAS) para catalizar la deposición de un marcador detectable sobre la fase sólida de una plataforma de ensayo. En el formato de ensayo, una enzima comprendida por el ADEAS reacciona con un conjugado que consiste en un sustrato marcado de manera detectable específico para la enzima. Cuando la enzima y el conjugado reaccionan, se forma un conjugado activado que se deposita covalentemente en un sitio en donde está inmovilizado un receptor específico para el conjugado activado. Por tanto, debido a que el conjugado comprende un marcador, desempeña el papel de un indicador que indica la presencia de una diana en el sitio. Pueden detectarse marcadores depositados enzimáticamente directa o indirectamente. El método da como resultado amplificación de la señal y límites de detección mejorados.

Puede usarse el método de CARD en formatos de ensayos, en donde la diana que va a detectarse es un receptor inmovilizado sobre un soporte sólido, por ejemplo una membrana. Tales formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de tipo "sándwich" y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos basados en membrana. El método de CARD también puede aplicarse a la detección de dianas biológicas por ejemplo mediante inmunohistoquímica (IHC), tal como se describe en el documento US 6.593.100. El método descrito en el documento US 6.593.100 utiliza una reacción de peroxidasa de rábano picante (HRP) con un conjugado marcado que comprende un sustrato de HRP en presencia de un potenciador. Tanto el sustrato de HRP como el potenciador son derivados de fenol. Tras la reacción con HRP el sustrato de HRP se activa y se une a los sitios de receptor de la muestra, por ejemplo

proteínas. A pesar de tener algunas características ventajosas, por ejemplo un aumento de la sensibilidad de detección, el método se limita a moléculas de indicador que son sustratos de HRP marcados seleccionados o bien de tiramida o ácido p-hidroxicinnámico o derivados de los mismos.

- 5 La presente invención supera las limitaciones del método de CARD descrito anteriormente y proporciona un método novedoso para una detección rápida y sensible de marcadores biológicos y químicos. El método comprende tanto características valiosas del método de CARD como nuevas características que lo hacen aplicable a una gama más amplia de los formatos de ensayo e independiente de una selección estrecha de moléculas de indicador y permiten una detección rápida, precisa y sensible de una variedad de dianas biológicas o químicas.

### Sumario de invención

- 10 La presente invención se basa en el hallazgo de que una variedad de moléculas pueden depositarse a partir de una disolución que comprende una sustancia que comprende al menos dos restos de un sustrato de enzima peroxidasa (denominado en el presente documento "agente de reticulación") en un sitio que comprende una actividad peroxidasa, por ejemplo en un sitio que comprende un resto de una enzima peroxidasa, por ejemplo HRP. La molécula que se deposita puede ser una molécula detectable, por ejemplo una molécula que por sí misma puede emitir un color, una señal fluorescente o radioactividad o que comprende un marcador detectable que puede emitir un color, una señal fluorescente o radioactividad, por consiguiente, el sitio de deposición de esta molécula detectable puede detectarse, y si el sitio de deposición comprende un marcador biológico o químico, puede detectarse también la presencia de este marcador biológico o químico. La molécula que se deposita "notificará" por tanto la presencia del marcador biológico en el sitio de su deposición. Por consiguiente, tales moléculas que se depositan detectables se denominan en el presente documento "indicadores".

- 20 Un posible motivo de que la molécula de indicador se deposite a partir de un medio que comprende el agente de reticulación en presencia de actividad peroxidasa es que esté teniendo lugar en el medio una reacción en cadena de radicales libres iniciada por la reacción entre la peroxidasa y el agente de reticulación. Los radicales libres de las moléculas de agente de reticulación formados en el transcurso de esta reacción pueden cebar las moléculas de indicador presentes en el mismo medio; las moléculas de indicador cebadas pueden reaccionar adicionalmente entre sí y formar agregados insolubles grandes que se depositan en o alrededor de los sitios que comprenden actividad peroxidasa (denominados en el presente documento "sitios diana"). Debido a que la actividad peroxidasa está estrictamente localizada en sitios diana, el resultado de esta reacción en cadena es que las moléculas de indicador se depositan sólo en los sitios diana o en una proximidad muy estrecha a estos sitios. Si tales sitios diana comprenden un marcador biológico o químico, por ejemplo una proteína o ácido nucleico, el marcador puede detectarse por tanto detectando el indicador depositado.

- 25 Se encontró sorprendentemente que moléculas que comprenden al menos dos restos de un sustrato de enzima peroxidasa pueden desempeñar el papel de agente de reticulación en el método de la invención. Por consiguiente, el término "agente de reticulación" se usa en el presente documento para designar una molécula que comprende al menos dos restos de una molécula (o al menos dos restos de dos moléculas diferentes) que pueden servir como sustrato de una peroxidasa (el término "peroxidasa" se usa de manera intercambiable en el presente documento con el término "enzima peroxidasa" o "actividad peroxidasa"), y que puede producir actividad de reticulación cuando se activa por la peroxidasa. Los agentes de reticulación de la presente invención pueden reticular al menos dos moléculas de indicador.

- 30 Se encontró que la deposición del indicador mediada por la reacción de un agente de reticulación y peroxidasa es muy rápida y dirigida al sitio, es decir el indicador se deposita no aleatoriamente sino específicamente en un sitio diana que comprende actividad peroxidasa, por ejemplo un resto de HRP. El indicador depositado se une fuertemente al sitio diana y no se difunde del sitio a lo largo del tiempo. Por consiguiente, la señal asociada con el indicador depositado se localiza de manera precisa y permanece nítida a lo largo del tiempo.

- 45 Realizaciones de la invención son:

1. Un método de deposición de un indicador en un sitio diana, en el que el sitio diana comprende actividad enzimática peroxidasa, y el método comprende una etapa de incubar dicho sitio diana en un medio acuoso que comprende el indicador, un compuesto de peroxidasa y un agente de reticulación, que es 3,3'-diaminobencidina (DAB),
- 50 en el que dicho método se caracteriza porque el indicador es una molécula de conjugado que comprende al menos un polímero de estructura principal y al menos un marcador detectable, en el que al menos un marcador detectable está unido al al menos un polímero de estructura principal por medio de un enlace químico o por medio de una molécula de ligando, en el que el al menos un marcador detectable no es DAB.
2. El método según la realización 1, en el que el al menos un marcador detectable se selecciona de una sustancia fluorescente o cromogénica, sustrato enzimático o miembro de un par de unión específica.
- 55 3. El método según la realización 2, en el que el al menos un marcador detectable es una sustancia fluorescente.

4. El método según la realización 2, en el que el al menos un marcador detectable es un hapteno.
5. El método según la realización 2, en el que el al menos un marcador detectable es un sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP).
- 5 6. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que el indicador comprende una combinación de dos o más marcadores detectables diferentes.
7. El método según la realización 1 ó 6, en el que el al menos un polímero de estructura principal del indicador comprende dextrano.
8. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la actividad peroxidasa está asociada con al menos un resto de una enzima peroxidasa presente en el sitio diana.
- 10 9. El método de la realización 8, en el que la enzima peroxidasa se selecciona de peroxidasa del rábano (HRP) o peroxidasa de soja (SP).
10. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el sitio diana comprende un marcador biológico.
- 15 11. Un método de detección de un marcador biológico en un sitio diana de una muestra biológica *in vitro*, en el que el sitio diana comprende el marcador biológico y actividad enzimática peroxidasa, en el que el método se caracteriza porque comprende la etapa de deposición de un indicador en el sitio diana según el método de cualquiera de las realizaciones 1-10.
12. El método de realización 11, que comprende etapas de
- 20 a) incubar la muestra biológica que presumiblemente comprende el marcador biológico con una o más sondas, en el que (i) al menos una de la una o más sondas comprende al menos un resto de peroxidasa de rábano picante (HRP), y (ii) al menos una de la una o más sondas reconoce y se une específicamente al marcador biológico, formando de ese modo un complejo del marcador biológico con la una o más sondas, en el que al menos una sonda comprende al menos un resto de HRP, formando de ese modo un sitio diana;
- 25 b) incubar la muestra que comprende el sitio diana de (a) en un medio acuoso que comprende DAB, un indicador y un compuesto de peróxido, depositando de ese modo el indicador en el sitio diana;
- c) detectar el indicador depositado de (b) y de ese modo detectar el marcador biológico.
13. El método de la realización 11 ó 12, en el que el marcador biológico es una molécula biológica, estructura, tal como una membrana o estructura cromosómica, complejo molecular o partícula, tal como una partícula de virus.
- 30 14. El método de realización 12 ó 13, en el que la una o más sondas son miembros de un(os) par(es) de unión específica.
15. El método de la realización 14, en el que los miembros de pares de unión específica se seleccionan de pares de unión específica de receptor-ligando, anticuerpo-anticuerpo, dos ácidos nucleicos o dos análogos de ácido nucleico.
- 35 16. El método de cualquiera de las realizaciones 11-15, en el que el método se usa para la detección por inmunocitoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH) de un marcador biológico en una molécula diana comprendida por una célula.
17. El método de la realización 16, en el que el método está automatizado o semiautomatizado.

#### **Descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra ejemplos de las moléculas de agente de reticulación de la invención.

La figura 2 muestra ejemplos de las moléculas de indicador de la invención.

- 40 La figura 3 muestra una presentación esquemática del método de detección de un marcador biológico de la invención aplicado para la detección de dos marcadores diferentes.

#### **Descripción detallada de la invención**

1. Método de deposición dirigida al sitio de un indicador

- 45 En un aspecto la presente invención se refiere a un método de deposición de un indicador en un sitio diana, comprendiendo dicho método incubar un sitio diana en un medio que comprende un indicador y un agente de reticulación, en el que dicho sitio diana comprende una actividad peroxidasa, en el que dicho indicador es un molécula detectable, y en el que dicho agente de reticulación es un molécula que comprende al menos dos restos de

un sustrato de enzima peroxidasa (ver reivindicación 1).

Agente de reticulación

5 El término “agente de reticulación” se usa en el presente documento para referirse a una molécula que puede unir entre sí al menos dos moléculas, por ejemplo al menos dos moléculas de indicador. El agente de reticulación de la invención comprende al menos dos restos de un sustrato de enzima peroxidasa, en el que dichos dos restos pueden enlazarse entre sí mediante un enlace químico, o pueden unirse por medio de una agrupación o molécula de unión. En las reivindicaciones, el agente de reticulación es 3,3'diaminobencidina (DAB). DAB comprende dos restos de sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP) o-fenilendiamina (OPD) (es decir R1 y R2 son los restos de OPD) que están unidos entre sí por medio de un enlace covalente.

10 Indicador

El término “indicador” se usa en el presente documento para referirse a cualquier molécula detectable, en el que la molécula detectable es un molécula seleccionada de una molécula que puede emitir un color, una señal fluorescente o radioactividad, o es un miembro de un par de unión específica, o es un conjugado que comprende un resto detectable, tal como un resto cromogénico, fluorescente, quimioluminiscente, de marcador radiactivo, enzimático, sustrato enzimático, partícula detectable, etc., o es un molécula que puede depositarse a partir del medio que comprende un agente de reticulación (se describieron anteriormente realizaciones del agente de reticulación) en presencia de actividad peroxidasa y que se marca a medida que se deposita.

20 Una sustancia que tiene la capacidad de reticulación según la invención puede usarse en una realización como agente de reticulación o indicador; sin embargo, puede no usarse la misma molécula en la misma realización tanto como agente de reticulación como indicador.

Un agente de reticulación de fórmula

$(R1)_n-(X)_q-(R2)_m$ ,

en la que R1 y R2 son restos de o-fenilendiamina,

X es un enlace covalente, y m, n y q son 1,

25 puede no usarse como indicador en ninguna realización de la invención.

Ejemplos no limitativos de moléculas que pueden usarse como agente de reticulación en una realización e indicador en otra realización son las moléculas D17120 y D17140 descritas anteriormente (véanse también los ejemplos 1.1 a 1.8).

30 La molécula de indicador según la invención es una molécula que es soluble en el medio que comprende un agente de reticulación en ausencia de actividad peroxidasa. La concentración del indicador en el medio puede variar desde aproximadamente  $10^{-9}$  M hasta aproximadamente  $10^{-4}$  M, por ejemplo desde aproximadamente  $10^{-9}$  M hasta aproximadamente  $10^{-8}$  M, tal como desde aproximadamente  $10^{-8}$  M hasta aproximadamente  $10^{-7}$  M, desde aproximadamente  $10^{-7}$  M hasta aproximadamente  $10^{-6}$  M, o desde aproximadamente  $10^{-6}$  M hasta aproximadamente  $10^{-5}$  M, o desde aproximadamente  $10^{-6}$  M hasta aproximadamente  $10^{-4}$  M.

35 El indicador en una realización puede ser una molécula detectable pequeña, por ejemplo seleccionada de una sustancia fluorescente o cromogénica, un hapteno o un sustrato enzimático, o en otra realización el indicador puede ser una molécula grande, por ejemplo un conjugado que comprende un polímero de estructura principal y al menos una sustancia detectable, en el que la sustancia detectable, es decir el marcador detectable, está unido al polímero de estructura principal a través de un enlace químico o a través de una molécula de ligado. Por tanto, el indicador puede ser un conjugado que comprende dos o más moléculas, al menos una de las cuales es detectable, o el indicador puede ser una molécula pequeña, tal como una molécula que tiene una masa molecular que no es mayor de 500-2000 Da, por ejemplo aproximadamente 1000 Da. El indicador-conjugado puede ser una molécula grande, normalmente una molécula de polímero a la que se une un marcador detectable. El tamaño de tales moléculas de indicador puede ser muy diferente y variar desde  $3 \times 10^3$  Da hasta  $3 \times 10^6$  Da o más.

45 El indicador según la invención puede ser también una molécula que no es “detectable”. Tal molécula no puede generar una señal que pueda detectarse, por ejemplo por medio de detección de color, fluorescencia o radioactividad. Tal molécula de indicador puede detectarse cuando se deposita mediante la aplicación de medios secundarios que permiten la detección, por ejemplo moléculas que no son de indicador detectable que pueden unirse específicamente al indicador depositado. Tal detección puede comprender varias etapas en las que se aplicarán una o más sustancias detectables para unirse a esta molécula de indicador “no detectable” depositada y por tanto hacer que sea visualmente detectable.

50 El indicador es una molécula detectable. Puede ser una molécula detectable pequeña, o puede ser una molécula detectable grande. La molécula detectable pequeña es normalmente una molécula directamente detectable (algunas realizaciones de moléculas pequeñas detectables se describen en esta sección y en las siguientes secciones a

continuación). La molécula detectable grande está representada normalmente por una molécula grande, normalmente, no directamente detectable que se hace detectable tras el acoplamiento de esta molécula con una molécula directamente detectable pequeña, u otro marcador detectable. Una molécula de indicador grande que comprende un marcador se denomina en el presente documento “conjugado detectable”. El conjugado detectable según la invención puede comprender dos o más moléculas diferentes, al menos una de las cuales es un marcador detectable.

Tanto una molécula detectable pequeña como un marcador compuesto por una molécula de indicador grande pueden seleccionarse de una sustancia fluorescente, luminescente, bioluminescente, radiactiva o cromogénica.

Pueden usarse varios marcadores fluorescentes, luminiscentes, bioluminiscentes, radiactivos o cromogénicos. Muchos de ellos están disponibles comercialmente, por ejemplo las tinciones fluorescentes Alexa Fluors (Molecular Probes) y Dilight Fluors (Thermo Fisher Scientific). Otros ejemplos no limitados de marcadores y moléculas de indicador pequeñas pueden ser las moléculas del grupo que consiste en 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceína)-5-(y 6)-carboxamidohexanoico, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, Cy2, Cy3, Cy5, AMCA, PerCP, R-ficoeritrina (RPE), aloficoeritrina (APC), rojo Texas, rojo Princeton, unidades nanocristalinas de CdSe recubiertas 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, azufre, yoduro, cobalto, selenio, tritio o fósforo.

En otra realización una molécula detectable pequeña o marcador puede ser una sustancia que es un sustrato enzimático. Un sustrato enzimático puede seleccionarse del grupo que consiste en sustratos de peroxidasa de rábano picante (HRP), excluyendo DAB, fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetilglucosaminidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, invertasa, xantina oxidasa, luciferasa de luciérnaga, glucosa oxidasa (GO). En una realización preferida el marcador de sustrato enzimático puede ser un sustrato de HRP, en otra realización preferida el marcador enzimático puede ser un sustrato de AP.

Los ejemplos de sustratos de HRP útiles incluyen 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), diclorhidrato de bencidina (BDHC), reactivo de Harker-Yates (HYR), azul de indofano (IB), tetrametilbencidina (TMB), 4-cloro-1-naftol (CN),  $\alpha$ -naftolpironina ( $\alpha$ -NP), o-dianisidina (OD), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), azul de nitrotetrazolio (NBT), cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), azul de tetranitrotetrazolio (TNBT), 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactósido/ferro-ferricianuro (BCIG/FF), 5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-(4sulfobutil)-2Hindol-2-iliden]-1-propenil]-3,3dimetil-1-(4sulfobutil)-3H-indolio. En una realización preferida la molécula pequeña puede ser 5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-(4sulfobutil)-2H-indol-2-iliden]-1-propenil]-3,3dimetil-1-(4sulfobutil)-3H-indolio.

Los ejemplos de sustratos de AP útiles incluyen naftol-AS-B1-fosfato/rojo rápido TR (NABP/FR), naftol-AS-MX-fosfato/rojo rápido TR (NAMP/FR), naftol-AS-B1-fosfato/rojo rápido TR (NABP/FR), naftol-AS-MX-fosfato/rojo rápido TR (NAMP/FR), naftol-AS-B1-fosfato/fucsina nueva (NABP/NF), fosfato de bromocloroindolilo/azul de nitrotetrazolio (BCIP/NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galactopiranosido (BCIG).

El marcado o una molécula de indicador pequeña puede ser una enzima. Ejemplos no limitativos de marcadores enzimáticos pueden ser fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetilglucosaminidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, invertasa, xantina oxidasa, luciferasa de luciérnaga, glucosa oxidasa (GO). En una realización preferida el marcador enzimático es AP.

Además, el marcador detectable de una molécula de indicador de conjugado molécula de indicador pequeña puede ser un miembro de un par de unión específica. Miembros de pares de unión específica adecuados para su uso en la puesta en práctica de la invención pueden ser del tipo inmunitario o no inmunitario. Pares de unión específica inmunitarios se ejemplifican por sistemas de antígeno/anticuerpo o sistemas de hapteno/anti-hapteno.

Los haptenos son moléculas pequeñas que permiten por tanto que se unan múltiples copias a una única molécula de polímero, en el caso de que el indicador comprenda tanto un marcador detectable como polímero. Los haptenos proporcionan moléculas diana 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 una sensibilidad potenciada, por ejemplo fuerza de señal potenciada. Los ejemplos de haptenos adecuados incluyen FITC, DNP, myc, digoxigenina, nitrotirosina, biotina, avidina, estreptavidina y anticuerpos anti-colorante frente a por ejemplo los fluoróforos tetrametilrodamina, rojo Texas, dansilo, Alexa Fluor 488, BODIPY FL1, amarillo lucifer y Alexa Fluor 405/Cascade Blue.

El miembro de anticuerpo, ya sea policlonal, monoclonal o un fragmento inmunorreactivo del mismo, del par de unión puede producirse mediante métodos habituales familiares para los expertos en la técnica. Los términos fragmento de anticuerpo inmunorreactivo o fragmento inmunorreactivo significan fragmentos que contienen la región de unión del anticuerpo. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de tipo Fab que se definen como fragmentos que carecen de la parte Fc, por ejemplo fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, o pueden ser los denominados fragmentos de “media molécula” obtenidos mediante escisión reductora de los enlaces disulfuro que conectan los componentes de cadena pesada del anticuerpo intacto. Si el miembro de antígeno del par de unión específica no es inmunogénico,

por ejemplo un hapteno, puede acoplarse covalentemente a una proteína portadora para hacerlo inmunogénico.

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, ácido 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 sulfhidrilo tales como maleimidas y derivados de haloacetilo y grupos reactivos de amina tales como isotiocianatos, ésteres de succinimidilo, haluros de sulfonilo y colorantes acopladores tales como 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetil-amino)benzoico (DMAB), etc.

- 5
- 10 En algunas realizaciones, puede preferirse que los marcadores unidos a una molécula de polímero sean diferentes. En algunas realizaciones puede preferirse usar un indicador que comprende dos o más marcadores diferentes. Puede hacerse cualquier combinación de diferentes marcadores seleccionados de cualquiera de los grupos identificados anteriormente, por ejemplo un indicador puede comprender una combinación de un marcador fluorescente y un marcador enzimático, una combinación de un miembro de un par de unión específica, enzima y/o sustrato enzimático, etc.
- 15

Si el indicador está representado por un conjugado de un polímero con una o más moléculas detectables, en una realización el conjugado puede comprender al menos un polímero y al menos un marcador, en el que el al menos un marcador está unido al al menos un polímero por medio de un enlace químico o por medio de una agrupación de ligado, por ejemplo L30. Se describen ejemplos no limitados de tal indicador en los ejemplos, véase por ejemplo el ejemplo 1.9. Si el conjugado comprende más de un polímero, cada uno de los polímeros puede estar unido a uno o más marcadores detectables. Los marcadores pueden ser iguales o diferentes. Pueden seleccionarse diferentes marcadores de cualquier grupo de los descritos anteriormente y usarse en cualquier combinación deseada.

- 20

Moléculas de indicador que comprenden polímeros

Una molécula de indicador grande puede comprender un polímero. El polímero comprendido por una molécula de indicador grande puede ser cualquier molécula polimérica. Puede ser soluble o insoluble en agua por sí misma, pero cuando sirve como parte de un conjugado de indicador, es soluble o puede hacerse soluble en un medio acuoso o al menos en el medio de la invención descrito más adelante. El polímero se selecciona preferiblemente de moléculas que pueden depositarse a partir del medio que comprende un agente de reticulación en presencia de actividad peroxidasa.

- 25
- 30 Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen polisacáridos tales como dextranos, carboximetildextrano, polialdehído de dextrano, carboximetildextranolactona, y ciclodextrinas; pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantana, gelan, O-etilaminoguaran, quitinas y quitosanos tales como 6-O-carboximetilquitina y N-carboximetilquitosano; materiales celulósicos derivatizados tales como carboximetilcelulosa, carboximetilhidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa, 6-amino-6-desoxicelulosa y O-etilaminocelulosa; almidón hidroxilado, hidroxipropilalmidón, hidroxietilalmidón, carragenanos, alginatos, y agarosa; polisacáridos sintéticos tales como ficol y ficol carboximetilado; polímeros de vinilo incluyendo poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(ésteres acrílicos), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido maleico), poli(anhídrido maleico), poli(acrilamida), poli(etilo-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poli(alcohol vinílico), poli(alcohol vinílico)-co-cloroacetato de vinilo, poli(alcohol vinílico) aminado, y copolímeros de bloque de los mismos; estructuras principales de polímero que contienen polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) incluyendo polímeros y dendrímeros lineales, con forma de peine o hiperramificados, incluyendo dendrímeros de PAMAM ramificados; poliaminoácidos incluyendo polilisinas, poli(ácido glutámico), poliuretanos, poli(etilimininas), pluriol; proteínas incluyendo albúminas, inmunoglobulinas, y proteínas de tipo virus (VLP), y polinucleótidos, ADN, PNA, LNA, oligonucleótidos y constructos de oligonucleótido-dendrímero. También se contempla el uso de polímeros mixtos, es decir, un polímero compuesto por uno o más de los ejemplos anteriores incluyendo cualquiera de los polímeros, los copolímeros de bloque y copolímeros al azar.
- 35
- 40
- 45

La elección del polímero puede depender de la aplicación particular en la que se usa el método de la invención. Pueden seleccionarse propiedades físicas del polímero dependiendo de aplicaciones particulares del método para optimizar el rendimiento. Los ejemplos de estas propiedades físicas incluyen la longitud y ramificación del polímero. Además, el polímero puede llevar diversos sustituyentes. Los sustituyentes pueden estar químicamente protegidos y/o activados, permitiendo que el polímero se derivatice adicionalmente. Por ejemplo en una realización el polímero puede ser un ácido nucleico, en otra realización puede ser un análogo de ácido nucleico, en otra realización puede ser un polipéptido, en otra realización puede ser un polisacárido, en otras realizaciones puede ser cualquier variante de los mismos.

- 50

- 55 Mediante el término "ácido nucleico" quiere decirse un polímero compuesto por una(s) cadena(s) de monómeros de nucleótido. Los ácidos nucleicos más comunes son ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Un nucleótido es un compuesto que consiste en una base heterocíclica (nucleobase), un azúcar y uno o más grupos fosfato. En los nucleótidos más comunes la base es un derivado de purina o pirimidina, y el azúcar es la pentosa (azúcar de cinco carbonos) desoxirribosa o ribosa. Tal como se menciona, los nucleótidos son los monómeros de los

ácidos nucleicos. Las nucleobases son las partes del nucleótido que pueden estar implicadas en el apareamiento de moléculas de ARN y ADN. Las nucleobases incluyen citosina, guanina, adenina, timina (ADN), uracilo (ARN).

Mediante el término “análogo de ácido nucleico” quiere decirse un polímero, que es un homopolímero compuesto por monómeros de nucleótido, en el que las nucleobases pueden ser naturales, modificadas y/o sintéticas, o que es un heteropolímero compuesto por monómeros de nucleobases, aminoácidos y otros tipos de monómeros naturales, modificados y sintéticos. “Homo-” y “hetero-” con respecto a un polímero indican que el polímero está compuesto por un monómero de origen químico diferente, por ejemplo un polímero compuesto por monómeros de nucleobase sólo es un homopolímero, un polímero compuesto por monómeros de nucleobase y aminoácido es un heteropolímero. Un ejemplo de un homopolímero puede ser una molécula de ADN o ARN, un ejemplo de un heteropolímero puede ser una molécula de PNA. El ácido nucleico peptídico (PNA) es un producto químico similar al ADN o ARN. El PNA es un compuesto sintetizado artificialmente. ADN y ARN tienen una estructura principal de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que la estructura principal del PNA está compuesta por unidades de repetición de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las diversas bases de purina y pirimidina se unen a la estructura principal mediante enlaces de carbonilo. Los PNA se representan como péptidos, con el extremo N-terminal en la primera posición (izquierda) y el extremo C-terminal a la derecha. Puesto que la estructura principal de PNA no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las hebras de PNA/ADN es más fuerte que entre las hebras de ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática. Las moléculas de PNA de base mixta son miméticos verdaderos de moléculas de ADN en cuanto al reconocimiento de pares de bases. La unión PNA/PNA es más fuerte que la unión PNA/ADN.

El término “proteína” se usa en el presente documento de manera intercambiable con el término “polipéptido” y se refiere a al menos un polímero compuesto por aminoácidos naturales o artificiales.

El polímero comprendido por una molécula de indicador puede seleccionarse también de un polisacárido, pululano, esquizofilano, escleroglucano, xantana, gelan, O-etilaminoguaran, quitina, quitosano, materiales celulósicos derivatizados, almidón hidroxilado, carragenanos, alginato, agarosa, polisacárido sintético, polímero de vinilo, polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) que contienen estructuras principales de polímero incluyendo dendrímero lineal, con forma de peine o ramificado, poliaminoácido, poli(etilenimina) o pluriol.

En algunas realizaciones el polímero puede ser un polímero mixto compuesto por dos o más polímeros diferentes descritos anteriormente.

En algunas realizaciones preferidas el polímero puede comprender dextrano. En otras realizaciones preferidas el polímero puede comprender al menos un ácido nucleico. En otras realizaciones preferidas el polímero puede comprender al menos un análogo de ácido nucleico. En otra realización preferida el polímero puede consistir en o comprender la molécula L30. En otras realizaciones preferidas el polímero puede comprender al menos un polipéptido.

Tal como ya se mencionó, el polímero puede conjugarse con un marcador detectable. En algunas realizaciones, el marcador detectable puede conjugarse con el polímero directamente, es decir unirse covalentemente al polímero, en otras realizaciones el marcador detectable puede conjugarse con el polímero indirectamente a través de un ligador. Se conocen en la técnica muchos de tales ligadores. Los ejemplos no limitados incluyen polietilenglicol y poliamidas. Una molécula de ligado en una realización puede comprender 5-15 átomos, en otra realización puede comprender 15-30 átomos, en otra realización puede comprender más de 35 átomos, por ejemplo 36-45, en algunas realizaciones el ligador puede comprender más de 45 átomos. Una realización preferida de tal molécula de ligado es L30 descrita anteriormente.

Tal como se mencionó anteriormente, L30 en algunas realizaciones puede servir como polímero de estructura principal de la molécula de conjugado de indicador. Algunas de tales realizaciones se describen a continuación en los ejemplos proporcionados (ejemplos 1.1-1.8) y se muestran en la figura 2. En algunas otras realizaciones L30 puede servir como agrupación de ligado para la unión de marcadores detectables al polímero.

En algunas realizaciones, 1-500 moléculas de marcador detectable pueden unirse directa o indirectamente a una molécula de polímero. En algunas realizaciones, el marcador detectable es una enzima y el número de moléculas de enzima unidas a cada molécula de polímero es de 1-200, 2-50, 2-25. En algunas realizaciones, el marcador detectable es un una partícula de oro, un colorante, un fluorocromo de bajo peso molecular y el número de sustancias detectables unidas a cada molécula de polímero es de 1-500, 1-200, 1-100, 10-100, 20-50, 50-100, 1-50, 2-30, 10-20. En algunas realizaciones, el marcador detectable es un fluorocromo de proteína, y el número de moléculas detectables unidas a una molécula de polímero es de 1-50, 2-20. En algunas otras realizaciones el marcador detectable es un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, por ejemplo una molécula de PNA u oligonucleótido, y el número de moléculas detectables unidas a un polímero es de 1-200, 2-50, 2-25.

Se conocen en la técnica muchos métodos de formación de conjugados poliméricos y pueden usarse para preparar los conjugados poliméricos de la invención. En algunas realizaciones una sustancia detectable, si se desea, puede unirse químicamente, o conjugarse, con una estructura principal polimérica. En algunas realizaciones, el conjugado

de polímero se forma mediante acoplamiento covalente de grupos aminos a dobles enlaces conjugados. El polímero puede activarse con vinilsulfona y mezclarse con una sustancia detectable para formar el conjugado de polímero. En otras realizaciones, se usan aldehídos para activar una estructura principal polimérica, por ejemplo, dextranos que entonces se mezclan con una sustancia detectable. Aun otro método de preparación de conjugados poliméricos es usando los denominados esquemas de acoplamiento quimioselectivos para acoplar los componentes entre sí, por ejemplo, pueden derivatizarse enzimas u otras moléculas con grupos maleimida reactivos con tiol antes de acoplarse covalentemente con una estructura principal o portador polimérico modificado con tiol. Otras realizaciones descritas a continuación permiten que los propios reactivos formen conjugados, por ejemplo la sustancia detectable.

Tal como se mencionó anteriormente, el polímero puede servir por sí mismo como molécula de indicador y no comprende ningún marcador detectable. Ejemplos no limitados de tales polímeros pueden ser ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos y proteínas.

#### Moléculas de indicador pequeñas

Tal como ya se comentó anteriormente, el indicador puede ser una molécula pequeña. Por "molécula pequeña" quiere decirse una molécula no polimérica de no más de 3000 Da, normalmente, de desde alrededor de 200 hasta alrededor de 1000 Da, por ejemplo alrededor de 500 Da. Normalmente tal molécula de indicador pequeña es soluble en el medio de la invención que comprende un agente de reticulación. La invención se refiere a cualquier clase de molécula pequeña que pueda depositarse a partir del medio en presencia de una peroxidasa.

La molécula pequeña puede ser una sustancia directamente detectable. Los ejemplos de tales sustancias incluyen pero no se limitan a 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceína)-5-(y 6)-carboxamidohexanoico, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, Cy2, Cy3, Cy5, AMCA, PerCP, R-ficoeritrina (RPE), aloficoeritrina (APC), rojo Texas, rojo Princeton, unidades nanocristalinas de CdSe recubiertas con proteína fluorescente verde (GFP), DNP, digoxigenina, luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas, e isótopos radiactivos de hidrógeno, carbono, azufre, yoduro, cobalto, selenio, tritio y fósforo. La sustancia cromogénica puede seleccionarse de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (ADHP), 3-amino-9-etilcarbazol, 4-cloro-1-naftol (AEC), o-fenilendiamina (OPD), ácido 2,2'-azido-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, 5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-(4sulfobutil)-2H-indol-2-iliden]-1-propenil]-3,3dimetil-1-(4sulfobutil)-3H-indolio. En una realización, la molécula detectable pequeña puede ser un sustrato para una peroxidasa, preferiblemente peroxidasa de rábano picante (HRP). En una realización preferida la molécula detectable pequeña es 5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-(4sulfobutil)-2H-indol-2-iliden]-1-propenil]-3,3dimetil-1-(4sulfobutil)-3H-indolio.

En algunas realizaciones la molécula pequeña puede ser una molécula que no puede detectarse directamente, por ejemplo una sustancia que no puede convertirse en coloreada, fluorescente o quimioluminiscente, por ejemplo biotina, o un sustrato de una enzima peroxidasa tal como ácido ferúlico o tirosina. En tales realizaciones puede acoplarse una sustancia detectable a esta clase de molécula pequeña. Por ejemplo la molécula pequeña y la sustancia detectable pueden derivatizarse, por ejemplo, con grupos vinilo. La polimerización se produce mediante la adición de un radical, que da como resultado polimerización de los grupos vinilo para formar un conjugado polimérico. El conjugado por tanto contendrá una estructura principal de polivinilo o bloques de polivinilo. Pueden usarse ésteres activos de ácido acrílico para activar las moléculas. La generación de radicales libres puede polimerizar las moléculas derivatizadas. Pueden añadirse adicionalmente ligadores de molécula pequeña con más de un grupo vinilo para ayudar a formar un conjugado polimérico de una molécula pequeña y una sustancia detectable. En algunas otras realizaciones, la molécula pequeña y la sustancia detectable pueden derivatizarse con un aglutinante cruzado. Los ejemplos de este método incluyen el uso de aglutinantes cruzados homobifuncionales tales como dialdehído glutárico, diisocianato de hexano, dimetilapimidato, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno, aglutinantes cruzados heterobifuncionales como por ejemplo éster de N-gamma-maleimidobitiroloxisuccinimida, y aglutinantes cruzados de longitud cero tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Eligiendo las condiciones de reacción correctas, los aglutinantes cruzados pueden formar puentes entre diversos grupos funcionales en, por ejemplo, las sustancias detectables y los agentes detectables para formar una molécula de indicador polimérica.

#### Peroxidasa

Cualquier enzima que pueda tener actividad peroxidasa es adecuada para poner en práctica la presente invención.

Según la invención está presente actividad peroxidasa en un sitio diana. El término "sitio diana" se refiere a un sitio en el que la molécula de indicador va a depositarse, por ejemplo un sitio que comprende un marcador biológico o químico. Según la invención la actividad peroxidasa está asociada con al menos un resto de una enzima peroxidasa presente en el sitio diana. El término "un resto" significa que la peroxidasa puede ser una proteína natural o recombinante o un derivado de la misma, por ejemplo un fragmento de la misma que puede presentar actividad peroxidasa. En particular, la peroxidasa puede seleccionarse de peroxidasa de rábano picante (HRP) o peroxidasa de soja (SP), fragmentos, proteínas recombinantes o de fusión de las mismas. En una realización preferida la peroxidasa es HRP.

- En una realización el sitio diana puede ser un sitio de cualquier soporte sólido que comprende actividad peroxidasa. Los soportes adecuados incluyen soportes de polímero sintético, tales como poliestireno, polipropileno, poliestireno sustituido, por ejemplo, poliestireno amidado o carboxilado; poliacrilamidas; poliamidas; poli(cloruro de vinilo), etc.; perlas de vidrio; agarosa; nitrocelulosa; nailon; poli(fluoruro de vinilideno); nailon modificado en la superficie, etc.
- 5 Una molécula de peroxidasa puede inmovilizarse directa o indirectamente sobre estos soportes.
- El sitio diana puede ser un sitio de una muestra biológica, por ejemplo un sitio de una membrana celular, orgánulo celular, en el caso de que la muestra biológica comprenda una célula, puede ser también un sitio de una muestra biológica libre de células, por ejemplo muestra de plasma o lisado o extracto celular que se inmoviliza sobre un soporte sólido tal como se describió anteriormente. Tal sitio comprenderá normalmente un marcador biológico que
- 10 puede ser una estructura o molécula diana. La actividad peroxidasa normalmente estará asociada con la molécula diana indirectamente, por ejemplo como parte de una sonda específica unida a la molécula diana.
- Medio
- El medio usado en el método de la invención es un medio a partir del cual puede depositarse una molécula de indicador soluble en presencia de actividad peroxidasa. Es una disolución tamponada acuosa con un pH de desde
- 15 aproximadamente 4 hasta aproximadamente 9, que comprende esencialmente
- (i) un compuesto que puede reticular al menos dos moléculas de indicador en presencia de actividad peroxidasa, en el que dicho compuesto es una molécula que comprende al menos dos restos de un sustrato de enzima peroxidasa, y en el que al menos una de dichas dos moléculas de indicador es un molécula detectable, y
- (ii) un compuesto de peróxido.
- 20 Se comentaron en detalle anteriormente moléculas de indicador solubles adecuadas comprendidas en el medio.
- También se comentaron en detalle anteriormente compuestos adecuados que pueden reticular al menos dos moléculas de indicador en presencia de actividad peroxidasa según la invención. En una realización preferida el compuesto de reticulación es DAB.
- La cantidad del compuesto de reticulación en el medio puede variar de desde aproximadamente  $10^{-5}$  hasta
- 25 aproximadamente  $10^{-2}$  M, tal como desde aproximadamente  $10^{-5}$  hasta aproximadamente  $10^{-3}$  M, o desde aproximadamente  $10^{-4}$  hasta aproximadamente  $10^{-2}$  M, o desde aproximadamente  $10^{-5}$  hasta aproximadamente  $10^{-4}$  M, o desde aproximadamente  $10^{-4}$  hasta aproximadamente  $10^{-3}$  M. La concentración del agente de reticulación puede optimizarse para diferentes realizaciones, por ejemplo cuando se pretende la deposición de diferentes indicadores.
- 30 El medio según la invención comprende un compuesto de peróxido. El compuesto de peróxido puede seleccionarse de peróxidos orgánicos tales como peróxido de terc-butilo, peróxido de diterc-butilo, ácido peracético, o puede ser un aducto de peróxido de hidrógeno, tal como aducto de peróxido de hidrógeno-urea. En algunas realizaciones el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puede ser el peróxido preferido. La cantidad del compuesto de peróxido en el medio varía de desde aproximadamente  $10^{-4}$  hasta aproximadamente  $10^{-2}$  M en diferentes realizaciones.
- 35 El medio puede comprender además un modificador orgánico y un modificador orgánico y sal orgánica o inorgánica.
- La sal inorgánica puede seleccionarse por ejemplo de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio o sulfato de amonio.
- En otras realizaciones el medio puede comprender una sal orgánica, tal como sales de acetato de sodio, acetato de amonio o imidazol, por ejemplo clorhidrato de imidazol.
- 40 La concentración de sal en el medio puede oscilar entre aproximadamente  $10^{-3}$  M y la saturación, por ejemplo entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 200 mM, o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM. En una realización preferida, el medio puede comprender sal en la cantidad de desde aproximadamente 10 mM hasta 500 mM. En otra realización preferida el medio puede estar libre de sal.
- Normalmente el valor de pH del medio puede variar desde alrededor de 4 hasta alrededor de 9. Puede usarse cualquier tampón con una capacidad de tamponamiento adecuada, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón imidazol. Otros tampones adecuados pueden encontrarse en Good, NE., *et al* (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochem.* 5(2), 467-477. El valor de pH del medio puede ser esencial para depositar el indicador; puede optimizarse dependiendo de la naturaleza del indicador.
- 45 El medio puede comprender además en diferentes realizaciones:
- 50 (i) un modificador orgánico y/o
- (ii) un potenciador enzimático, y/o

(iii) un quelante de hierro, y/o

(iv) un detergente, y/o

(v) un agente antimicrobiano

5 Mediante el término “modificador orgánico” quiere decirse cualquier disolvente no acuoso que potencia la solubilidad del indicador. En tales realizaciones es suficiente que el modificador esté presente en el medio en la cantidad de alrededor del 1% (v/v o p/v), sin embargo, en algunas realizaciones pueden requerirse concentraciones superiores del modificador orgánico. El modificador orgánico puede ser por ejemplo polietilenglicol (PEG). Otros ejemplos incluyen pero no se limitan a modificadores orgánicos seleccionados del grupo que consiste esencialmente en alcoholes inferiores, N-metilpirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), mono- y dietilenglicol, sulfolano, N,N-dimetilformamida (DMF). En algunas realizaciones puede ser ventajoso usar polietilenglicol (PEG), por ejemplo PEG2000. La concentración de polietilenglicol en el medio en estos casos puede variar desde aproximadamente el 0,1% (v/v) hasta aproximadamente el 20% (v/v), por ejemplo desde aproximadamente el 1% (v/v) hasta aproximadamente el 15%, tal como el 5-10% (v/v).

15 Mediante el término “potenciador enzimático” quiere decirse cualquier compuesto que potencie la actividad catalítica de la peroxidasa. Tal potenciador enzimático puede seleccionarse del grupo que consiste esencialmente en derivados de ácido fenilborónico e iones de metales divalentes tales como níquel o calcio. La concentración del potenciador enzimático puede variar desde aproximadamente  $10^{-7}$  hasta aproximadamente  $10^{-3}$  M.

20 El quelante de hierro puede ser ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) o un quelante de tipo ácido etilendiaminahidroxiifenilacético (EDHPA). La concentración del quelante de hierro puede variar de desde aproximadamente  $10^{-6}$  hasta aproximadamente  $10^{-2}$  M.

El detergente puede seleccionarse de polietilenglicol-p-isoctifenil éter (NP-40), un tensioactivo seleccionado de los tensioactivos basados en monolaurato de polioxietilen-sorbitano (Tween), o un tensioactivo basado en copolímeros de bloque (Pluronic, etc.). La concentración del detergente puede variar de desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 5%.

25 Según la invención la composición del medio es una disolución estable. El término “estable” en el presente contexto significa que la capacidad del medio para servir como medio de reacción para la deposición de indicador mediada por peroxidasa sigue estando esencialmente sin cambios durante periodos de tiempo sustanciales; de manera que el medio puede retener su capacidad reactiva sin afectar durante al menos 4 horas a temperatura ambiente.

30 El medio también puede conservarse durante periodos de tiempo más largos. Para prolongar la semivida del medio, puede recomendarse almacenar el medio a temperaturas por debajo de 20°C, por ejemplo a 4- 10°C, y/o añadir al medio un compuesto antimicrobiano. El compuesto antimicrobiano puede ser cualquier compuesto antimicrobiano comúnmente usado para tal fin, por ejemplo azida de sodio, Proclin™ o Bronidox®.

El medio descrito anteriormente es un medio de reacción para depositar un indicador en un sitio diana que comprende actividad peroxidasa, por ejemplo un sitio que comprende un marcador biológico.

## 35 2. Método de detección de una diana en una muestra biológica

El método de deposición de un indicador en un sitio diana descrito anteriormente puede usarse ventajosamente para detectar marcadores biológicos asociados con este sitio diana, por ejemplo moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, etc. porque el sitio diana puede ser un sitio de una muestra biológica, por ejemplo un sitio de una membrana celular, orgánulo celular, en el caso de que la muestra biológica comprenda una célula, o puede ser un sitio de una muestra biológica libre de células cargada sobre un soporte sólido, por ejemplo muestra de plasma o lisado celular o extracto celular que se inmoviliza sobre un soporte sólido tal como se describió anteriormente. El término “marcador biológico” significa en el presente contexto una molécula, complejo molecular o estructura que es específico para una especie biológica, tipo de célula, compartimento celular, estado fisiológico, etc. Los ejemplos no limitados de tal marcador biológico incluyen pero no se limitan a una secuencia genética, proteína particular u otra molécula biológica, estructura de membrana o cromosómica, virus etc. que está asociada con una enfermedad particular. Se usan comúnmente marcadores biológicos en diagnóstico médico como marcadores de enfermedades y dianas terapéuticas particulares.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de detección de un marcador biológico *in vitro* tal como se expone en las reivindicaciones 14 y 15.

## 50 Etapa (a) de la reivindicación 15

La muestra biológica que comprende un marcador biológico puede ser cualquier muestra biológica que comprenda células intactas o dañadas, por ejemplo una muestra de tejido corporal o lisado celular.

Los ejemplos no limitativos de la muestra biológica de la invención incluyen:

- una muestra de medio líquido que comprende células suspendidas, por ejemplo muestra de sangre, suspensión de células clonales o suspensión de células disociadas de un tejido corporal;

5 - una muestra de un tejido corporal, por ejemplo una muestra de biopsia; la muestra de tejido puede ser una muestra de tejido reciente, o puede ser una muestra de tejido conservado, por ejemplo una muestra de tejido fijada en formalina e incrustada en parafina,

- una muestra de un tumor;

- una muestra derivada de cualquier organismo vivo, por ejemplo, animal, planta, bacterias, etc. Puede comprender células eucariotas o células procariotas o ambas. Puede ser un frotis celular,

10 - una muestra que comprende partículas virales, residuos de las mismas o productos virales, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos virales, etc.

La muestra biológica que presumiblemente comprende un marcador biológico se incuba según el método de la invención con al menos una sonda que comprende al menos un resto de HRP o resto de otra enzima peroxidasa.

15 El término "incubar" significa que la muestra se mantiene en un medio que comprende una sonda (o un medio que comprende un agente de reticulación y un indicador (etapa (b)) durante un determinado periodo de tiempo. Este periodo de tiempo puede variar desde 1-3 min hasta 1-2 horas o más, por ejemplo durante la noche. La incubación puede realizarse a diferentes temperaturas dependiendo de las diferentes realizaciones, por ejemplo el tipo de molécula de marcador biológico que va a detectarse o el tipo de sonda y/o indicador usado para la detección.

Una sonda o más sondas con las que la muestra está incubándose reconocen y se unen específicamente a un marcador biológico presente en la muestra.

20 Las sondas que reconocen el marcador biológico pueden unirse específicamente a este marcador y sólo a este marcador. Normalmente tales sondas son miembros de pares de unión específica.

25 Se conocen en la técnica varios pares de unión específica diferentes. En una realización los miembros de un par de unión específica pueden ser dos moléculas de anticuerpo. En otra realización, los miembros de un par de unión específica pueden ser dos ácidos nucleicos complementarios. En otra realización, los miembros de un par de unión específica pueden ser dos moléculas de análogo de ácido nucleico. En otra realización el miembro de un par de unión específica puede ser un miembro de pares de unión de receptor-ligando particulares.

Una sonda que puede unirse específicamente al marcador biológico y es el miembro de un par de unión específica, por ejemplo una sonda de anticuerpo primario sonda, se diseña en el presente documento como primera sonda. La primera sonda puede marcarse opcionalmente con un resto de enzima peroxidasa.

30 En una realización la primera sonda puede comprender al menos un resto de HRP u otra enzima peroxidasa, por ejemplo peroxidasa de soja (SP). Un ejemplo no limitativo de tal sonda puede ser una molécula de anticuerpo primario marcado con HRP o un derivado del mismo, o una sonda de ácido nucleico marcado con HRP. Tales primeras sondas se unen específicamente a los marcadores biológicos correspondientes y marcan estos marcadores biológicos con actividad peroxidasa y forman de ese modo sitios diana.

35 En otra realización la primera sonda puede no estar marcada, es decir no comprender un resto de una peroxidasa. En esta realización, puede unirse un resto de peroxidasa a un sitio diana a través de una segunda sonda. La segunda sonda es una sonda que puede unirse específicamente a la primera sonda, por ejemplo es el otro miembro de un par de unión específica. Ejemplos no limitativos de tales sondas pueden ser moléculas de anticuerpos secundarios de derivados de los mismos, sondas de ácido nucleico o miembros de pares de unión de receptor-ligando. Tal segunda sonda puede comprender al menos un resto de HRP u otra enzima peroxidasa por ejemplo peroxidasa de soja (SP). Uniéndose a la primera sonda, la segunda sonda que comprende actividad peroxidasa marcará el sitio en donde se encuentra el marcador biológico con esta actividad peroxidasa y formará de ese modo un sitio diana.

40 En otra realización, tanto la primera como la segunda sonda pueden comprender al menos un resto de enzima peroxidasa, por ejemplo HRP y/o SP.

45 La etapa (a) puede incluir en algunas realizaciones varias subetapas en las que se usan sondas tercera y cuarta. Por ejemplo, antes de avanzar a la etapa (b) del procedimiento, la muestra que comprende un marcador biológico puede incubarse secuencialmente con múltiples sondas, de las cuales las primeras sondas pueden unirse al marcador biológico, mientras que las sondas segunda, tercera y las otras pueden unirse entre sí, es decir las segundas sondas con las primeras sondas, las terceras sondas con las segundas sondas, etc., y por tanto una molécula de marcador se asociará con muchas sondas diferentes. Cada sonda puede comprender uno o más restos de una enzima peroxidasa. Tal marcaje con múltiples sondas de un único marcador biológico puede usarse cuando es deseable una alta acumulación de actividad peroxidasa en un único sitio diana. Esto puede ser útil para la potenciación de la deposición de indicador en un único sitio diana.

Antes de avanzar a la etapa (b) del método, puede repetirse la etapa (a) tantas veces como se desee con el fin de

5 aumentar la acumulación de actividad peroxidasa en el sitio diana.

Etapa (b) en la reivindicación 15:

La muestra que comprende un sitio diana formado en la etapa (a) se incuba además en un medio que comprende un agente de reticulación y un indicador según la invención.

5 Se comentaron anteriormente detalles de la composición del medio adecuado para la incubación de la etapa (b). La composición del medio puede variar dependiendo de la especie de moléculas de indicador y agente de reticulación usadas y la naturaleza de un marcador biológico particular que va a detectarse. Por ejemplo, el medio puede comprender DAB como agente de reticulación cuando el indicador es un indicador que comprende una estructura principal de polímero a la que se unen varios marcadores fluorescentes (por ejemplo moléculas de indicador  
10 descritas en el ejemplo 6 ó 7).

La incubación de la etapa (b) según la invención da como resultado que las moléculas de indicador presentes en el medio de incubación se depositen en los sitios diana, es decir los sitios de una muestra biológica que comprenden un marcador biológico marcado con actividad peroxidasa. Debido a que el indicador se deposita sólo en o alrededor del sitio de la presencia de actividad peroxidasa, el sitio de su deposición es el sitio en donde el marcador biológico está presente.  
15

En una realización, la etapa (b) puede comprender al menos dos incubaciones:

(i) incubación de la muestra en el medio que comprende un agente de reticulación (es decir sin un indicador); seguido por

(ii) incubación de la muestra en el medio que comprende tanto agente de reticulación como indicador.

20 La etapa (b) puede repetirse opcionalmente.

Etapa (c) en la reivindicación 15:

Tal como se comentó anteriormente, la molécula de indicador es una molécula detectable. Se describieron anteriormente diferentes realizaciones de moléculas de indicador detectables.

25 La detección del indicador puede ser "directa" (la detección en una etapa en el caso de que el indicador depositado pueda emitir una señal cromogénica, radiactiva o fluorescente que puede detectarse por medios adecuados).

La detección puede ser "indirecta" (comprende varias etapas de detección, por ejemplo cuando el indicador depositado es un miembro no marcado de un par de unión específica, por ejemplo sonda de anticuerpo o ácido nucleico. Tal indicador puede detectarse mediante un procedimiento que comprende varias etapas de detección, etapas en las que pueden usarse varias sondas detectables diferentes. Cada sonda usada en cada etapa puede comprender múltiples marcadores detectables. Los marcadores también pueden ser marcadores enzimáticos, por ejemplo restos de HRP. Tal detección indirecta del indicador depositado en algunas realizaciones puede preferirse, por ejemplo cuando es deseable amplificar la señal asociada con el indicador depositado en un sitio diana.  
30

Una muestra que comprende el indicador depositado al que se une una sonda que reconoce el indicador puede incubarse adicionalmente en el medio que comprende un agente de reticulación y otro indicador. En el caso de que la sonda unida al indicador comprenda un resto de una peroxidasa, esta incubación adicional puede usarse para la deposición de otro indicador en el mismo sitio diana; esto puede usarse para la amplificación de la señal inicial que emana del sitio diana y por tanto para la potenciación de la sensibilidad de la detección, o puede usarse para el marcaje del sitio diana con un marcador detectable que es diferente del marcador usado en la deposición inicial. Tal incubación adicional puede repetirse varias veces.  
35

40 El método de detección de dianas biológicas descrito anteriormente puede usarse en una variedad de formatos de ensayo. Algunas realizaciones de estos formatos de ensayo se describen a continuación y se ilustran mediante ejemplos de trabajo no limitativos de la invención.

Formatos de ensayo

45 Pueden detectarse moléculas diana comprendidas por células de una suspensión celular empleando el método descrito anteriormente en cualquier formato de ensayo adecuado, por ejemplo en citometría de flujo (FC), o ELISA, o inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH).

En una realización la muestra biológica puede ser una suspensión de células. Pueden detectarse moléculas diana o estructuras de células en suspensión usando FC, ELISA, IHC o ISH. Cuando se usan ELISA, IHC o ISH para la detección, células de la suspensión han de unirse a un soporte sólido, por ejemplo placa de ELISA o portaobjetos de ICH.  
50

En otra realización la muestra biológica puede ser un corte de un tejido corporal. Moléculas diana o estructuras de

células de tales muestras se detectarán normalmente usando IHC o ISH.

Los formatos de ensayo de IHC e ISH requieren habitualmente una serie de etapas de tratamiento realizadas sobre una sección de tejido montada sobre un soporte sólido adecuado para inspección microscópica, o la producción de fotomicrografías, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano, para resaltar mediante tinción selectiva determinados indicadores morfológicos de estados patológicos o la detección de marcadores biológicos. Por tanto, por ejemplo en IHC, se toma una muestra de un individuo, se fija y se expone a anticuerpos que se unen específicamente al marcador biológico de interés. Las etapas de procesamiento de la muestra pueden incluir, por ejemplo, recuperación de antígenos, exposición a un anticuerpo primario, lavado, exposición a un anticuerpo secundario (opcionalmente acoplado a un resto de HRP), lavado y exposición a un anticuerpo terciario unido a uno o más restos de HRP. Las etapas de lavado pueden realizarse con cualquier disolvente o tampón adecuado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con tris (TBS), agua destilada. El tampón de lavado puede contener opcionalmente un detergente, por ejemplo, Tween 20.

Tal como se mencionó anteriormente, hay en general dos categorías de muestras histológicas: (1) preparaciones que comprenden tejidos y/o células recientes, que generalmente no están fijados con fijadores a base de aldehído, y (2) especímenes de tejido fijados e incrustados, a menudo material archivado.

Antes de realizar la detección de una diana en el formato de ensayo de IHC, ha de realizarse un procedimiento antes de la detección. Puede implicar las etapas de: cortar y recortar el tejido, fijación, deshidratación, infiltración de parafina, cortar en secciones finas, montar sobre portaobjetos de vidrio, hornear, desparafinación, rehidratación, recuperación de antígenos, etapas de bloqueo, aplicar un anticuerpo primario, lavar, aplicar conjugado de anticuerpo secundario - enzima y lavar.

En ISH, se toma una muestra de un individuo, se fija y se expone a una sonda de ácido nucleico que se hibrida en virtud de apareamiento de bases complementarias con el ácido nucleico de interés. La muestra biológica comprende normalmente un ácido nucleico detectable, tal como ADN y ARN, incluyendo ARN mensajero. La detección de los niveles de ADN/ARN puede indicar el nivel de expresión de un gen particular, y por tanto puede usarse para detectar un estado (tal como un estado patológico) de una célula, un tejido, un órgano o un organismo. El ácido nucleico en la muestra se desnaturaliza normalmente para exponer sitios de unión. La sonda es normalmente un ácido nucleico mono o bicatenario, tal como un ADN o ARN, o un análogo de ácido nucleico, tal como PNA. La cantidad de la proteína o ácido nucleico diana relevante detectada mediante tales técnicas se evalúa entonces para determinar si está por encima de un cierto umbral mínimo predeterminado o se compara con un patrón conocido, y por tanto, relevante para el diagnóstico. Entonces puede planearse el tratamiento adecuado para el individuo si es necesario.

Se conocen muchos métodos de fijación e incrustación de especímenes de tejido, por ejemplo, fijación con alcohol y fijación con formalina e incrustación en parafina posterior (FFPE).

Son necesarios fijadores para conservar células y tejidos de una manera reproducible y similar a la vida. Para lograr esto, se sumergen bloques, secciones o frotis de tejido en un fluido fijador, o en el caso de frotis, se secan. Los fijadores estabilizan las células y tejidos protegiéndolos de ese modo de los rigores de las técnicas de procesamiento y tinción.

Puede usarse cualquier agente de fijación adecuado, por ejemplo, etanol, ácido acético, ácido pícrico, 2-propanol, tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina dihidratado, acetoína (mezcla de monómero) y dímero, acroleína, crotonaldehído (cis+trans), formaldehído, glutaraldehído, glioxal, dicromato de potasio, permanganato de potasio, tetróxido de osmio, paraformaldehído, cloruro mercúrico, 2,4-diisocianato de tolieno, ácido tricloroacético, ácido tungstíco. Otros ejemplos incluyen formalina (formaldehído acuoso) y formalina tamponada neutra (NBF), glutaraldehído, acroleína, carbodiimida, imidatos, benzoquinona, ácido ósmico y tetróxido de osmio.

Especímenes de biopsia recientes, preparaciones citológicas (incluyendo implantes y frotis de sangre), secciones y tejidos congelados para análisis inmunohistoquímico se fijan comúnmente en disolventes orgánicos, incluyendo etanol, acético ácido, metanol y/o acetona.

Para facilitar el reconocimiento específico en tejido fijado, a menudo es necesario recuperar o desenmascarar las dianas, es decir, los marcadores biológicos de interés, a través de tratamiento previo de los especímenes para aumentar la reactividad de la mayoría de las dianas. Este procedimiento se denomina "recuperación de antígenos", "recuperación de dianas" o "recuperación de epitopos", "desenmascaramiento de dianas" o "desenmascaramiento de antígenos". Puede encontrarse una revisión extensa de la recuperación de antígenos (desenmascaramiento de antígenos) en Shi *et al.* 1997, *J Histochem Cytochem*, 45(3):327.

La recuperación de antígenos incluye una variedad de métodos mediante los cuales se maximiza la disponibilidad de la diana para su interacción con un reactivo de detección específico. Las técnicas más comunes son digestión enzimática con una enzima proteolítica (por ejemplo proteinasa, pronasa, pepsina, papaína, tripsina o neuraminidasa) en un tampón apropiado o recuperación de epitopos inducida por calor (HIER) usando irradiación con microondas, calentamiento en un baño de agua, una caldera, un horno normal, un autoclave o una olla a presión en un tampón de pH estabilizado apropiadamente, que contiene habitualmente EDTA, EGTA, Tris-HCl, citrato, urea, glicina-HCl o ácido bórico. Pueden añadirse detergentes al tampón de HIER para aumentar la recuperación de

epítomos o añadirse al medio de dilución y/o tampones de aclarado para disminuir la unión no específica.

El tampón de recuperación de antígenos es lo más a menudo acuoso, pero también puede contener otros disolventes, incluyendo disolventes con un punto de ebullición por encima del del agua. Esto permite el tratamiento del tejido a más de 100°C a presión normal.

- 5 Adicionalmente, la razón de señal con respecto a ruido puede aumentarse mediante diferentes métodos físicos, incluyendo la aplicación de vacío y ultrasonidos, o congelando y descongelando las secciones antes o durante la incubación de los reactivos.

10 Pueden eliminarse sitios de unión a biotina endógenos o actividad enzimática endógena (por ejemplo fosfatasa, catalasa o peroxidasa) como etapa en el procedimiento de detección, por ejemplo, la actividad peroxidasa y de biotina endógena puede eliminarse mediante tratamiento con peróxidos. La actividad fosfatasa endógena puede eliminarse mediante tratamiento con levamisol. Las fosfatasas y esterasas endógenas pueden destruirse mediante calentamiento.

15 Puede usarse el bloqueo de sitios de unión no específica con proteínas inertes como albúmina sérica equina (HSA), caseína, albúmina sérica bovina (BSA) y ovoalbúmina, suero de ternera fetal u otros sueros, o detergentes como Tween20, Triton X-100, Saponin, Brij o Pluronic. También puede usarse el bloqueo de sitios de unión no específica en el tejido o las células con versiones no marcadas y no específicas de diana de los reactivos específicos.

También pueden prepararse muestras y detectarse moléculas diana usando la técnica de flotación libre. En este método se pone en contacto una sección de tejido con diferentes reactivos y tampones de lavado en suspensión o flotando libremente en recipientes apropiados, por ejemplo tubos de microcentrífuga.

20 Las secciones de tejido pueden transferirse de tubo a tubo con diferentes reactivos y tampones durante el procedimiento de tinción usando por ejemplo un dispositivo "similar a un anzuelo", una espátula o un anillo de vidrio. Los diferentes reactivos y tampón también pueden cambiarse mediante decantación suave o succión a vacío. Alternativamente, los recipientes con las secciones de tejido pueden vaciarse en una red de tinción especial, como la "Netwell" de Corning (Corning,) y la sección de tejido lavarse antes de transferirse de nuevo al tubo para la siguiente etapa de tinción.

25 Todas las etapas, incluyendo por ejemplo fijación, recuperación de antígenos, lavado, incubación con reactivos de bloqueo, reactivos inmuno-específicos y la deposición de indicador mediada por peroxidasa, se realizan mientras que la sección de tejido está flotando libremente o retenida sobre redes. Tras la deposición del indicador, la sección de tejido se monta sobre portaobjetos, el indicador se detecta y el portaobjetos se cubre con un cubreobjetos antes de analizarse, por ejemplo, mediante microscopía óptica o fluorescente.

30 En algunas realizaciones, la sección de tejido puede montarse sobre portaobjetos tras la incubación crítica con los reactivos inmuno-específicos siguiendo el procedimiento (a) del método. El resto del procedimiento de detección se realiza entonces sobre las secciones de tejido montadas en portaobjetos.

#### Marcadores biológicos detectables

35 Detectable mediante el método, el marcador biológico puede ser cualquier molécula o estructura presente en una muestra, preferiblemente en una muestra biológica, por ejemplo una proteína, glicoproteína, lipoproteína, fosfoproteína, proteína metilada, o un fragmento de proteína, por ejemplo, un péptido o un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN, es un lípido, un glicolípido, o un azúcar, un polisacárido, o un almidón. El marcador biológico puede expresarse sobre la superficie de la muestra biológica, por ejemplo, unido a la membrana. El marcador puede estar contenido en el interior de la muestra biológica, es decir, dentro de la membrana celular, por ejemplo, dentro del citoplasma, dentro del núcleo, dentro de compartimento intracelular u orgánulo. El marcador biológico puede ser una estructura celular, tal como un microdominio de membrana, canal iónico, estructura cromosómica, etc., o puede ser un complejo molecular, por ejemplo complejo de ARN-proteína, etc. Un marcador biológico es preferiblemente un marcador biológico específico, por ejemplo es un marcador de un estado normal o patológico, o es específico para una célula o tejido particular, o es específico para una especie biológica particular. La detección de tal marcador biológico puede ser útil en el diagnóstico y tratamiento de estados patológicos.

40 La invención se refiere a la detección al menos un marcador biológico en una muestra biológica. Por consiguiente la invención también proporciona la detección de múltiples marcadores biológicos, por ejemplo, dos, tres, en una muestra dada y por tanto proporciona un método de obtención de datos, por ejemplo, información de diagnóstico, referencia a la expresión de marcadores biológicos, paneles de proteínas, genes o combinaciones de una o más proteínas y uno o más genes. Como ejemplo, pero no como limitación, pueden examinarse la proteína HER2 y el gen de HER2 simultáneamente en un ensayo de diagnóstico de cáncer, por ejemplo, un ensayo para detectar cáncer de mama. Otro ejemplo no limitativo puede incluir el examen de tres marcadores, por ejemplo, para detectar cáncer de cuello uterino. Los marcadores pueden incluir Ki67/mib-1, así como el marcador de proliferación celular, p16(INK4a), junto con un marcador, por ejemplo, una proteína o un ácido nucleico, para el virus del papiloma humano. Aún otro ejemplo no limitativo incluye el examen de múltiples marcadores asociados con cáncer de próstata. Estos marcadores pueden incluir AMACR P504S, citoqueratina de alto peso molecular (HMW-CK) y p63. El

examen de esta combinación de marcadores proporciona un método para distinguir tumores de próstata benignos de los malignos.

Es deseable minimizar la reactividad cruzada entre agentes de unión, por ejemplo cuando se detectan múltiples marcadores. Esto puede lograrse usando diferentes sondas y diferentes moléculas de indicador en los procedimientos de detección. Un ejemplo de un sistema de este tipo se representa en la figura 3 en donde se detectan dos marcadores biológicos diferentes, por ejemplo dos receptores celulares diferentes, usando las siguientes etapas:

- (1). incubar la muestra con la primera sonda 1 (1 P1) (por ejemplo un anticuerpo conjugado con HRP AB1)
- (2). incubar la muestra (1) con el indicador 1 (R1) (por ejemplo conjugado de ácido ferúlico-PNA1) en presencia de un agente de reticulación (por ejemplo DAB)
- (3). incubar la muestra (2) con peróxido de hidrógeno (> 3% v/v)
- (4). incubar la muestra (3) con la primera sonda 2 (1P2) (por ejemplo anticuerpo conjugado con HRP AB2)
- (5). incubar la muestra (4) con el indicador 2 (R2) (por ejemplo conjugado de ácido ferúlico-PNA2)
- (6) incubar la muestra (5) con la segunda sonda 1 (2P1) (por ejemplo PNA1'-FITC) y con la segunda sonda 2 (2P2) (por ejemplo PNA2'-rojo Texas)

Como resultado, la señal fluorescente verde (que emana de PNA1'-FITC) se detecta a partir del sitio diana en donde se deposita R1, la señal fluorescente roja (que emana de PNA2'-rojo Texas) se detecta a partir del sitio diana de deposición de R2, y la señal amarilla en donde se depositan tanto R1 como R2, es decir a partir del sitio en donde ambas dianas A1 y A2 están presentes. Todas las etapas del método (desde (a) hasta (c)) pueden completarse en el plazo de 2-20 min. Tal detección rápida puede usarse ventajosamente para la detección automatizada o semiautomatizada de marcadores biológicos diana. Se conocen dispositivos de tinción automatizada en el campo y el método puede adaptarse para estos dispositivos.

Pueden usarse dispositivos de tinción automatizados en diversas realizaciones de la invención, por ejemplo para la detección de múltiples marcadores biológicos. La detección de múltiples marcadores requiere frecuentemente equilibrar las señales que emanan de las diferentes sustancias detectables. El procedimiento automatizado puede incluir múltiples etapas de amplificación de las señales que emanan de marcadores biológicos diana. Es especialmente ventajoso cuando van a detectarse múltiples marcadores.

#### Sondas de anticuerpo

El término "sonda" designa una sustancia que puede unirse específicamente a una diana, en el que la diana puede ser un marcador biológico, otra sonda, un indicador, o cualquier molécula asociada con dicho marcador biológico, otra sonda o indicador.

En una realización la sonda es una sonda de anticuerpo.

Anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, significa una inmunoglobulina o una parte de la misma, y abarca 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 e injertados con CDR. Una parte de un anticuerpo puede incluir cualquier fragmento que todavía pueda unirse a un antígeno, por ejemplo, un Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv. El origen del anticuerpo está definido por la secuencia genómica independientemente del método de producción.

Anticuerpo primario, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un marcador biológico de interés presente dentro de la muestra biológica. En determinadas realizaciones el anticuerpo primario puede polimerizarse. Los anticuerpo primarios pueden derivarse de cualquier especie de sangre caliente, por ejemplo mamíferos, aves. Anticuerpo secundario, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a una primera sonda, por ejemplo, un anticuerpo primario, o un hapteno depositado en el sitio diana, o hapteno unido directa o indirectamente a una primera sonda.

Anticuerpo terciario, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a una segunda sonda (por ejemplo, un anticuerpo secundario) o un hapteno unido a una segunda sonda o un hapteno unido a polímero conjugado con una segunda sonda, o hapteno depositado en el sitio diana.

Algunas veces un anticuerpo puede funcionar como anticuerpo tanto secundario como terciario.

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, un caballo, una llama, un camello, o cualquier especie aviar por ejemplo, pollo, pato. Derivado de cualquier especie de mamífero o aviar, 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 se originaba 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, pollo, pato. 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 el anticuerpo primario contiene una región de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un marcador biológico expresado por células que comprenden una muestra biológica. El marcador puede expresarse sobre la superficie celular o dentro de la membrana celular, es decir, en el interior de la célula, por ejemplo, dentro del citoplasma, dentro del núcleo, dentro del retículo endoplasmático. En algunas realizaciones el marcador biológico se secreta de la célula y por tanto está presente en disolución, por ejemplo, en medios de cultivo celular, en sangre o plasma.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo secundario contiene una región de unión a antígeno que se une específicamente al anticuerpo primario, por ejemplo, la región constante del anticuerpo primario. En determinadas realizaciones, el anticuerpo secundario se conjuga con un polímero. En algunas realizaciones, el polímero se conjuga con 2-20 anticuerpos secundarios. En otras realizaciones, el polímero se conjuga con 2-10 anticuerpos secundarios.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo terciario contiene una región de unión a antígeno que se une específicamente al anticuerpo secundario, por ejemplo, una región constante del anticuerpo secundario, o un hapteno unido al anticuerpo secundario o un polímero conjugado al anticuerpo secundario. En determinadas realizaciones, el anticuerpo terciario está conjugado con un polímero. En algunas realizaciones, el polímero está conjugado con 1-20 anticuerpos terciarios. En otras realizaciones, el polímero está conjugado con 1-5 anticuerpos terciarios.

Los anticuerpos que pueden usarse en los métodos y las composiciones de la invención incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos modificados por ingeniería genética incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y seleccionados artificialmente producidos usando presentación en fago o técnicas alternativas.

Se han descrito diversas técnicas para producir anticuerpos, véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256:495; 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 las referencias anteriores y también en, por ejemplo, los documentos EP 0623679; EP 0368684; y EP 0436597.

Pueden producirse anticuerpos de manera recombinante o sintética. Pueden aislarse ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos a partir 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 y las composiciones de la invención incluyen inmunoglobulinas humanizadas (patente estadounidense n.º 5.585.089, Jones *et al.* 1986, *Nature* 332/323).

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos alterados que comprenden una proteína efectora tal como una toxina o un marcador, por ejemplo, una sustancia detectable.

Pueden obtenerse anticuerpos del suero de un animal, o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, producirse en cultivo celular. Puede usarse tecnología de ADN recombinante para producir los anticuerpos según un procedimiento establecido, en cultivo de células bacterianas, de levadura, de insecto o de mamífero. En determinadas realizaciones, el sistema de cultivo celular seleccionado secreta preferiblemente el producto de anticuerpo.

#### Sondas de ácido nucleico

En otra realización una primera sonda puede ser o comprender una molécula de ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula ADN, una molécula de ARN, una molécula de PNA, para su uso en hibridación *in situ*. Pueden sintetizarse sondas de ácido nucleico químicamente o producirse de manera recombinante en células (véase por ejemplo Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Press). En algunas realizaciones, la sonda está compuesta por 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, habitualmente presente en ADN y ARN se reemplaza por una estructura principal peptídica. Se conocen en la técnica métodos de preparación de PNA (véase por ejemplo Nielsen, 2001, *Current Opinion in Biotechnology* 12:16). En otras realizaciones, la sonda está compuesta por ácidos nucleicos bloqueados (LNA) (Sorenson *et al.* 2003, *Chem. Commun.* 7(17):2130). En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico se une específicamente al

marcador biológico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico contenida dentro de la muestra biológica.

La sonda de ácido nucleico, en realizaciones particulares, comprende al menos una secuencia que se hibrida específicamente con una secuencia diana en la muestra biológica, por ejemplo una secuencia de ácido nucleico tal como una secuencia de ADN genómico o una secuencia de ARNm, en condiciones específicas de rigurosidad. Tal como se usa en el presente documento, el término "hibridación en condiciones rigurosas" pretende describir condiciones para la hibridación y lavados en las que secuencias de nucleótidos que son significativamente complementarias entre sí permanecen unidas entre sí. Las condiciones son tales que secuencias al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85-90% complementarias permanecen unidas entre sí. El porcentaje de complementariedad se determina 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.. Adicionalmente, se describen condiciones rigurosas 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 condiciones de hibridación de alta rigurosidad es hibridación en 4X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 65-70°C o hibridación en 4X SSC más formamida al 50% a 42-50°C, seguido por uno o más lavados en 1X SSC, 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.

En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico se hibridan a una secuencia diana en una muestra en condiciones moderadamente rigurosas. La rigurosidad moderada, tal como se usa en el presente documento, incluye condiciones que pueden determinar fácilmente los expertos habituales en la técnica basándose en, por ejemplo, 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), e incluyen el uso de una disolución de prelavado de 5X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de formamida al 50%, 6X SSC 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, 0,5X SSC, SDS al 0,1%.

En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico se 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 en, por ejemplo, la longitud del ADN. Baja rigurosidad puede incluir, por ejemplo, tratar previamente el ADN durante 6 horas a 40°C en una disolución que contiene formamida al 35%, 5 x SSC, 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 hibridaciones en la 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/vol) y se usa sonda de 5-20x10<sup>6</sup> CPM. Se incuban las muestras en la mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40°C, y luego se lava durante 1,5 h a 55°C en una disolución que contiene 2 x SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. Se reemplaza la disolución de lavado por disolución nueva y se incuba 1,5 h adicionales a 60°C.

Otras realizaciones de las sondas incluyen secuencias peptídicas, por ejemplo secuencias peptídicas derivadas de dominios de unión a proteína o ácido nucleico de diferentes proteínas, ligandos de diferentes receptores celulares y nucleares y sus derivados, moléculas pequeñas que pueden unirse específicamente a determinadas unidades estructurales de moléculas biológicas grandes, sin embargo, esto es tan sólo una lista de ejemplos no limitativos de sustancias que pueden usarse como sondas para los fines de la presente invención.

### Ejemplos

1. Ejemplos de moléculas de indicador de la invención.

Abreviaturas

MBHA	4-Metilbenzidrilamina
NMP	N-metilpirrolidona
HATU	hexafluorofosfato de 2-(1h-7-azabenzotriazol-1-il)-1,3,3tetrametiluronio; metenaminio
DIPEA	Diisopropiletilamina
DCM	Diclorometano
TFA	Ácido trifluoroacético
TFMSA	Ácido trifluorometilsulfónico
Fer	Ácido ferúlico

FLU	Fluoresceína
Tyr	Tirosina
Lys	Lisina
Dex	Dextrano

5 HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución  
equi. equivalente

#### 1.1. Fer-L30-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (D17158)

Se descargó la resina MBHA con Fmoc-Lys(ivDDE) hasta una carga de 150 micromol/g. Se eliminó Fmoc de 200 mg de resina con piperidina al 20% en NMP, luego se sometió a un acoplamiento con Boc-L30-OH (1,5 ml 0,26 M en NMP, preactivado con 0,9 equi. de HATU, 2 equivalentes de DIPEA durante 2 min) durante 20 min. Se eliminó el grupo ivDDE con hidracina al 5% en NMP, y se marcó la cadena lateral de lisina con carboxifluoresceína (Flu) (1,5 ml 0,2 M en NMP, preactivado durante 2 min con 0,9 equi. de HATU, 2 equi. de DIPEA) durante 2x20 min. Se trató la resina con piperidina al 20% en NMP, NMP, DCM, luego DCM. Se escindió el producto intermedio H-L30-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> de la resina con TFA:TFMSA:mCresol (7:2:1, 1,5 ml durante 1 h), se precipitó con dietiléter, se resuspendió en TFA, se precipitó con dietiléter, se resuspendió en NMP y se precipitó de nuevo con dietiléter. Se basificó con 100 microlitros de DIPEA y se disolvió directamente en 0,5 ml de ácido ferúlico 0,3 M preactivado con 0,9 equi. de HATU y 2 equi. de DIPEA. Tras 25 min se precipitó el producto en bruto con dietiléter, se disolvió en 450 microlitros de NMP y 50 microlitros de etilendiamina. Tras 5 min se precipitó el producto con dietiléter, se disolvió en acetonitrilo al 15% en agua (8 ml) y se acidificó con 100 microlitros de TFA y se sometió a purificación mediante RP-HPLC.

#### 1.2. Fer-L150-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (D17157)

Se descargó la resina MBHA con Boc-Lys(Fmoc) hasta una carga de 100 micromol/g. Se sometieron 100 mg de resina a 5 ciclos de acoplamiento con Boc-L30-OH (a. Acoplar con Boc-L30-OH como en 1. b. Ocupar los extremos con anhídrido acético al 2% en NMP:piridina 1:1, 2 min. c. Eliminar Boc con mCresol al 5% en TFA 2x5 min.). Se eliminó Fmoc de la cadena lateral de lisina y se marcó con carboxifluoresceína, como en 1. Se escindió el producto intermedio H-L150-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> de la resina, y se marcó de manera N-terminal con ácido ferúlico y se purificó como en 1.1.

#### 1.3. betaala-L90-Lys(Flu)-L90Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (D16127)

Se preparó Boc-L90-Lys(Fmoc)-L90-Lys(Fmoc)-L90Lys(Fmoc) sobre 0,5 g de resina MBHA con química en fase sólida convencional (como en 1.1. y 1.2). Se eliminaron los grupos Fmoc de las cadenas laterales de lisina con piperidina al 20% en NMP y se sometió el compuesto a marcaje con carboxifluoresceína repetido (3x30 min). Tras la eliminación de los grupos Boc con TFA, se marcó el extremo N-terminal en fase sólida con éster terc-butílico del ácido betaalanina-N,N-diacético (betaala). Tras la escisión de la resina y la purificación mediante HPLC, se aisló betaala-L90-Lys(Flu)-L90Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub>.

#### 1.4. H-Cys-L90-Lys(Flu)-L90Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (D16126)

Se preparó la resina Boc-L90-Lys(Fmoc)-L90-Lys(Fmoc)-L90Lys(Fmoc) y se marcó con fluoresceína usando el procedimiento descrito en 1.3. Tras la eliminación de los grupos Boc se marcó el extremo N-terminal con N-Boc-S(4-metoxibencil)-Cys-OH. Se escindió el compuesto de la columna y se purificó mediante HPLC:

Las moléculas 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4 son realizaciones no limitadas de indicadores que comprenden residuos de fluoresceína.

#### 1.5. Fer-Lys(Fer)-L30-Lys(Fer)-L30-Lys(Fer)-L30-Lys(Fer)-L30-Lys(Fer)-L30Lys(NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (D17120)

A la resina MBHA se le acopló secuencialmente Boc-Lys(Fmoc) (2 ciclos), Boc-L30-OH (5 ciclos) y Boc-lys(2CIZ)-OH. Se escindió el producto intermedio de la resina en presencia de un eliminador de tianisol al 10% para eliminar los grupos 2CIZ. Se marcaron el extremo N-terminal y las 5 cadenas laterales de lisina desprotegidas con ácido ferúlico como en 1-1 (2x30 min.). Se eliminó luego el grupo Fmoc del N de los residuos de lisina C-terminales con etilendiamina al 10% en NMP antes de la purificación.

#### 1.6. Fer-(Lys(Fer)-L30)<sub>5</sub>-Lys(NH-betaala((L90-Lys(Flu)))<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (D17134)

Se disolvió betaala-L90-Lys(Flu)-L90Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (compuesto 1.4) 500 nmol en 88 microlitros de NMP y 2 microlitros de piridina, y se convirtió en un anhídrido cíclico por reacción con 10 microlitros de diisopropilcarbodiimida durante 10 min. Se precipitó el anhídrido con dietiléter, y se disolvió el sedimento en 100 microlitros de NMP que comprendía Fer-(Fer-L30)<sub>5</sub>-Lys(NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> 250 nmol. Tras 20 min se añadieron

5 microlitros de etilendiamina, y tras 5 min se precipitó el producto con dietiléter, se acidificó y se purificó mediante HPLC.

1.7. Ac-(Tyr(OH)-L30)<sub>6</sub>-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (D18044)

5 Se preparó Ac-(Tyr(2BrZ)-L30)<sub>6</sub>-L90-Lys(Fmoc)-L90-Lys(Fmoc)-Lys(Fmoc) sobre resina MBHA. Se eliminaron en fase sólida los grupos Fmoc, y se marcaron las cadenas laterales de lisina con carboxifluoresceína. Tras la escisión de la resina, se purificó el producto mediante HPLC.

1.8. Fer-Lys(Fer)-L60-Lys(Fer)-Lys(Fer)-L60-Lys(Fer)-Lys(Fer)-L30Lys(NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (D17140)

10 Se preparó Boc-Lys(2ClZ)-L60-Lys(2ClZ)-Lys(2ClZ)-L60-Lys(2ClZ)-Lys(2ClZ)-L30-Lys(Fmoc) sobre resina MBHA. Tras la escisión de la resina, se aisló el producto intermedio H-Lys(NH<sub>2</sub>)-L60-Lys(NH<sub>2</sub>)-Lys(NH<sub>2</sub>)-L60-Lys(NH<sub>2</sub>)-Lys(NH<sub>2</sub>)-L30-Lys(Fmoc) mediante precipitación, y se marcó con ácido ferúlico como en 1.1. Se aisló el producto final mediante HPLC.

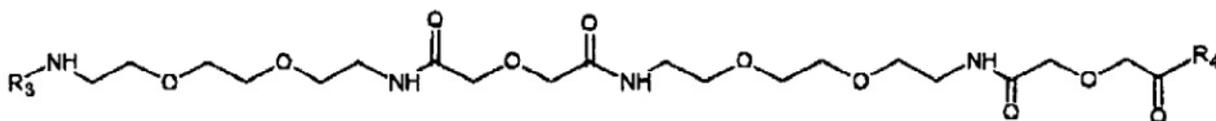
Los ejemplos 1.5.-1.8. Son los ejemplos de moléculas de agente de reticulación de fórmula

(R1)<sub>n</sub>-(X)<sub>q</sub>-R2(m),

en la que

15 R1 y R2 son dos restos diferentes de sustrato(s) de HRP (por ejemplo Fer o Tyr)

X es una molécula de ligado de la siguiente fórmula



en la que R3 y R4 son residuos de Lys, y

m, n y q son de desde 1 hasta 6.

20 Agentes de reticulación de polímeros lineales (por ejemplo moléculas 1.6 y 1.7 descritas anteriormente) que llevan varios residuos de fluoresceína, ácido ferúlico (1.6) y/o tirosina (1.7) también son realizaciones de indicadores que pueden depositarse por HRP en presencia de otro agente de reticulación, por ejemplo, DAB. Tales indicadores/agentes de reticulación lineales de peso molecular relativamente bajo (PM<15 kDa) pueden ser particularmente útiles cuando los restos de enzima HRP se unen a sitios diana que no son fácilmente accesibles o  
25 no están expuestos, por ejemplo en núcleos celulares tal como ADN. Moléculas indicadoras más grandes, por ejemplo indicadores que comprenden moléculas de dextrano conjugadas con decenas y cientos de marcadores (por ejemplo Flu y/o Fer y/o Tyr), tal como por ejemplo la molécula 1.9 (descrita anteriormente), pueden usarse cuando los restos de enzima peroxidasa están ubicados en sitios diana más fácilmente accesibles.

1.9. Dex70 conjugado con agente de reticulación 1.5 y agente de reticulación 1.4 (D17128)

30 Se hizo reaccionar dextrano de PM de 70 kDa, activado con divinilsulfona, 10 nmol, con Fer-(Fer-L30)<sub>5</sub>-Lys(NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (compuesto 1.5) 500 nmol, en un volumen total de 300 microlitros de NaHCO<sub>3</sub> 0,16 M pH 9,5 durante 30 min a 40°C. Tras observarse una ligera precipitación, se añadieron adicionalmente 100 microlitros de agua y se permitió que la reacción avanzara durante otros 30 min. Se añadieron adicionalmente 200 microlitros de NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M junto con H-Cys-L90-Lys(Flu)-L90Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub> (compuesto 1.4) 500 nmol. Tras 1 h a 40°C, se  
35 extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 50 microlitros de cisteína 0,165 M durante 30 min, se filtró la disolución, y se purificó el producto mediante FPLC en superdex 200 con EtOH al 20% en disolución acuosa que contiene CHES 10 mM, pH 9,0 y NaCl 0,1 M. El producto eluido era un conjugado de dextrano que comprendía alrededor de 56 residuos de fluoresceína y 113 de ácido ferúlico.

1.5. Anticuerpo de cabra-anti-ratón-Dex70-HRP (D18033)

40 Se hicieron reaccionar dextrano de PM de 70 kDa y HRP 602 nmol activados con divinilsulfona 13,7 nmol en 600 microlitros de tampón (NaCl 100 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 9,5) durante 3 h a 30°C. Luego se añadió anticuerpo de cabra anti-F(ab)<sub>2</sub> de ratón en 105 microlitros de agua, y se continuó la reacción durante 16 h adicionales. Se inactivó la mezcla de reacción mediante la adición de 70 microlitros 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  
45 dextrano que comprendía anticuerpo de cabra-anti-ratón (GaM) y HRP (razón dex:GaM:HRP=1:1:1).

1.6. Anticuerpo anti-FITC-Dex70-HRP (D18058)

Se hicieron reaccionar dextrano de PM de 70 kDa y HRP 440 nmol activados con divinilsulfona 10 nmol en 400

microlitros de tampón (NaCl 100 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 9,5) durante 3 h a 30°C. Luego, se añadió anticuerpo anti-F(ab)<sub>2</sub> de ratón 30 nmol en 80 microlitros de agua, y se continuó la reacción durante 90 min adicionales a 40°C. Se extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 50 microlitros de cisteína 0,165 M durante 30 min y se purificó el producto en superdex 200 en NaCl 100 nM, HEPES 10 mM pH 7,2. El producto eluido era un conjugado de dextrano con anticuerpo anti-FITC y HRP (razón de Dex/anti-FITC/HRP = 1/2/9).

1.7. Anticuerpo anti-FITC-Dex70-HRP (D17030)

Se hicieron reaccionar dextrano de PM de 70 kDA; HRP 440 nmol y F(ab)<sub>2</sub> anti-FITC 25 nmol activados con divinilsulfona 10 nmol en 374 microlitros de tampón (NaCl 100 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 9,5) durante 16 a 30°C. Se extinguió la mezcla de reacción mediante la adición de 50 microlitros de cisteína 0,165 M durante 30 min y se purificó el producto en superdex 200 en NaCl 100 nM, HEPES 10 mM pH 7,2. El producto eluido era un conjugado de dextrano que comprendía anti-FITC y HRP (razón 1:1:1).

Las moléculas 1.10, 1.11 y 1.12 representan realizaciones de conjugados de anticuerpo-dextrano-HRP que pueden ser útiles como sondas para la detección de moléculas de indicador depositadas. El conjugado 1.10. también puede ser útil como sonda adicional para la detección de las sondas unidas al indicador depositado (por ejemplo en la etapa (b) del método para detectar un marcador en el sitio diana descrito anteriormente).

3. Ejemplo de tinciones de IHC usando el método de la invención.

Se llevó a cabo la IHC en amígdalas incrustadas en parafina fijadas con formalina. Se cortaron secciones de 3-5 micrómetros, se hornearon y se almacenaron a 4°C, hasta su uso. Se eliminó luego la parafina con xileno (2x5 min); etanol al 99% (2x2 min); etanol al 70% (2x2 min) y finalmente agua. Se pusieron los portaobjetos en la disolución de recuperación de dianas, pH 9, (DAKO S2367) y luego se calentaron en un horno microondas (se sometieron a ebullición durante 10 min). Después de eso, se permitió que los portaobjetos se enfriaran y luego se transfirieron al tampón de lavado (DAKO S3006). Al procedimiento le siguió una etapa de bloqueo de actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min, luego se transfirieron de nuevo los portaobjetos al tampón de lavado y luego se tiñeron. Para minimizar la variación de portaobjeto a portaobjeto, cada experimento comparativo se llevó a cabo con secciones cortadas consecutivamente durante el mismo día. Se puntuaron las señales específicas, así como las de fondo usando una escala de puntuación de desde 0 hasta 4 en el que 0 representa ausencia de tinción en absoluto, 1 - tinción débil, 2 - tinción moderada, 3 - tinción fuerte, 4 - sobretinción.

Experimento de IHC 1.

Se diluyeron citoqueratina, anticuerpo de cabra-anti-ratón-HRP y anticuerpo anti-FITC-HRP en 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 BCPT). Se diluyeron indicador D17128 y DAB (DAKO K5007 C) en tampón de sustrato de DAB (DAKO K5007 B). Todas las incubaciones duraron 5 min, seguido por 2 min de lavado en tampón de lavado de DAKO S3006, excepto tras la incubación con D17128, en donde los lavados se realizaron en CHES 10 mM a pH 9 + Tween20 al 0,1%.

La tabla y el texto siguientes resumen las realizaciones del experimento:

	Sonda de anticuerpo primario	Sonda de anticuerpo secundario	Agente de reticulación e indicador	Sonda de detección de indicador	Agente de reticulación e indicador	Sonda de detección de indicador	Disolución de revelado
Portaobjetos 1	Citoqueratina (DAKO M5315) 15 nM	GaM-HRP, D18033, 125 nM,	DAB (DAKO K5007 C) sin indicador				
Portaobjetos 4	Como portaobjetos 1	GaM-HRP, D18033 5 nM	D17128 100 nM + DAB 1:150	D17030 50 nM	DAB		
Portaobjetos 7	Como portaobjetos 1	GaM-HRP, D18033 0,5 nM	Como porta-objetos 4	Como porta-objetos 4	D17128 100 nM + DAB 1:150	D17030 50 nM	DAB
Portaobjetos 9	Como portaobjetos 1	GaM-HRP, D18033 0,5 nM	D17128 20 nM+ DAB 1:150	Como porta-objetos 4	Como porta-objetos 7	Como porta-objetos 7	DAB

Portaobjetos 1 - tinción de DAB-HRP convencional (sin amplificación). El reactivo DAB DAKO convencional (K7005 C) contiene DAB 3 mM.

## ES 2 624 450 T3

Portaobjetos 4 - deposición de indicador D17128 en presencia de conjugado de DAB-GaM-HRP 1 mM D18033 diluido 25 veces en comparación con el portaobjetos 1 - amplificación de una etapa.

Portaobjetos 7 y portaobjetos 9 - dilución adicional del conjugado de GaM-HRP D18033 en comparación con el portaobjetos 1 y etapa adicional de deposición de indicador.

- 5 Los portaobjetos 1, 4 y 7 se tiñeron todos específicamente con puntuaciones de desde 2,5 hasta 3. Se logró una amplificación de 250 veces de la señal (portaobjetos 9 en comparación con portaobjetos 1) debido a la deposición del indicador D17128 en presencia de DAB seguido por el reconocimiento del indicador por la sonda de anticuerpo anti-FITC-HRP D17030. Notablemente, las tinciones de ambos portaobjetos 7 y 9 seguían siendo claras (es decir, no difusas), con bordes nítidos entre zonas teñidas y no teñidas indicando que tiene lugar muy poca difusión en los sitios de deposición.

10 Experimento de IHC 2.

- 15 Se diluyeron citoqueratina, GaM-HRP y anticuerpo anti-FITC-HRP en 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 BCPT). Se diluyeron D17128 y DAB (DAKO K5007 C) en tampón de sustrato de DAB (DAKO K5007 B). Todas las incubaciones fueron de 5 min, seguido por 2 min de lavado en DAKO S3006, excepto tras la incubación con indicador D17128, en el que los lavados se realizaron en CHES 10 mM pH 9 + Tween20 al 0,1%.

La tabla y el texto siguientes resumen las realizaciones del experimento:

	Sonda de anticuerpos primario y secundario	Agente de reticulación e indicador	Sonda de indicador	Disolución de revelado
Portaobjetos 9	Citoqueratina DAKO M5315 15 nM + GaM-HRP, D18033, 10 nM	D17128 25 nM sin agente de reticulación	D18058 anti-FITC-HRP 25 nM	DAB (DAKO K5007 C)
Portaobjetos 12	Como portaobjetos 9	D17128 25 nM + D17140 100 microM	Como portaobjetos 9	DAB (DAKO K5007 C)
Portaobjetos 14	Como portaobjetos 9	D17128 25 nM+ DAB 1:150	Como portaobjetos 9	DAB (DAKO K5007 C)

- 20 Los portaobjetos 12 y 14 se tiñeron fuerte y específicamente (ambos con puntuación de 2), mientras que el portaobjetos 9 no se tiñó (puntuación de 0). Los resultados muestran que el indicador no se precipitó mediante HRP en el medio sin un agente de reticulación (por ejemplo DAB (portaobjetos 14) o D17140 (portaobjetos 12)).

El experimento ilustra adicionalmente la posibilidad de reducir el número de etapas mediante la preincubación (durante 10 min) del anticuerpo primario con el conjugado de anticuerpo secundario-HRP.

Experimento de IHC 3.

- 25 Se diluyeron citoqueratina, GaM-HRP y anticuerpo anti-FITC-HRP en 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 BCPT). Se diluyeron D17128 y DAB (DAKO K5007 C) en tampón de sustrato de DAB (DAKO K5007 B). Todas las incubaciones fueron de 5 min, seguido por 2 min de lavado en DAKO S3006, excepto tras las incubación con D17128 y D18044, en el que los lavados se realizaron en CHES 10 mM pH 9 + Tween20 al 0,1%. Cuando se aplicó la tercera etapa de incubación de los portaobjetos con DAB en tampón sustrato (portaobjetos 3 y 5), el tiempo de incubación fue de 1 min.

- 30 La tabla y el texto siguientes resumen las realizaciones del experimento:

	Sonda de anticuerpo primarios	Sondas de anticuerpo secundario	Agente de reticulación e indicador	Agente de reticulación e indicador	Sonda de indicador	Disolución de revelado

ES 2 624 450 T3

Portaobjetos 2	Citoqueratina DAKO M5315 15 nM	GaM-HRP, D18033, 3 nM,	D17128 50 nM + DAB 1:150	D18058 anti-FICT-HRP 50 nM		DAB
Portaobjetos 3	Como portaobjetos 2	Como portaobjetos 2	DAB sin indicador	D17128 50 nM + DAB 1:150	D18058 anti-FICT-HRP 50 nM	DAB
Portaobjetos 4	Como portaobjetos 2	Como portaobjetos 2	D17128 50 nM sin agente de reticulación	D18058 anti-FICT-HRP 50 nM		DAB
Portaobjetos 5	Como portaobjetos 2	Como portaobjetos 2	DAB sin indicador	D17128 50 nM sin agente de reticulación	D18058 anti-FICT-HRP 50 nM	DAB

El portaobjetos 2 fue el portaobjetos más intensamente teñido (puntuación de 3), mostrando que el minuto de aplicación extra de DAB de la tercera etapa en el portaobjetos 3 (puntuación de 2,5) no mejoró mucho, sino que redujo ligeramente la intensidad de la tinción. La falta de tinción en ausencia de agente de reticulación en el portaobjetos 4 (puntuación de 0) es acorde a los resultados obtenidos en el experimento de IHC 2 (descrito anteriormente). En el portaobjetos 5, cuando se aplicó DAB antes de la aplicación del conjugado de indicador D17128, se observó una tinción (puntuación de 2), aunque no tan intensa como en el portaobjetos 3.

Estos resultados muestran que puede aplicarse un agente de reticulación en primer lugar en una etapa separada antes de la incubación del portaobjetos con tanto indicador como agente de reticulación (es decir, en una etapa de preincubación). Otro efecto positivo de aplicar DAB antes de la deposición del indicador marcado fue una notable reducción de la tinción de fondo (puntuación de 0,5-1 en el portaobjetos 2, y puntuación de 0 en el portaobjetos 3), mientras que la intensidad de señales específicas no disminuyó mucho. La tinción de fondo difusa particularmente débil asociada con unión no específica de conjugados de cabra-anti-ratón-HRP, en muchos casos se eliminó prácticamente mediante la etapa de 1 min extra de DAB antes de la deposición.

Experimento de IHC 4.

Se diluyeron citoqueratina, GaM-HRP y anticuerpo anti-FITC-HRP en 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 BCPT). Se diluyeron D17128, D 18044 y DAB (DAKO K5007 C) en tampón de sustrato de DAB (DAKO K5007 B). Todas las incubaciones fueron de 5 min, seguido por 2 min de lavado en DAKO S3006, excepto tras las incubaciones con D17128 y D18044, en el que los lavados se realizaron en CHES 10 mM pH 9 + Tween20 al 0,1%.

La tabla y el texto siguientes resumen las realizaciones del experimento:

	Sondas de anticuerpos primario y secundario	Preincubación con agente de reticulación (DAB)	Agente de reticulación (DAB) e indicador		
Portaobjetos 8	Citoqueratina DAKO M5315 15 nM + GaM-HRP, D18033, 10 nM	DAB 1:150 en tampón de sustrato (DAKO K5007 C) 1 min	D17128 50 nM+ DAB 1:150 (DAKO K5007 C)	D18058 50 nM	DAB
Portaobjetos 9	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8	D17128 50 nM+ DAB 1:150	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8
Portaobjetos 10	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8	D17128 50 nM+ DAB 1:500	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8
Portaobjetos 11	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8	D18044 5 microM + DAB 1:150	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8

## ES 2 624 450 T3

Portaobjetos 12	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8	D18044 5 microM + DAB 1:150	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8
Portaobjetos 13	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8	D18044 5 microM + DAB 1:500	Como portaobjetos 8	Como portaobjetos 8

5 Este experimento ilustra el efecto de la concentración de agente de reticulación sobre la deposición de dos tipos diferentes de indicadores. El portaobjetos 9 fue el portaobjetos más intensamente teñido (puntuación de 4). Se aplicó DAB como agente de reticulación en el portaobjetos 9 a una dilución 1:150 (1 mM). Concentraciones más altas (1:50 (3 mM), portaobjetos 8) o más bajas (1:500 (30 mM), portaobjetos 10) de DAB dieron una tinción ligeramente menos intensa (puntuación de 3,5). También se observó el efecto de reducción del fondo de la preincubación con DAB; ninguno de los seis portaobjetos (de la tabla anterior) tenía una tinción de fondo significativa.

Se depositaron mejor los indicadores de bajo peso molecular (por ejemplo indicador 18044 descrito anteriormente) a concentraciones más bajas de DAB (portaobjetos 13; puntuación de 3); la intensidad de tinción disminuyó con el aumento de las concentraciones de DAB (portaobjetos 12, puntuación de 2,5; portaobjetos 11, puntuación de 2).

10 Este experimento también ilustra que pueden usarse moléculas de indicador más grandes que comprenden muchos restos de sustrato de peroxidasa en cantidades más bajas (por ejemplo conjugado de fluoresceína-ácido ferúlico dextrano D17128, 50 nM) en comparación con moléculas de indicador más pequeñas que comprenden lo mismo pero menos restos de sustrato de peroxidasa (por ejemplo D 18044, 5 microM) para obtener los mismos o incluso mejores resultados de tinción.

15 4. Ejemplo de amplificación de una señal de sonda de ácido nucleico usando el método de la invención.

Procesando muestras con y sin el uso de DAB en la disolución de cromógeno y la disolución potenciadora de señal, puede ilustrarse el efecto precipitante de DAB. Puede obtenerse una ilustración adicional de la amplificación de señal de la invención por la dilución adicional de o bien la sonda, el anticuerpo o bien omitiendo la segunda etapa de bloqueo de peroxidasa.

20 Tejido: Amígdala incrustada en parafina fijada con formalina.

Sonda marcada con fluoresceína dirigida contra el centrómero del cromosoma 11.

Se usan las siguientes disoluciones en el ejemplo:

	Recuperación antígenos/pretratamiento	(Dako K 5599)
	Tampón de lavado 1	(Dako K5331)
25	Tampón de lavado 2	(Dako S 3006)
	Pepsina RTU	(Dako K 5331)
	Tampón de lavado riguroso	(Dako K 5331 )
	R-a-Fitc/HRP, F(ab)	(Dako P 5100)
	Diluyente de anticuerpo	(Dako S 2022)
30	Sonda	(Dako Y 5505)
	Disolución de bloqueo de peroxidasa	(Dako S 2023)
	Rojo nuclear rápido	(Dako S1968)
	Tampón de cromógeno	(Dako K5007)

Se usó un agente de hibridación (Dako S2451) para hibridar las sondas

35 Preparación de la disolución de cromógeno y la disolución potenciadora de señal:

Disolución A:

Se disuelven 102,5 mg de 5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-(4sulfobutil)-2Hindol-2-iliden]-1-propenil]-3,3dimetil-1-(4sulfobutil)-3H-indolio, ter-trifluoroacetato en 4,525 ml de propanodiol/agua 8:2

Disolución B:

## ES 2 624 450 T3

Se disuelven 59,6 mg de diclorhidrato de 3,3'-Di-aminobencidina en 5,96 ml de propanodiol/agua 8:2. Se añaden 13,7 µl de ácido clorhídrico 12 M.

Disolución C:

Se mezclan la disolución A y la disolución B a una razón de 1 ml de A: 9 ml de B.

### 5 Disolución de cromógeno:

Para la tinción, se diluyeron estas disoluciones madre en el tampón de cromógeno de los kits obtenidos de Dakocytomation n.º de código K5007.

Se mezcla 1 ml de disolución C con 19 ml de tampón de cromógeno

Disolución D:

### 10 Se diluye 1 ml de disolución B con 499 ml de tampón de cromógeno.

Disolución potenciadora de señal:

Esta es una disolución de D1734 en etanol al 20%, NaCl 0,1 M, CHES 10 mM pH 9,0 diluido con disolución D hasta una concentración de 250 nM o 50 nM de Fer-L30-FITC. En el caso de ausencia de DAB en la disolución, se realizó la dilución directamente en el tampón de cromógeno

### 15 Procedimiento para tinción de tejido:

Se desparafinizaron portaobjetos de tejido de amígdalas humanas, se lavaron y se realizó la recuperación de antígenos en 10 min en un horno microondas. Tras otro lavado, tratamiento con pepsina a 37°C y lavado, se deshidrataron los portaobjetos y se incubaron con la sonda de PNA. Tras 5 min de desnaturalización de la muestra a 85°C, se hibridaron las sondas durante 1 hora a 45°C. Se lavaron rigurosamente los portaobjetos a 65°C durante 10 min. Se bloqueó la peroxidasa durante 3 min, se lavaron los portaobjetos y se incubaron con un anticuerpo de conejo-anti-FITC/HRP diluido 1:20. Tras 30 min se lavaron los portaobjetos y se incubaron con la disolución potenciadora de señal. Tras 30 min se lavaron los portaobjetos, se bloqueó la peroxidasa durante 3 min, se lavaron de nuevo y se incubaron los portaobjetos con un anticuerpo de conejo-anti-FITC/HRP diluido 1/20. Tras 30 min se lavaron los portaobjetos y se incubaron con una disolución de cromógeno. Tras el lavado con agua se contratiñeron los portaobjetos con rojo nuclear rápido, se lavaron y se montaron.

Se ilustran la configuración experimental y los resultados de la tinción en la siguiente tabla:

Portaobjetos n.º	Sonda 1, veces	Anticuerpo anti-FITC/HRP 30 min	Disolución potenciadora de señal 30 min	Anticuerpo Anti-FITC/HRP 30 min	Resultado	
					Intensidad de señal	Comentarios
1	Tampón	Anti-FITC/HRP 1:50	Fer <sub>6</sub> -Flu <sub>3</sub> 50 nM con DAB	1:20	0	
2	Y5505 diluido 10x	1:100	Fer <sub>6</sub> -Flu <sub>3</sub> 50 nM	1:20	0	
3	Y5505 Fortyndet 50x	1:100	Fer <sub>6</sub> -Flu <sub>3</sub> 50 nM con DAB	1:20	1½	Sin DAB en la disolución de cromógeno
4	Y5505 diluido 10x	1:100	Fer <sub>6</sub> -Flu <sub>3</sub> 50 nM con DAB	1:20	2½	
5	Y5505 diluido 10x	1:100	Fer <sub>6</sub> -Flu <sub>3</sub> 250 nM con DAB	1:20	4	Sobretinción/demasiada señal
6	Y5505 diluido 10x	1:100	Fer <sub>6</sub> -Flu <sub>3</sub> 250 nM	1:20	0-½	
7	Y5505 Fortyndet 50x	1:100	Sin amplificación teñida directamente tras la primera incubación con anticuerpo anti-FITC/HRP		0	

El portaobjetos 1 es un control que muestra que se necesita la sonda para obtener una señal

El portaobjetos 2 muestra que sin un agente de reticulación en la disolución potenciadora de señal no se obtiene ninguna señal específica.

## ES 2 624 450 T3

El portaobjetos 3 muestra que la adición de un agente de reticulación (DAB) a la disolución potenciadora de señal da como resultado una alta amplificación de la señal. Este es el único portaobjetos que no tenía DAB en la disolución de cromógeno.

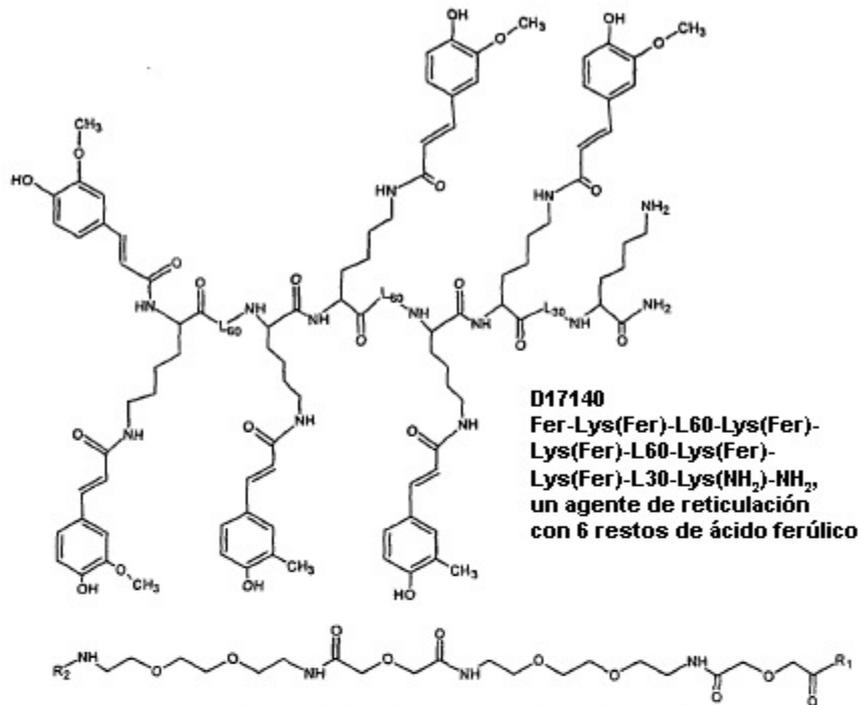
5 El portaobjetos 4 muestra que la adición de un agente de reticulación a la disolución de cromógeno potencia adicionalmente la señal (en comparación con el portaobjetos 3)

El portaobjetos 6 muestra que al aumentar la concentración del potenciador de señal (D17134) puede obtenerse una señal débil sin un agente de reticulación. Sin embargo, la adición de un agente de reticulación da una fuerte amplificación de esta señal (tal como se ilustra mediante el portaobjetos 5)

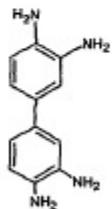
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de deposición de un indicador en un sitio diana, en el que el sitio diana comprende actividad enzimática peroxidasa, y el método comprende una etapa de incubar dicho sitio diana en un medio acuoso que comprende el indicador, un compuesto de peroxidasa y un agente de reticulación, que es 3,3'-diaminobencidina (DAB),  
 en el que dicho método se caracteriza porque el indicador es una molécula de conjugado que comprende al menos un polímero de estructura principal y al menos un marcador detectable, en el que dicho al menos un marcador detectable está unido al al menos un polímero de estructura principal por medio de un enlace químico o por medio de una molécula de ligado, en el que el al menos un marcador detectable no es DAB.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un marcador detectable se selecciona de una sustancia fluorescente o cromogénica, sustrato enzimático o miembro de un par de unión específica.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el al menos un marcador detectable es una sustancia fluorescente.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el al menos un marcador detectable es un hapteno.
- 15 5. Método según la reivindicación 2, en el que el al menos un marcador detectable es un sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el indicador comprende una combinación de dos o más marcadores detectables diferentes.
- 20 7. Método según la reivindicación 1 ó 6, en el que el al menos un polímero de estructura principal del indicador comprende dextrano.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la actividad peroxidasa está asociada con al menos un resto de una enzima peroxidasa presente en el sitio diana.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la enzima peroxidasa se selecciona de peroxidasa de rábano picante (HRP) o peroxidasa de soja (SP).
- 25 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sitio diana comprende un marcador biológico.
11. Método de detección de un marcador biológico en un sitio diana de una muestra biológica *in vitro*, en el que el sitio diana comprende el marcador biológico y actividad enzimática peroxidasa; en el que el método se caracteriza porque comprende la etapa de deposición de un indicador en el sitio diana según el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 30 12. Método según la reivindicación 11, que comprende etapas de
  - a) incubar la muestra biológica que presumiblemente comprende el marcador biológico con una o más sondas, en el que (i) al menos una de la una o más sondas comprende al menos un resto de peroxidasa de rábano picante (HRP), y (ii) al menos una de la una o más sondas reconoce y se une específicamente al marcador biológico, formando de ese modo un complejo del marcador biológico con la una o más sondas, en el que al menos una sonda comprende al menos un resto de HRP, formando de ese modo un sitio diana;
  - b) incubar la muestra que comprende el sitio diana de (a) en un medio acuoso que comprende DAB, un indicador y un compuesto de peróxido, depositando de ese modo el indicador en el sitio diana;
  - c) detectar el indicador depositado de (b) y de ese modo detectar el marcador biológico.
- 40 13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que el marcador biológico es una molécula biológica, estructura, tal como una membrana o estructura cromosómica, complejo molecular o partícula, tal como una partícula de virus.
14. Método según la reivindicación 12 ó 13, en el que la una o más sondas son miembros de un(os) par(es) de unión específica.
- 45 15. Método según la reivindicación 14, en el que los miembros de pares de unión específica se seleccionan de de pares de unión específica de receptor-ligando, anticuerpo-anticuerpo, dos ácidos nucleicos o dos análogos de ácido nucleico.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que el método se usa para la detección por inmunocitoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH) de un marcador biológico en una molécula diana comprendida por una célula.
- 50

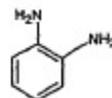
17. Método según la reivindicación 16, en el que el método está automatizado o semiautomatizado.



Los residuos L30 y L60 son dos residuos consecutivos tales

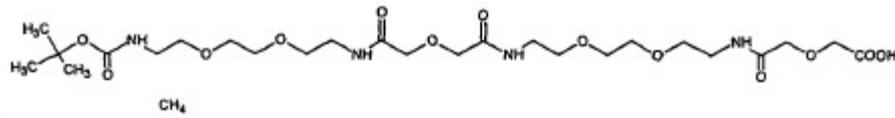


**Diaminobencidina, un agente**  
**de reticulación que comprende**  
**dos restos de fenilendiamina**

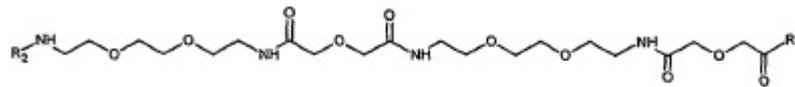


**ortofenilendiamina**

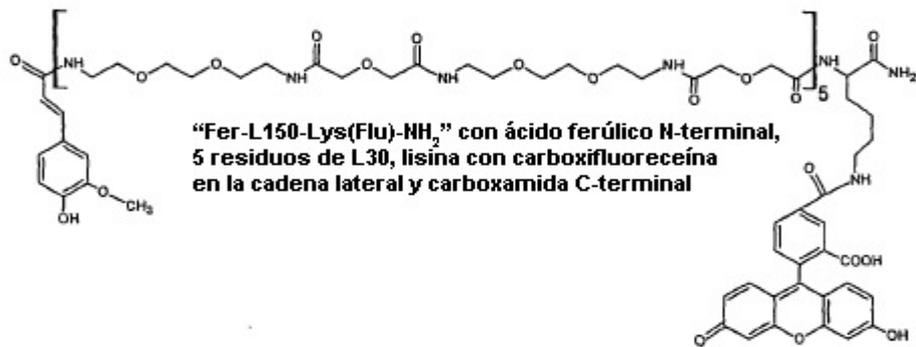
**Figura 1**



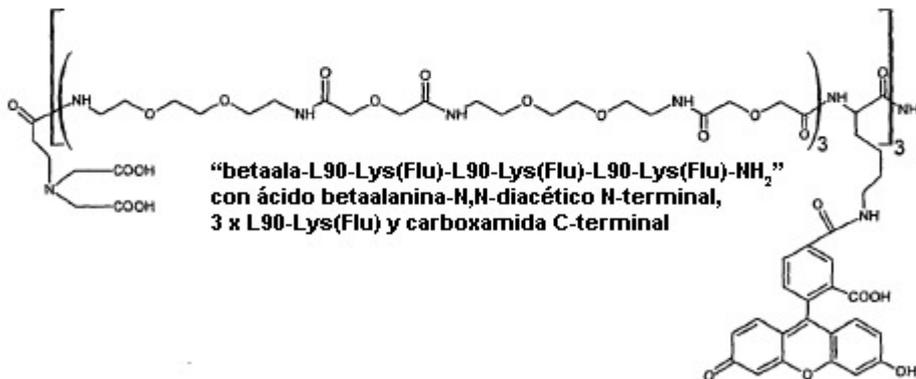
**Ácido 29-Boc-amino-(3,9,12,18,24,27-hexaoxa)-(6,15,21-triaza)-(5,16,20-trioxo)nonacosanoico "Boc-L30-OH", el monómero usado para sintetizar los ligadores y los conjugados.**



**"R<sub>2</sub>-L30-R<sub>1</sub>" un residuo de L30**



**"Fer-L150-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub>" con ácido ferúlico N-terminal, 5 residuos de L30, lisina con carboxifluoreceína en la cadena lateral y carboxamida C-terminal**



**"betaala-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH<sub>2</sub>" con ácido betaalanina-N,N-diacético N-terminal, 3 x L90-Lys(Flu) y carboxamida C-terminal**

**Figura 2**

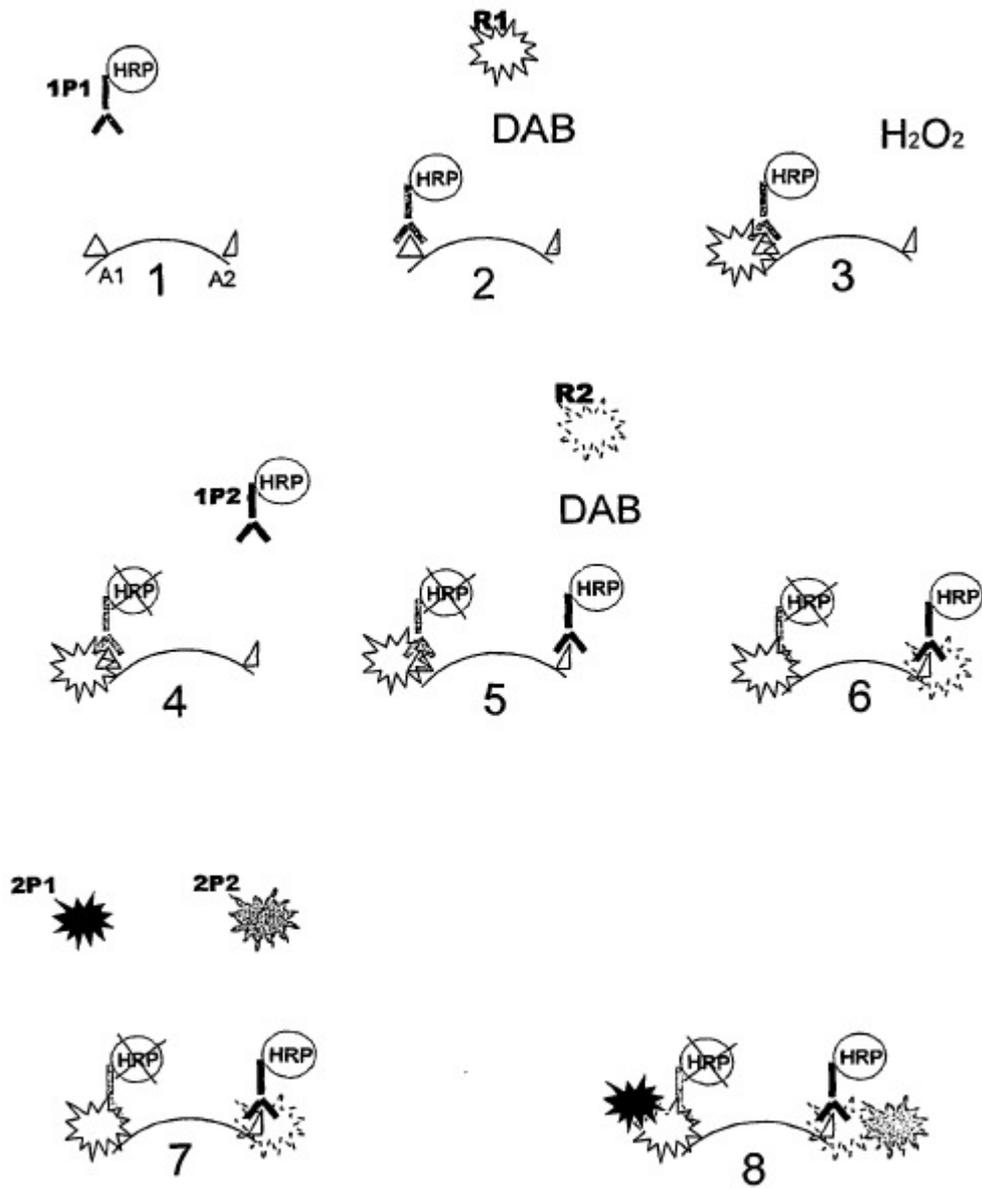


Figura 3