

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 908**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68	(2006.01)
G01N 33/58	(2006.01)
C07F 9/50	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
C07F 1/00	(2006.01)
C07F 9/12	(2006.01)
C07F 9/572	(2006.01)
C07F 9/655	(2006.01)
G01N 33/531	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2011 PCT/US2011/034190**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11139792**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2011 E 11721853 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2564203**

54 Título: **Conjugados de nanopartícula-anticuerpo y procedimientos para producir y usar dichos conjugados**

30 Prioridad:

27.04.2010 US 328494 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ASHWORTH-SHARPE, JULIA;
YUN, CHOL, STEVEN;
ZHILINA, ZHANNA;
MURILLO, ADRIAN, E.;
JOHNSON, DONALD, D.;
FARRELL, MICHAEL;
KOSMEDER, JEROME, W. y
BIENIARZ, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 636 908 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

Conjugados de nanopartícula-anticuerpo y procedimientos para producir y usar dichos conjugados

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a conjugados de nanopartícula-anticuerpo, a procedimientos para producir dichos conjugados y a procedimientos para su uso, en particular, en la detección de moléculas diana, por ejemplo, usando procedimientos de inmunohistoquímica o hibridación *in situ*.

10

Antecedentes

La inmunohistoquímica (IHC) emplea agentes de unión específicos, tales como anticuerpos, para detectar un antígeno de interés que pueda estar presente en una muestra de tejido. La IHC se utiliza ampliamente en aplicaciones clínicas y de diagnóstico, por ejemplo, para el diagnóstico de enfermedades o trastornos particulares. Por ejemplo, determinados tipos de cáncer se pueden diagnosticar basándose en la presencia de una molécula marcadora particular en una muestra obtenida de un sujeto. La IHC también se usa ampliamente en investigación básica para conocer la distribución y localización de biomarcadores en diferentes secciones de tejido.

15

20

Las muestras biológicas también pueden analizarse usando técnicas de hibridación *in situ* (ISH), por ejemplo, hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), en conjunto denominadas ISH. La ISH se diferencia de la IHC en que la ISH detecta ácidos nucleicos en secciones de tejido, mientras que la IHC detecta proteínas.

25

Los sistemas de detección con plata actuales se basan en la tecnología de la peroxidasa de rábano picante (HRP). Para aplicaciones de tinción SISH, las sondas de ácidos nucleicos marcadas con haptenos están dirigidas a secuencias específicas de ADN en los núcleos de tejido. El complejo sonda-diana se visualiza como una señal oscura en el tejido usando un anticuerpo primario anti-hapteno y un anticuerpo secundario conjugado con HRP que actúa como enzima cromogénica. La reacción de visualización está dirigida por la adición secuencial de acetato de plata, hidroquinona y peróxido de hidrógeno, en la que la HRP cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno, con la posterior oxidación de la hidroquinona. Aunque no se comprende totalmente, se planteado la hipótesis de que, en este proceso enzimático redox, algunos electrones pasan a los iones de plata que, a continuación, se reducen a plata metálica. Los átomos de plata precipitan en las proximidades de la enzima, formando grandes depósitos que se pueden visualizar como un punto negro, que señala la presencia de la molécula diana.

30

35

En el documento US 5.360.895 se divulgan conjugados de anticuerpo-oro coloidal o fragmento de anticuerpo-oro coloidal. Los conjugados de anticuerpo-oro coloidal se usan en ensayos de detección de antígeno con contraste de plata, en los que el anticuerpo funciona como anticuerpo primario o como anticuerpo secundario.

40

En el documento WO 03/075961 se divulgan nanopartículas metálicas y su uso como medios de contraste para detectar signos coronarios y otros rasgos vasculares. Los anticuerpos como parte de estos conjugados de nanopartículas se divulgan como restos diana para dirigir la partícula a un objetivo específico después de la inyección *in vivo* o para la detección de IgG de ratón sobre transferencias de nitrocelulosa con conjugados de nanopartículas de oro de Fab' de cabra anti-IgG de ratón.

45

Lim et al. (Nanotechnology (2008), 19(30): 305102) se refieren a la investigación de la funcionalización de la superficie de nanopartículas de oro y magnéticas recubiertas con cubiertas de oro mediante proteínas y marcadores espectroscópicos para la creación de nanosondas para su uso en ensayos de dispersión de Raman de superficie mejorada. Los conjugados de anticuerpo-nanopartícula se divulgan como medios para la separación de proteínas en un campo magnético.

50

El documento WO 2004/002508 divulga procedimientos para formar matrices de nanopartículas de metal, aleación, semiconductor o magnéticas, en las que, en un modo de realización, un armazón que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos se coloca sobre un sustrato y las nanopartículas se acoplan al armazón. Los anticuerpos se utilizan solamente para acoplar las nanopartículas de una manera no covalente al armazón.

55

El documento EP 1 741 717 divulga nanoestructuras metálicas, especialmente nanoestructuras metálicas no esféricas con una estabilidad de forma mejorada, y procedimientos para preparar estas nanoestructuras metálicas. También se divulgan nanoestructuras metálicas unidas a biomoléculas, tales como fragmentos de anticuerpos, para dirigir las a células cancerosas. También se divulga el uso de anticuerpos secundarios conjugados con nanoestructuras en un ensayo ELISA de tipo sándwich.

60

En el documento US 2007/269594 se divulgan procedimientos para preparar nanopartículas de oro pasivadas con tiolato. En un modo de realización del procedimiento, las nanopartículas de oro se unen a proteínas a través de fragmentos scFv.

65

En el documento WO 02/07846 se divulgan procedimientos para la obtención *in vivo* de imágenes de tejidos de un individuo por resonancia magnética utilizando un complejo de cobalto extendido como medio de potenciación de contraste. También se divulgan anticuerpos acoplados a estos complejos para administrar el complejo, es decir, el medio de contraste, a una diana *in vivo* antes de la prueba de imagen.

Yang et al. (Biosens Bioelectric (2009), 24(8): 2707-2711) divulgan un inmunoensayo de quimioluminiscencia con contraste para la detección de α -fetoproteína. La detección se realiza en un formato de tipo sándwich, en el que el antígeno de la muestra es capturado primero por un anticuerpo primario inmovilizado sobre la superficie de perlas magnéticas y, después, es reconocido por un segundo anticuerpo marcado con nanopartículas de oro con doble codificación.

En el documento US 2004/0265922 se describe un ensayo de inmunohistoquímica, en el que se detecta una diana, CD20, utilizando un anticuerpo primario anti-CD20, un anticuerpo secundario biotinilado que se une al anticuerpo primario y un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP). En presencia de AuC13 tamponado, fosfato de ácido ascórbico y acetato de plata, la fosfatasa alcalina desfosforila el fosfato de ascorbato, dando como resultado la producción del agente reductor ascorbato, que luego reduce los iones de oro a oro metálico. El oro metálico sirve como el sitio de nucleación para la amplificación adicional de la señal mediante la reducción de los iones de plata a plata metálica que se deposita como precipitado detectable en el sitio diana.

Qu et al. (Talanta (2008), 76(4): 785-790) divulgan la detección de antígeno prostático específico (PSA) en suero humano con un sensor inmunológico electroquímico usando nanopartículas de sílice funcionalizada como trazador proteico. En particular, el PSA se detecta en un inmunoensayo de tipo sándwich heterogéneo, en el que un anticuerpo de captura de PSA, que está inmovilizado en el electrodo de oro mediante reticulación de glutaraldehído, captura el antígeno del suero humano y el complejo anticuerpo/antígeno se une por nanopartículas de sílice comarcadas con un anticuerpo de detección y fosfatasa alcalina. Dirigidos por la fosfatasa alcalina, los iones de plata son reducidos por el ácido ascórbico y la plata metálica se deposita en la superficie del electrodo.

Cao et al. (Biosens Bioelectron (2008), 22: 1874-1880) divulgan la detección de anticuerpos anti-GAD con un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un complejo de enzima-inmuno-oro. El complejo comprende nanopartículas de oro coloidal (AuNP), peroxidasa de rábano picante (HRP) y anticuerpos anti-IgG. Según Cao et al., la oxidación biocatalizada por HRP de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en presencia de H₂O₂ conduce a la precipitación de un producto insoluble que mejora la señal obtenida a partir del biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR).

En el documento US 2008/0318249 se divulga la detección de diversas moléculas diana en células cultivadas y en transferencias, usando un anticuerpo primario específico de la diana, un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) combinado de nanopartículas de oro y tiramidas fluorescentes. Las nanopartículas de oro se localizan mediante microscopía electrónica, mientras que el procesamiento dirigido por HRP con tiramidas fluorescentes da lugar a la deposición de productos de reacción fluorescentes que posteriormente se visualizan y se localizan mediante microscopía de fluorescencia.

Powell et al. (Human Pathol (2007), 38: 1145-1159) analizan varios procedimientos de autometalografía, es decir, potenciación de la deposición de plata u oro catalizada por nanopartículas de oro en aplicaciones de histopatología. Los procedimientos descritos en Powell et al. requieren una etapa adicional de amplificación con tiramida para aumentar el número de sitios de unión del conjugado de estreptavidina-nanopartícula de oro en el sitio diana. También se divulga en Powell et al. el clásico procedimiento de deposición de plata SISH con HRP (denominado "nuevo procedimiento EnzMet").

Sumario

Los sistemas actuales de detección por SISH con HRP tienen varias desventajas, como la tinción inconsistente, la siembra no específica y la necesidad de un tampón de pH bajo que puede proporcionar un entorno de medios propicio para el crecimiento de hongos. En el presente documento se divulga un novedoso sistema de detección con plata sin HRP para la detección de moléculas diana (incluyendo, pero sin limitaciones, IHC o ISH). Los procedimientos utilizan un conjugado de anticuerpo-nanopartícula y un conjugado de anticuerpo-enzima que estimulan la reducción del metal cuando se utilizan con un sustrato apropiado. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la nanopartícula proporciona un sitio de nucleación para la deposición de metal adyacente a la molécula diana. Este procedimiento proporciona sensibilidad y especificidad mejores para la detección de proteínas o moléculas de ácidos nucleicos diana. La presente divulgación también proporciona nuevos conjugados de anticuerpo-nanopartícula que pueden utilizarse en los procedimientos descritos y en procedimientos de preparación de dichos conjugados descritos.

Los conjugados de anticuerpo-nanopartícula divulgados en el presente documento incluyen dos o más nanopartículas (tales como, oro, paladio, platino, plata, cobre, níquel, cobalto, iridio o una aleación de dos o más de los mismos) directamente unidas a un anticuerpo o fragmento del mismo a través de un enlace de metal-tiol. En ejemplos particulares, la nanopartícula metálica se conjuga con un residuo de cisteína del anticuerpo. En algunos ejemplos, el conjugado incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más nanopartículas unidas directamente a un anticuerpo. En ejemplos adicionales, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm o menos (por ejemplo, de

aproximadamente 0,5 a 200 nm, de aproximadamente 1 nm a 100 nm, de aproximadamente 0,5 nm a 50 nm). En ejemplos particulares, el diámetro de las nanopartículas es menor de aproximadamente 5 nm, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 nm a 5 nm.

5 Entre los procedimientos de preparación de los conjugados de anticuerpo-nanopartícula descritos en el presente documento se incluyen la reacción de una nanopartícula hidrosoluble protegida con arilfosfina complejada con un anticuerpo reducido, para producir un conjugado de anticuerpo-nanopartícula. En algunos ejemplos, la nanopartícula es oro, paladio, platino, plata, cobre, níquel, cobalto, iridio o una aleación de dos o más de los mismos (por ejemplo, una nanopartícula de oro o una nanopartícula aleación de oro-paladio). El material compuesto de arilfosfina-nanopartícula puede incluir una arilfosfina sulfonatada (por ejemplo, una arilfosfina monosulfonatada, bisulfonatada o trisulfonatada, por ejemplo, bis-(sulfonatofenil)fenilfosfina). En algunos ejemplos, el anticuerpo reducido se forma mediante la reacción de un anticuerpo o fragmento del mismo con un agente reductor (por ejemplo, ditiotretitol) para producir el anticuerpo reducido. En ejemplos particulares, la estequiometría del reactante y/o la duración de la reacción se modifican para acoplar dos o más nanopartículas (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más nanopartículas) al anticuerpo reducido. Por ejemplo, la relación del complejo de arilfosfina-nanopartícula con el anticuerpo reducido se incrementa para aumentar el número de nanopartículas unidas al anticuerpo.

En el presente documento también se divulgan procedimientos para detectar una molécula diana en una muestra, que incluyen el uso de un conjugado de anticuerpo-nanopartícula (tales como los conjugados de anticuerpo-nanopartícula descritos en el presente documento). En algunos modos de realización, el procedimiento incluye poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo que se une a una molécula diana (por ejemplo, una proteína diana o una sonda marcada con hapteno unida a una molécula de ácido nucleico); poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al primer anticuerpo; poner en contacto la muestra con un tercer anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas, en el que el tercer anticuerpo se une específicamente al segundo anticuerpo; poner en contacto la muestra con un sustrato de la enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal y se localiza con la molécula diana; y detectar el precipitado de metal, detectando de este modo la molécula diana. En realizaciones adicionales, el procedimiento incluye poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que el primer anticuerpo se une a una molécula diana (por ejemplo, una proteína diana o sonda marcada con hapteno unida a una molécula de ácido nucleico); poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas, en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al primer anticuerpo; poner en contacto la muestra con un sustrato de la enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal y se localiza con la molécula diana; y detectar el precipitado de metal, detectando de este modo la molécula diana.

En algunos modos de realización, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula incluye una o más nanopartículas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más nanopartículas), en el que la una o más nanopartículas incluyen oro, paladio, platino, plata, cobre, níquel, cobalto, iridio, o una aleación de dos o más de los mismos. En algunos ejemplos, los procedimientos incluyen los conjugados de anticuerpo-nanopartícula particulares divulgados en el presente documento. En algunos ejemplos, el anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más moléculas de enzima) incluye una o más moléculas de fosfatasa alcalina (AP), α -galactosidasa, α -lactamasa, glucosidasa o esterasa. En un ejemplo particular, la molécula de enzima es fosfatasa alcalina y el sustrato de la enzima puede ser fosfato de 5-bromo-3-cloro-4-indolilo, fosfato de ácido ascórbico o un fosfato de hidroquinona. En algunos ejemplos, el ion metálico incluye oro, plata, cobre, níquel, platino, paladio, cobalto o iridio.

En algunos modos de realización, el procedimiento de detección de una molécula diana incluye además una etapa de acondicionado con oro, por ejemplo, poner en contacto la muestra con una sal de haluro de oro (por ejemplo, cloruro de oro). En realizaciones adicionales, el procedimiento puede incluir, además, una etapa de amplificación, por ejemplo, poner en contacto la muestra con una sal de plata (por ejemplo, nitrato de plata, óxido de plata, o cloruro de plata). En otros modos de realización adicionales más, el procedimiento también incluye una etapa de fijación, que incluye poner en contacto la muestra con un agente reductor (por ejemplo, tiosulfato de sodio).

También se divulgan kits para la detección de moléculas diana utilizando los procedimientos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede incluir uno o más conjugados de anticuerpo-nanopartícula (tales como un conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro), tales como los conjugados de anticuerpo-nanopartícula divulgados en el presente documento. En algunos ejemplos, el kit también puede incluir uno o más anticuerpos acoplados a una o más moléculas de enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, por ejemplo, 1 a 5 moléculas de fosfatasa alcalina). En ejemplos adicionales, el kit también puede incluir uno o más recipientes que incluyen un sustrato para la enzima conjugada con el anticuerpo y uno o más iones metálicos (por ejemplo, iones de oro, plata, cobre, níquel, platino, paladio, cobalto o iridio). El kit puede incluir, opcionalmente, reactivos para etapas adicionales, tales como el acondicionado con oro, amplificación con plata o fijación.

Las anteriores y otras características de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

65

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A es un esquema que muestra un procedimiento de ejemplo de inmunohistoquímica que utiliza un conjugado de anticuerpo-nanopartícula y los procedimientos divulgados en el presente documento.

5 La FIG. 1B es un esquema que muestra un procedimiento de ejemplo de hibridación *in situ* que utiliza un conjugado de anticuerpo-nanopartícula y los procedimientos divulgados en el presente documento.

La FIG. 2A es una cromatografía de exclusión por tamaño de la purificación de un conjugado de nanopartícula de oro (AuNP)-anticuerpo a partir de los materiales de partida.

10

La FIG. 2B es un gráfico de la absorción UV-Vis del conjugado de AuNP-anticuerpo purificado mostrado en la figura 2A.

La FIG. 3A es una imagen digital de una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida Novex con Bis-Tris al 4-16 % utilizado para evaluar los conjugados de AP-anticuerpo sintetizados con diferentes excesos molares de éster NHS de MAL-dPEGTM₁₂; Calle 1: AP; calle 2: anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo; calle 3: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (procedimiento anterior); calle 4: marcadores del peso molecular; calle 5: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 100X MAL, lote 1; calle 6: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP(1:3) 50X MAL; calle 7: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:2) 100X MAL; calle 8: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 100X MAL, lote 2; calle 9: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 200X MAL.

15

20

La FIG. 3B es una imagen digital de un gel reductor NuPAGE Novex de poliacrilamida con gel de SDS Tris-Acetato al 3-8 % utilizado para evaluar los conjugados de AP-anticuerpo sintetizados con diferentes excesos molares de éster NHS de MAL-dPEGTM₁₂. Calle 1: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 400X MAL; calle 2: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 200X MAL; calle 3: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 100X MAL, lote 2; calle 4: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:2) 100X MAL; calle 5: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 50X MAL; calle 6: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (1:3) 100X MAL conc.; calle 7: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP (recombinante) (1:3); calle 8: conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-AP; calle 9: marcadores de peso molecular.

25

30

La FIG. 4 es una serie de imágenes digitales de ISH de xenoinjertos de líneas celulares de tumor de mama (células BT-474 y MCF7) usando una sonda del cromosoma 17. La sonda se detectó mediante SISH con HRP estándar (paneles superiores) o el procedimiento de detección con plata-AP divulgado usando el conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro (paneles inferiores).

35

La FIG. 5 es una serie de imágenes digitales de ISH de tejido de carcinoma de mama con una sonda de cromosoma 17 (izquierda) y una sonda de HER2 (derecha). Las sondas se detectaron mediante SISH con HRP estándar (paneles superiores) o el procedimiento de detección con plata-AP divulgado usando el conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro (paneles inferiores).

40

La FIG. 6 es un par de imágenes digitales de ISH de xenoinjertos de la línea celular Calu usando una ribosonda de HER2 y se detectaron con el procedimiento de detección con plata-AP sin el conjugado de AuNP-Ab (izquierda) o con el conjugado de AuNP-Ab (derecha).

45

Las FIG. 7A y B son un par de gráficos que muestran el recuento de copias del cromosoma 17 de dos lectores independientes utilizando el procedimiento "cowboy" en una serie de muestras de tejido de cáncer de mama. La sonda del cromosoma 17 se detectó usando SISH con HRP o el procedimiento de detección con plata-AP divulgado usando un conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro.

50

Las FIG. 8A y B son un par de gráficos que muestran el recuento de copias de HER2 de dos lectores independientes utilizando el procedimiento "cowboy" en una serie de muestras de tejido de cáncer de mama. La sonda de HER2 se detectó usando SISH con HRP o el procedimiento de detección con plata-AP divulgado usando un conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro.

55

Las FIG. 9A-F son una serie de imágenes digitales de ISH de tejido de mama (9A-C) o células de cáncer de mama ZR-75-1 (9D-F) con una sonda de HER2. La sonda de HER2 se detectó mediante el procedimiento de detección con plata-AP divulgado usando el conjugado de AuNP 100 nM-anticuerpo (9A y 9D), conjugado de AuNP 100 nM-anticuerpo (9B y 9E), o conjugado de AuNP 50 nM-anticuerpo (9C y 9F).

60

La FIG. 10 es una serie de imágenes digitales de IHC de tejido de carcinoma de mama con anticuerpo primario anti-receptor de estrógenos (ER), anti-receptor de progesterona (PR) o anti-Ki67 (Ki67). Los anticuerpos primarios se detectaron usando el procedimiento de IHC con plata-AP divulgado usando un conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro, omitiendo las etapas del acondicionamiento con oro y de fijación.

65

La FIG. 11 es una serie de imágenes digitales de IHC de tejido de carcinoma de mama con anticuerpo primario anti-

HER2 (HER2), anti-receptor de estrógenos (ER), anti-Ki67 (Ki67) o anti-receptor de progesterona (PR). Los anticuerpos primarios se detectaron usando el procedimiento de IHC con plata-AP divulgado usando un conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro, incluyendo una etapa del acondicionado con oro.

5 La FIG. 12 es una serie de imágenes digitales de IHC de tejido de amígdalas con anticuerpo anti-Bcl-2 que compara la detección de DAB con la plata-AP utilizando los procedimientos de conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro divulgados. También se realizó una comparación de tinciones de contraste junto con el procedimiento con plata-AP.

Descripción detallada

10

I. Abreviaturas

AP: fosfatasa alcalina

15

AuNP: nanopartícula de oro

AuPdNP: nanopartícula de aleación de oro-paladio

20

BCIP: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo

BSPP: bis-(sulfonatofenil)fenilfosfina

DIG: digoxigenina

25

DNP: dinitrofenilo

DTT: ditioneitol

30

HRP: peroxidasa de rábano picante

IgG: inmunoglobulina G

IHC: inmunohistoquímica

35

ISH: hibridación *in situ*.

NP: nanopartícula

40

PdNP: nanopartícula de paladio

PtNP: nanopartícula de platino

SISH: hibridación *in situ* con plata

45

II. Términos

50

A menos que se indique lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que conocen los expertos en la técnica a la que pertenece la divulgación. Las formas del singular "un", "uno" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" tiene por objeto incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Que comprende" significa "que incluye". Por lo tanto, "que comprende A o B" significa "que incluye A" o "que incluye B" o "que incluye A y B."

55

Los procedimientos y materiales adecuados para la práctica o análisis de los modos de realización de la invención divulgada se describen a continuación. Dichos materiales y procedimientos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. Se pueden usar otros procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Por ejemplo, los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica a la que pertenece la divulgación se describen en diversas referencias generales y más específicas, incluyendo, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos hasta 2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4^ª ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

65

Con el fin de facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la divulgación se proporcionan las siguientes

explicaciones de términos específicos:

Fosfatasa alcalina (AP): una enzima hidrolasa que elimina grupos fosfato de una molécula. Un "sustrato de fosfatasa alcalina" es una molécula que incluye un fosfato que pueda eliminar la fosfatasa alcalina. En ejemplos particulares, un sustrato de la AP es una molécula que se convierte en capaz de reducir iones metálicos a un estado de oxidación metálica (0) después de la hidrólisis de un grupo fosfato por la AP. Entre los ejemplos de sustratos de la AP se incluyen, aunque sin limitaciones, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP), fosfato de ácido ascórbico, fosfato de α -tocoferol, fosfato de sesamol y fosfato de eugenol.

Anticuerpo: un polipéptido que incluye al menos una región variable de cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o fragmentos de anticuerpos, así como otros conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, un anticuerpo está unido o conjugado con otra molécula, por ejemplo, una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula de oro) o una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina).

Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas la región variable pesada (VH) y la región variable ligera (VL). En conjunto, la región VH y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo. Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de ellas bien conocidas en la técnica, tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab)'₂, proteínas Fv monocatenarias ('scFv'), y proteínas Fv estabilizadas con puentes disulfuro ('dsFv'). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador, mientras que en la dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, Immunology, 3^a Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de las cadenas ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son producidos por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, preparando las células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunes. Estas células fusionadas y su progenie se denominan "hibridomas". Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Conjugado o bioconjugado: un compuesto que tiene una molécula (por ejemplo, una biomolécula, por ejemplo, un anticuerpo) acoplada efectivamente a otra molécula (por ejemplo, una nanopartícula o una enzima), ya sea directa o indirectamente, por cualquier medio adecuado. En algunos ejemplos, la molécula (por ejemplo, un anticuerpo) puede estar directamente acoplada covalentemente a una nanopartícula (por ejemplo, por un enlace metal-tiol). En otros ejemplos, la molécula (por ejemplo, un anticuerpo) puede acoplarse a una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), por ejemplo, mediante el uso de una molécula "enlazadora", siempre que el enlazador no afecte negativamente de forma significativa a la actividad de la enzima o a la función de la biomolécula. El enlazador es, preferentemente, biocompatible. Los enlazadores moleculares habituales conocidos en la técnica incluyen un grupo maleimida o succinimida, estreptavidina, neutravidina, biotina, o compuestos similares.

Conjugación, unión o enlace: acoplamiento de una primera unidad a una segunda unidad. Esto incluye, pero sin limitaciones, la unión covalente de una molécula a otra molécula (por ejemplo, directamente o por medio de una molécula enlazadora), la unión no covalente de una molécula a otra (por ejemplo, unión electrostática) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.921.496, que divulga procedimientos para la conjugación electrostática), la unión no covalente de una molécula a otra molécula mediante puentes de hidrógeno, la unión no covalente de una molécula a otra molécula mediante fuerzas de van der Waals, y cualquier y todas las combinaciones de tales enlaces.

Colocalizado: que se produce en el mismo lugar o sustancialmente el mismo lugar. En algunos ejemplos, un precipitado de metal (por ejemplo, el metal en estado de oxidación 0) formado utilizando los procedimientos descritos en el presente documento se colocaliza con una molécula diana cuando se acumula a una distancia máxima de aproximadamente 5 μ m de la molécula diana (por ejemplo, 1 μ m, 500 nm, 250 nm, 100 nm, 50 nm, 20 nm, 10 nm, 5 nm, 2 nm, 1 nm, o 0,5 nm de la molécula diana).

Contacto: colocación que permite la asociación entre dos o más restos, particularmente la asociación física directa, por ejemplo, tanto en forma sólida como en forma líquida (por ejemplo, la colocación de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra biológica fijada a un portaobjetos, en contacto con un anticuerpo o una sonda).

Detectar: determinar si está presente o ausente un agente (por ejemplo, una señal o una molécula diana particular), por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir, además, la cuantificación. "Detección" se refiere a cualquier procedimiento para determinar si algo existe o no existe, por ejemplo, determinar si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, la "detección" puede incluir el uso de un dispositivo mecánico o visual

para determinar si una muestra exhibe una característica específica. En determinados ejemplos, la detección se refiere a la observación visual de un anticuerpo unido a una molécula diana, o la observación de que un anticuerpo no se une a una molécula diana.

5 **Enlace directo:** acoplamiento o conjugación de dos moléculas sin que intervenga un enlazador. En algunos ejemplos, se forma un enlace directo cuando un átomo de una primera molécula (por ejemplo, un anticuerpo) se une a un átomo de una segunda molécula (por ejemplo, una nanopartícula). En algunos ejemplos, el enlace directo es un enlace covalente, por ejemplo, un enlace metal-tiol (por ejemplo, un enlace oro-tiol).

10 **Hapteno:** una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero, por lo general, es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica, excepto en combinación con una molécula vehículo. Entre los ejemplos de haptenos se incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, biotina, nitroarilos (por ejemplo, dinitrofenilo (DNP)), y digoxigenina. Ejemplos adicionales de oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y haptenos ciclolignanos se divulgan en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2008/0268462.

15 **Hibridación:** formar pares de bases entre regiones complementarias de dos hebras de ADN, ARN, o entre el ADN y el ARN, formando de este modo una molécula dúplex. Por tanto, las condiciones de hibridación que resultan en grados concretos de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del procedimiento de hibridación y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico que hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (por ejemplo, la concentración de Na⁺) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación para la consecución de determinados grados de rigurosidad se analizan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (capítulos 9 y 11).

20 **Inmunohistoquímica (IHQ):** un procedimiento de determinación de la presencia o distribución de un antígeno (por ejemplo, una proteína) en una muestra (por ejemplo, una parte o sección de tejido) mediante la detección de la interacción del antígeno con un agente de unión específico, por ejemplo, un anticuerpo. Una muestra que incluye un antígeno (por ejemplo, un antígeno diana) se incuba con un anticuerpo en condiciones que permiten la unión anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno se puede detectar por medio de un marcador detectable conjugado con el anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado con un anticuerpo secundario, que se produce contra el anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta). Entre los ejemplos de marcadores detectables que se pueden utilizar en la IHC se incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos, fluorocromos (tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y rodamina), y enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina). En algunos ejemplos, la unión anticuerpo-antígeno se puede detectar mediante metalografía estimulada con enzimas, como se divulga en el presente documento, en la que una enzima conjugada a un anticuerpo cataliza la transformación de un sustrato en un producto que puede donar electrones para reducir los iones metálicos en solución, que posteriormente pueden detectarse.

25 **Hibridación *in situ* (ISH):** un tipo de hibridación que utiliza una cadena de ARN o ADN complementaria marcada (una sonda) para localizar una secuencia de ADN o ARN específica o en una parte o sección de tejido (*in situ*), o, si el tejido es lo suficientemente pequeño (por ejemplo, semillas de plantas, embriones de *Drosophila*), en todo el tejido (ISH de embriones completos o "*whole mount*"). Es distinta de la inmunohistoquímica, que localiza proteínas en secciones de tejido. La ISH de ADN se puede utilizar para determinar la estructura de los cromosomas, por ejemplo, en la medicina de diagnóstico para evaluar la integridad cromosómica. La ISH de ARN (histoquímica de hibridación) se utiliza para medir y localizar ARNm y otros transcritos dentro de las secciones de tejido o "*whole mount*".

30 Para la histoquímica de hibridación, las células y los tejidos de la muestra se tratan, generalmente, para fijar los transcritos diana en su lugar y aumentar el acceso de la sonda a la molécula diana. Como se ha indicado anteriormente, la sonda puede ser un ADN complementario marcado o un ARN complementario (ribosonda). La sonda se hibrida con la secuencia diana a temperatura elevada y, después, el exceso de sonda se elimina por lavado (después de hidrólisis previa utilizando ARNasa en el caso de exceso de sonda de ARN sin hibridar). Los parámetros de la solución, tales como la temperatura, la concentración de sal y/o de detergente, se pueden manipular para eliminar la mayoría o todas las interacciones no idénticas (por ejemplo, solo las secuencias que sean sustancialmente complementarias idénticas o exactas permanecerán unidas). A continuación, la sonda marcada que se ha marcado con efectivamente, por ejemplo, con bases radiomarcadas, marcadas con fluorescencia o marcadas con antígeno (por ejemplo, DNP o digoxigenina), se localiza y se puede cuantificar en el tejido usando autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente. La ISH también puede utilizar dos o más sondas, marcadas con radiactividad o los otros marcadores no radioactivos, tales como marcadores de hapteno, y, típicamente, se marcan diferencialmente para detectar simultáneamente dos o más transcritos.

35 **Ion metálico:** Cationes que requieren reducción y electrones para la conversión a metales (estado de oxidación cero). En ejemplos particulares, los iones metálicos incluyen iones de plata, iones de oro, iones de cobre, iones de níquel, iones de platino, iones de paladio, iones de cobalto o iones de iridio. Los iones metálicos pueden estar en forma de una solución de una sal metálica, por ejemplo, un nitrato de metal, un haluro de metal, acetato de metal, o perclorato de metal (por ejemplo, nitrato de plata, acetato de plata, fluoruro de plata o perclorato de plata). En otros ejemplos, la sal de

metal puede incluir un sulfato de metal, fosfato de metal o carbonato de metal.

Nanopartícula: una partícula a nanoescala con un tamaño que se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula nanoscópica que tiene al menos una dimensión de menos de aproximadamente 200 nm. Entre los ejemplos de nanopartículas se incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones, nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas metálicas, materiales de tipo fullereno, nanotubos inorgánicos, dendrímeros (tales como con quelatos metálicos unidos de forma covalente), nanofibras, nanocuernos, nanocebollas, nanobarras, nanocuerdas y puntos cuánticos. En ejemplos particulares, una nanopartícula es una nanopartícula de metal (por ejemplo, una nanopartícula de oro, de paladio, de platino, de plata, de cobre, de níquel, de cobalto, de iridio, o una aleación de dos o más de los mismos). Las nanopartículas pueden incluir un núcleo o un núcleo y una envoltura, como en las nanopartículas de núcleo-envoltura.

Molécula de ácido nucleico: un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido incluyendo, sin limitaciones, ADNc, ARNm, ADN genómico y ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente). La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. De modo que cuando tiene una sola hebra, la molécula de ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, una molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Polipéptido o proteína: un polímero en el que los monómeros son restos de aminoácidos que están unidos mediante enlaces amida. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, se puede usar el isómero óptico L o el isómero óptico D. Los términos "polipéptido", "péptido" o "proteína", como se usan en el presente documento, se pretende que abarquen cualquier secuencia de aminoácidos y que incluyan secuencias modificadas, tales como glicoproteínas. Con el término "polipéptido" o "proteína" se pretende específicamente cubrir tanto las proteínas naturales como las proteínas que se producen de forma recombinante o sintética.

Sonda: una molécula de ácido nucleico aislada unida a un marcador o molécula indicadora detectable, por ejemplo, un hapteno. Entre los marcadores típicos se incluyen isótopos radiactivos, sustratos de enzimas, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos (incluyendo, pero sin limitarse al mismo, DNP), y enzimas. Los procedimientos para el marcado e indicaciones para la elección de los marcadores adecuados para diversos fines se tratan, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (En *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992).

Un experto en la técnica apreciará que la especificidad de una sonda particular aumenta con su longitud. Por lo tanto, las sondas se pueden seleccionar de modo que proporcionen una especificidad deseada, y pueden comprender al menos 17, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos deseada. En ejemplos particulares, las sondas pueden tener al menos 100, 250, 500, 600, 1000, o más ácidos nucleicos consecutivos de una secuencia de nucleótidos deseada.

Agente reductor: un elemento o compuesto que reduce otra especie. En la reducción de otra especie, el agente reductor se oxida y es un donante de electrones. En ejemplos particulares, los agentes reductores incluyen, pero sin limitaciones, ditiotreitól (DTT) y tiosulfato de sodio.

Muestra: el término "muestra" se refiere a cualquier líquido, sustancia (o material) semisólida o sólida en o sobre el que un objetivo puede estar presente. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida de un material biológico. Entre los ejemplos de muestras biológicas se incluyen muestras de tejido y muestras de citología. En algunos ejemplos, la muestra biológica se obtiene de un sujeto animal, por ejemplo, un sujeto humano.

Una muestra biológica incluye cualquier muestra sólida o fluida obtenida, excretada o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo, sin limitaciones, organismos unicelulares (tales como bacterias, levaduras, protozoos, y amebas, entre otros) y organismos multicelulares (por ejemplo, plantas o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o de un paciente humano afectado por una afección o enfermedad a diagnosticar o investigar, por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un fluido biológico obtenido, por ejemplo, de sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, el líquido obtenido de un absceso o de cualquier otro sitio de infección o inflamación), o fluido obtenido a partir de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por la enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una muestra de biopsia o autopsia, por ejemplo, una biopsia de tumor), un xenoinjerto, o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o célula cultivada) o medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un extracto del núcleo. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un citoplasma bacteriano. En determinados ejemplos, una muestra es una muestra de control de calidad. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo es una célula, una sección de tejido o sedimento celular preparado a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es uno que está en riesgo de sufrir una afección o enfermedad concreta o que ya la sufre.

Se une específicamente: la unión de un agente que se une, preferentemente, o que sustancialmente solo se une a una diana definida (por ejemplo, un anticuerpo contra un antígeno específico o una sonda de ácido nucleico a una secuencia de ácido nucleico específica). Con respecto a un antígeno, "se une específicamente" se refiere a la asociación

preferente de un anticuerpo u otro ligando, en su totalidad o en parte, a un polipéptido específico. Con respecto a una secuencia de ácido nucleico, "se une específicamente" se refiere a la asociación preferente de una sonda de ácido nucleico, en su totalidad o en parte, a una secuencia de ácido nucleico específica.

5 **Sustrato:** una molécula sobre la que actúa un catalizador, por ejemplo, una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina). En un ejemplo, un sustrato es un sustrato de fosfatasa alcalina, por ejemplo, un fosfato de arilo que tiene la fórmula RO-PO₃H₂ o RO-PO₃²⁻(Y⁺)₂, en la que R es un grupo arilo e Y⁺ es un catión (tales como Na⁺, K⁺ o Li⁺). En ejemplos particulares, un sustrato de fosfatasa alcalina es BCIP.

10 **Molécula diana:** cualquier molécula cuya la presencia, localización y/o concentración se pueden determinar. Entre los ejemplos de moléculas diana se incluyen proteínas, ácidos nucleicos y haptenos, tales como haptenos unidos covalentemente a proteínas o a secuencias de ácidos nucleicos. Las moléculas diana se detectan, típicamente, usando uno o más conjugados de una molécula de unión específica y un marcador detectable.

15 III. Conjugados de anticuerpo-nanopartícula

En el presente documento se divulgan conjugados de anticuerpo-nanopartícula y procedimientos para producir tales conjugados. Los conjugados de anticuerpo-nanopartícula pueden usarse en procedimientos para detectar una molécula diana (por ejemplo, una proteína o una molécula de ácido nucleico unida a una sonda marcada con haptenos), tales como los procedimientos proporcionados en el presente documento.

A. Conjugados

25 Los conjugados de anticuerpo-nanopartícula descritos en el presente documento incluyen dos o más nanopartículas (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más nanopartículas, por ejemplo, de 2 a 10 nanopartículas o de 2 a 7 nanopartículas) unidas directamente a un anticuerpo a través de un enlace metal-tiol entre la nanopartícula y un tiol presente en el anticuerpo (por ejemplo, un residuo de aminoácido del anticuerpo, por ejemplo, un residuo de cisteína). En algunos modos de realización, los conjugados de anticuerpo-nanopartícula divulgados se utilizan en procedimientos histoquímicos (tales como ISH o IHC) y proporcionan una mayor sensibilidad que los procedimientos convencionales.

30 En algunos modos de realización, las nanopartículas utilizadas en los conjugados de anticuerpo-nanopartícula divulgados son nanopartículas metálicas. En algunos ejemplos, las nanopartículas son de oro, paladio, platino, plata, cobre, níquel, cobalto o iridio. En otros ejemplos, las nanopartículas son de rutenio, rodio, osmio o hierro. En ejemplos específicos, la nanopartícula es una nanopartícula de oro, una nanopartícula de paladio o una nanopartícula de platino. 35 En otros ejemplos, las nanopartículas son una aleación de dos o más metales (tales como dos o más de oro, paladio, platino, plata, cobre, níquel, cobalto o iridio). En ejemplos particulares, la nanopartícula es una nanopartícula de aleación de oro-paladio. En otros ejemplos, la nanopartícula es una nanopartícula de núcleo-envoltura, que tiene un núcleo de metal con una envoltura de un metal diferente (por ejemplo, una nanopartícula de plata incluyendo una envoltura de oro). En algunos ejemplos, la nanopartícula tiene un núcleo metálico que incluye aproximadamente 10-200 átomos, por ejemplo, aproximadamente 100-200, 100-150, 11-100 o 11-70 átomos.

40 En un ejemplo particular, la nanopartícula es una nanopartícula de oro. En algunos ejemplos, la nanopartícula de oro tiene un núcleo metálico que incluye aproximadamente 10-200 átomos de oro, por ejemplo, aproximadamente 100-200 átomos de oro, aproximadamente 100-150 átomos de oro, aproximadamente 11-100 átomos de oro o aproximadamente 45 11-70 átomos de oro. En un ejemplo particular, la nanopartícula de oro tiene un núcleo metálico que incluye aproximadamente 100-150 átomos de oro. Las nanopartículas metálicas y los procedimientos para producir nanopartículas metálicas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Nanoparticles: From Theory to Application*, Günther Schmid, ed., Wiley-BCH, 2004.

50 En algunos ejemplos, las dos o más nanopartículas conjugadas con un anticuerpo tienen, cada una, un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 200 nm (por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm o de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 50 nm). En ejemplos particulares, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 5 nm o menos (por ejemplo, de aproximadamente 5 nm, de aproximadamente 4,5 nm, de 55 aproximadamente 4 nm, de aproximadamente 3,5 nm, de aproximadamente 3 nm, de aproximadamente 2,5 nm, de aproximadamente 2 nm, de aproximadamente 1,5 nm, de aproximadamente 1 nm o de aproximadamente 0,5 nm o menos). En otros ejemplos, las nanopartículas tienen un diámetro de al menos aproximadamente 50 nm, por ejemplo, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 130 nm, 60 aproximadamente 140 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 160 nm, aproximadamente 170 nm, aproximadamente 180 nm, aproximadamente 190 nm, aproximadamente 200 nm o más.

65 Los conjugados divulgados incluyen dos o más nanopartículas ligadas a un anticuerpo. En algunos ejemplos, el anticuerpo puede incluir anticuerpos monoclonales o policlonales, tales como IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM; fragmentos de anticuerpos, incluyendo, sin limitaciones, fragmentos proteolíticos de inmunoglobulina [tales como F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab que son conocidos en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes

(tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos F(ab)₂, proteínas Fv de cadena única ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas por puentes disulfuro ("dsFv")). En otros ejemplos, el anticuerpo puede incluir diacuerpos, triacuerpos, y anticuerpos de camélidos; anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados); anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos); y combinaciones de los mismos. En ejemplos particulares, el anticuerpo incluye los llamados "anticuerpos secundarios", que incluyen anticuerpos policlonales con especificidad por inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgA, o IgM) de una especie particular (por ejemplo, conejo, cabra, ratón, pollo, oveja, rata, vaca, caballo, burro, hámster, cobaya, o cerdo). En algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, IgG completa humana, o anticuerpos de ratón o de rata. En un ejemplo divulgado en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo. En otros ejemplos, el anticuerpo incluye un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, un anticuerpo anti-dinitrofenilo (DNP), un anticuerpo anti-digoxigenina (DIG), un anticuerpo anti-fluoresceína, un anticuerpo anti-biotina o un anticuerpo anti-benzofurazán).

Los conjugados de anticuerpo-nanopartícula divulgados en el presente documento incluyen un enlace que une directamente el anticuerpo y la nanopartícula (por ejemplo, un enlace formado cuando un átomo de una primera molécula (por ejemplo, un anticuerpo) se une a un átomo de una segunda molécula (por ejemplo, una nanopartícula)). En algunos ejemplos, el enlace directo es un enlace covalente, por ejemplo, un enlace metal-tiol. En algunos ejemplos, un átomo metálico de la nanopartícula está unido covalentemente a un grupo tiol presente en el anticuerpo, formando un enlace metal-tiol directo entre la nanopartícula y el anticuerpo. En algunos ejemplos, el anticuerpo tiene aproximadamente de 1 a 10 grupos tiol (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos tiol), cada uno de los cuales puede formar un enlace metal-tiol con una nanopartícula. En ejemplos particulares, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula no incluye un enlazador entre el anticuerpo y la nanopartícula.

En un ejemplo, el grupo tiol presente en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un grupo tiol de un resto del aminoácido cisteína del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un resto de cisteína presente en un anticuerpo natural o un resto de cisteína que se introduce en el anticuerpo, por ejemplo, usando técnicas recombinantes, tales como mutagénesis dirigida a sitio). En otros ejemplos, el tiol se puede formar haciendo reaccionar el anticuerpo con un reactivo que introduce un grupo tiol en el anticuerpo (por ejemplo, el reactivo de Traut (2-iminotiolano) o usando un tiol protegido unido al ácido carboxílico activado).

Las inmunoglobulinas son proteínas tetraméricas compuestas por dos copias idénticas de una cadena pesada y dos copias idénticas de una cadena ligera. La estructura de cuatro cadenas se mantiene mediante fuertes interacciones no covalentes y puentes disulfuro covalentes entre la mitad amino-terminal de los pares de cadenas pesada-ligera y entre las regiones carboxilo-terminal de las dos cadenas pesadas. Los anticuerpos incluyen puentes disulfuro intercatenarios que unen las cadenas pesadas y ligeras y también unen las dos cadenas pesadas. Los anticuerpos también incluyen puentes disulfuro intracatenarios que se forman dentro de un polipéptido individual de la cadena ligera o pesada. En algunos ejemplos, las nanopartículas se conjugan con el anticuerpo en los tioles que se producen mediante la reducción de disulfuros intracatenarios del anticuerpo. En otros ejemplos, las nanopartículas se conjugan con el anticuerpo en los tioles que se producen mediante la reducción de disulfuros intercatenarios del anticuerpo.

B. Procedimientos para la producción de conjugados de anticuerpo-nanopartícula

En el presente documento también se divulgan procedimientos para la producción de los conjugados de anticuerpo-nanopartícula descritos. Los procedimientos proporcionan conjugación directa de dos o más nanopartículas a un anticuerpo a través de grupos tiol (por ejemplo, puentes disulfuro nativos reducidos) presentes en el anticuerpo. Los procedimientos incluyen la reacción de un compuesto de arilfosfina en nanopartículas (por ejemplo, una nanopartícula protegida con una arilfosfina) con un anticuerpo reducido. La arilfosfina confiere solubilidad en agua y la reactividad de la nanopartícula a los tioles (por ejemplo, los restos de cisteína) presentes en el anticuerpo, lo que facilita el desplazamiento de la arilfosfina. El uso de fosfina también elimina la necesidad de utilizar un potente oxidante para activar la nanopartícula para la conjugación. Finalmente, la conjugación se puede producir a través de la reducción de los enlaces disulfuro existentes en la proteína nativa, lo que permite una reducción leve y preservación de la estructura y la función del anticuerpo. El número de nanopartículas conjugadas con el anticuerpo puede ajustarse mediante la estequiometría del reactante y el número de tioles reducidos presentes en el anticuerpo. En algunos ejemplos, los procedimientos divulgados producen un conjugado que incluye, aproximadamente, de dos a siete nanopartículas por anticuerpo, por ejemplo, de aproximadamente tres a siete, o aproximadamente cinco nanopartículas por anticuerpo. En algunos ejemplos, una preparación de conjugados de nanopartículas-anticuerpo incluye un promedio de aproximadamente cinco nanopartículas por anticuerpo.

Entre los procedimientos divulgados se incluyen la reacción de un compuesto arilfosfina-nanopartícula con un anticuerpo reducido, para producir un conjugado de anticuerpo-nanopartícula. En algunos modos de realización, la nanopartícula es una nanopartícula de metal (por ejemplo, una nanopartícula de oro, de paladio, de platino, de plata, de cobre, de níquel, de cobalto, de iridio, o una aleación de dos o más de los mismos). En otros ejemplos, la nanopartícula es una nanopartícula de núcleo-envoltura (por ejemplo, una nanopartícula de plata que incluye una envoltura de oro). En ejemplos particulares, la nanopartícula es una nanopartícula de oro, una nanopartícula de paladio o una nanopartícula de platino. En otros ejemplos, la nanopartícula es una nanopartícula de aleación de oro-paladio. En algunos ejemplos,

las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 200 nm (por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm o de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 5 nm). En ejemplos particulares, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 5 nm o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 nm, aproximadamente 4,5 nm, aproximadamente 4 nm, aproximadamente 3,5 nm, aproximadamente 3 nm, de aproximadamente 2,5 nm, de aproximadamente 2 nm, aproximadamente 1,5 nm, aproximadamente 1 nm, o aproximadamente 0,5 nm). En otros ejemplos, las nanopartículas tienen un diámetro de al menos aproximadamente 50 nm, por ejemplo, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 160 nm, aproximadamente 170 nm, aproximadamente 180 nm, aproximadamente 190 nm, aproximadamente 200 nm o más.

En algunos modos de realización, el compuesto arilfosfina-nanopartícula se produce mediante la reacción de nanopartículas con una arilfosfina (por ejemplo, una arilfosfina sustituida que permite la solubilidad en agua). En algunos ejemplos, la arilfosfina es soluble en agua a una cantidad de, como mínimo, 1 mg/ml (por ejemplo, como mínimo 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, o más). En algunos ejemplos, la arilfosfina es una fosfina sulfonatada (por ejemplo, fosfina monosulfonatada, bisulfonatada o trisulfonatada). En un ejemplo particular, la arilfosfina es bis(sulfonatofenil)fenilfosfina. En ejemplos particulares, el complejo arilfosfina-nanopartícula es un complejo arilfosfina-nanopartícula de oro, por ejemplo un complejo bis(sulfonatofenil)fenilfosfina-nanopartícula de oro.

En algunos modos de realización, las nanopartículas de oro se producen en un líquido mediante reducción de ácido cloraurico (HAuCl_4). En un ejemplo particular, se puede realizar una reducción bifásica (tolueno y agua) en borohidruro sódico del ácido áurico a una nanopartícula de oro soluble orgánico de un tamaño de aproximadamente 1,5-2 nm. A esto le puede seguir un intercambio de ligando con arilfosfinas sulfonatadas en una solución de agua y diclorometano, para producir nanopartículas solubles en agua para conjugar con un anticuerpo. Un experto en la técnica puede preparar otros complejos de arilfosfina-nanopartícula (por ejemplo, complejos de nanopartícula de paladio, nanopartícula de platino o nanopartícula de oro-aleación de paladio) usando procedimientos similares y materiales de partida adecuados.

Entre los procedimientos divulgados también se incluyen la reacción de un anticuerpo reducido con un complejo arilfosfina-nanopartícula, para producir un conjugado de anticuerpo-nanopartícula. Entre los anticuerpos que se pueden usar en los procedimientos divulgados se incluyen los analizados anteriormente, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, por ejemplo anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, el anticuerpo incluye los llamados "anticuerpos secundarios", que incluyen anticuerpos policlonales con especificidad por inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgA, o IgM) de una especie particular (por ejemplo, conejo, cabra, ratón, pollo, oveja, rata, vaca, caballo, burro, hámster, cobaya o cerdo). En un ejemplo específico divulgado en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo. En otros ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, un anticuerpo anti-DNP, un anticuerpo anti-DIG, un anticuerpo anti-fluoresceína, un anticuerpo anti-biotina o un anticuerpo anti-benzofurazán). Los anticuerpos están disponibles comercialmente en numerosas fuentes, incluyendo, pero sin limitación, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Abcam (Cambridge, MA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Life Technologies/Invitrogen (Carlsbad, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN), BiosPacific (Emeryville, CA) y Abnova (Walnut, CA).

Los procedimientos para reducir una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, son bien conocidos para los expertos en la materia. Se puede formar un anticuerpo reducido para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento mediante la reacción de un anticuerpo con un agente reductor para producir un anticuerpo reducido. Entre los procedimientos se incluyen mezclar un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo) con un agente reductor durante un periodo de tiempo suficiente para producir un anticuerpo reducido. El anticuerpo reducido incluye uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) grupos tiol disponibles. En algunos ejemplos, los grupos tiol disponibles se producen como resultado de la reducción de enlaces disulfuro presentes en el anticuerpo nativo (por ejemplo, uno o más disulfuros intracatenarios o disulfuros intercatenarios). En ejemplos particulares, los grupos tiol disponibles se producen mediante reducción de, como mínimo, un puente disulfuro intracatenario presente en el anticuerpo nativo.

En algunos ejemplos, el agente reductor es un agente reductor monotiol o ditiol (por ejemplo, 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina, cisteína, glutatión reducido, ditiotreitól, ditioeritritól, dimercaptoacetato glicol o ácido tioglicólico). En otro ejemplo, el agente reductor es un agente reductor de trialquilfosfina (por ejemplo, tris(2-carboxietil)fosfina). Se pueden determinar la concentración adecuada del agente reductor y el tiempo para la reacción mediante titulación del número de tioles producidos en una cantidad de tiempo dada con una concentración concreta del agente reductor a una temperatura adecuada. Un experto en la técnica puede determinar el número de tioles disponibles (por ejemplo, mediante ensayo de Ellman; Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 82:70-77, 1959). En algunos ejemplos, la cantidad de agente reductor es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M (por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a 500 mM, de aproximadamente 5 mM a 100 mM o de aproximadamente 10 mM a 50 mM) y la cantidad de tiempo es de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, de aproximadamente 10 minutos a 2 horas o de aproximadamente 20 minutos a 60 minutos). En un ejemplo particular no limitante, se hace reaccionar un anticuerpo

con ditiotreitól (DTT) aproximadamente 0,5 M durante aproximadamente 25 minutos a 4 °C para producir un anticuerpo reducido.

5 En algunos ejemplos, el complejo arilfosfina-nanopartícula y el anticuerpo reducido se incuban durante, como mínimo, aproximadamente 2 horas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 24, 36, 48, 60, 72 horas o más). En ejemplos adicionales, la reacción del complejo arilfosfina-nanopartícula y el anticuerpo reducido se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 28 °C (por ejemplo, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 22 °C). En algunos ejemplos, la reacción se lleva a cabo a aproximadamente 4 °C. En otros ejemplos, la reacción se lleva a cabo a la temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 26 °C). En ejemplos particulares, la reacción se lleva a cabo a aproximadamente 4 °C durante 48 horas o a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Un experto en la técnica entenderá que el tiempo de reacción y la temperatura se pueden variar. Por ejemplo, en reacciones de menor duración (por ejemplo, de menos de 24 horas) o a una temperatura más fría (por ejemplo, a 4 °C) se puede producir menos conjugación de nanopartículas con anticuerpo mientras que en reacciones de mayor duración (por ejemplo, de más de 24 horas) o a una temperatura más alta (por ejemplo, a temperatura ambiente) se puede producir más conjugación de nanopartículas con anticuerpo.

20 En algunos modos de realización, el número de nanopartículas acopladas al anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-nanopartícula se controla ajustando la estequiometría del reactante y/o la duración de la reacción. En algunos ejemplos, se pueden producir conjugados con dos o más nanopartículas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) acoplados a una molécula de anticuerpo aumentando la cantidad del complejo arilfosfina-nanopartícula incluido en la reacción con el anticuerpo reducido. Dichos modos de realización incluyen aquellos que tienen relaciones que no son de números enteros entre nanopartícula y anticuerpo. En algunos ejemplos, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula incluye 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 4, 4,5, 5, o más nanopartículas por anticuerpo. En otros ejemplos, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula incluye un promedio de aproximadamente dos a siete (por ejemplo, de aproximadamente tres a seis o de aproximadamente cinco) nanopartículas por anticuerpo. En algunos ejemplos, la estequiometría del reactante del complejo arilfosfina-nanopartícula y el anticuerpo reducido es de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o más. En un ejemplo no limitante, la estequiometría de la reacción es de aproximadamente 5 mg del complejo de arilfosfina-nanopartícula a aproximadamente 1,5 mg de anticuerpo y el conjugado de anticuerpo-nanopartícula resultante incluye aproximadamente 3,5 nanopartículas por anticuerpo. En otro ejemplo no limitante, la estequiometría de la reacción es de aproximadamente 10 mg del complejo de arilfosfina-nanopartícula a aproximadamente 1,5 mg de anticuerpo y el conjugado de anticuerpo-nanopartícula resultante incluye aproximadamente 5 nanopartículas por anticuerpo.

35 En modos de realización adicionales, el número de nanopartículas acopladas al anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-nanopartícula se controla ajustando el número de tioles reducidos presentes en el anticuerpo reducido en la reacción. Los expertos en la materia conocen los procedimientos para controlar la reducción de una proteína. En algunos ejemplos, el tipo o cantidad de agente reductor y/o la duración de la reacción de reducción se ajustan para controlar el grado de reducción de la proteína. Por ejemplo, aumentando la cantidad de agente reductor y/o la duración de la reacción, se reduce un mayor número de disulfuros en la proteína, de modo que se producen más tioles reducidos y se permite la conjugación de un mayor número de nanopartículas a una única molécula de anticuerpo. Por el contrario, disminuyendo la cantidad de agente reductor y/o la duración de la reacción, se reduce un menor número de disulfuros en la proteína, de modo que se producen menos tioles reducidos y se permite la conjugación de un menor número de nanopartículas a una única molécula de anticuerpo.

45 **IV. Procedimientos de uso de los conjugados anticuerpo-nanopartícula**

50 En el presente documento se divulgan procedimientos para detectar una molécula diana en una muestra, que usan conjugados de anticuerpo-nanopartícula, incluidos los conjugados de anticuerpo-nanopartícula descritos en el presente documento. Los procedimientos incluyen la detección de una molécula diana, por ejemplo procedimientos histoquímicos, por ejemplo, procedimientos de inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* (ISH). Los conjugados de anticuerpo-nanopartícula pueden aumentar la sensibilidad y/o especificidad de los procedimientos de IHC e ISH con respecto a los procedimientos convencionales.

55 Los procedimientos descritos en el presente documento usan un conjugado de anticuerpo-nanopartícula como centro de nucleación para metalografía estimulada por enzimas. En este procedimiento, una enzima cataliza la transformación química de un sustrato en un producto que, posteriormente, puede donar electrones para reducir los iones metálicos en la solución. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que en los procedimientos divulgados en el presente documento, los átomos metálicos resultantes se nuclean en la superficie de la nanopartícula, lo que aumenta el tamaño de la partícula a un grado que permite su visualización, por ejemplo, mediante microscopía óptica. El conjugado de anticuerpo-nanopartícula parece proporcionar un punto específico del depósito del átomo metálico, lo que da lugar a un aumento de la señal con baja tinción de fondo.

65 En algunos modos de realización, los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo que se une a una molécula diana; poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al

5 primer anticuerpo; poner en contacto la muestra con un tercer anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo-nanopartícula divulgado en el presente documento), en el que el tercer anticuerpo se une específicamente al segundo anticuerpo; poner en contacto la muestra con un sustrato de la enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal y se colocaliza con la molécula diana; y detectar el precipitado de metal. La FIG. 1 muestra diagramas esquemáticos de procedimientos no limitantes de ejemplo divulgados en el presente documento para realizar IHC (FIG. 1 A) e ISH (FIG. 1B) usando conjugados de anticuerpo-nanopartícula.

10 En otros modos de realización, uno o más de los anticuerpos usados en los procedimientos divulgados pueden incluir un hapteno (por ejemplo, DNP, DIG, fluoresceína, biotina o benzofurazán) y el anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo es un anticuerpo anti-haptenos. En un ejemplo, los procedimientos incluyen poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo que se une a una molécula diana, en el que el primer anticuerpo incluye un hapteno; poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al hapteno del primer anticuerpo; poner en contacto la muestra con un tercer anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas, en el que el tercer anticuerpo se une específicamente al segundo anticuerpo; poner en contacto la muestra con un sustrato de la enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal y se colocaliza con la molécula diana; y detectar el precipitado de metal. En otros ejemplos, el anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima (por ejemplo, el segundo anticuerpo) incluye un hapteno y el anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas es un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente al hapteno del segundo anticuerpo. En algunos modos de realización, el primero y/o segundo anticuerpos incluyen un hapteno y el segundo y/o tercer anticuerpos son anticuerpos anti-haptenos. En algunos ejemplos, cuando más de uno de los anticuerpos usados en los procedimientos divulgados incluye un hapteno, los haptenos son haptenos diferentes.

25 En otros modos de realización, los procedimientos divulgados incluyen poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que el primer anticuerpo se une a una molécula diana; poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo-nanopartícula divulgado en el presente documento), en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al primer anticuerpo; poner en contacto la muestra con un sustrato de la enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal y se colocaliza con la molécula diana; y detectar el precipitado de metal. En modos de realización adicionales, los procedimientos incluyen poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que el primer anticuerpo se une a una molécula diana y en el que el primer anticuerpo incluye un hapteno (por ejemplo, DNP, DIG, fluoresceína, biotina o benzofurazán); poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas, en el que el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente al hapteno del primer anticuerpo; poner en contacto la muestra con un sustrato de la enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal y se colocaliza con la molécula diana; y detectar el precipitado de metal.

35 En algunos ejemplos, un precipitado de metal (por ejemplo, un metal en estado de oxidación 0) formado usando los procedimientos descritos en el presente documento se colocaliza con una molécula diana. Por ejemplo, el precipitado de metal se acumula a una distancia máxima de aproximadamente 5 μM de la molécula diana (por ejemplo, como máximo, aproximadamente 1 μm , 500 nm, 250 nm, 100 nm, 50 nm, 20 nm, 10 nm, 5 nm, 2 nm, 1 nm, o 0,5 nm de la molécula diana).

45 En algunos ejemplos, los procedimientos divulgados son procedimientos para detectar una molécula diana que es una proteína (por ejemplo, los procedimientos de IHC) y el anticuerpo que se une a la molécula diana es un anticuerpo que se une específicamente a uno o más epítomos en la proteína diana (en ocasiones se denomina anticuerpo "primario"). En otros ejemplos, los procedimientos divulgados son procedimientos para detectar una molécula diana que es una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, los procedimientos de ISH) y el anticuerpo que se une a la molécula diana es un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente a una sonda de nucleico marcada con hapteno, que se une específicamente a la molécula de ácido nucleico diana. Las moléculas diana se analizan en la Sección VI, más adelante

50 En realizaciones adicionales, los procedimientos divulgados en el presente documento pueden utilizarse junto con procedimientos de detección no metalográficos (por ejemplo, procedimientos de detección colorimétricos o fluorescentes) para detectar moléculas diana adicionales. En algunos ejemplos, diversos marcadores detectables que pueden detectarse por separado pueden conjugarse con diferentes moléculas de unión específicas (por ejemplo, anticuerpos) que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo multiplexado que puede proporcionar la detección de múltiples dianas en una muestra. Por ejemplo, los procedimientos divulgados en el presente documento pueden utilizarse para detectar una molécula diana (por ejemplo, una proteína diana o una molécula de ácido nucleico) en una muestra. La muestra también puede someterse a procedimientos colorimétricos, por ejemplo, usando un anticuerpo conjugado con una enzima que produce un cromógeno cuando se utiliza con un sustrato apropiado (por ejemplo, HRP con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) o AP con BCIP/nitrozol de tetrazolio (NBT)) para detectar una segunda molécula diana o posteriores. También se puede someter a la muestra a procedimientos de detección fluorescentes, por ejemplo, un anticuerpo conjugado con una molécula fluorescente (por ejemplo, fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas, rodaminas o puntos cuánticos) para detectar una segunda molécula diana o posteriores. Como alternativa, se podría someter a una muestra a procedimientos de detección colorimétricos y/o fluorescentes para detectar una o más moléculas diana, seguido de los procedimientos divulgados en el presente documento para detectar una molécula diana adicional. Un experto en la técnica puede

determinar el orden apropiado para la multiplexación (por ejemplo, en la mayoría de los ejemplos, IHC antes de ISH) utilizando procedimientos de rutina.

5 Los procedimientos descritos en el presente documento incluyen la detección del precipitado de metal (por ejemplo, el metal en estado de oxidación cero), por ejemplo, el precipitado de metal nucleado en la superficie de una nanopartícula en los conjugados de anticuerpo-nanopartícula incluidos en los procedimientos divulgados. El precipitado de metal puede detectarse visualmente, por ejemplo, mediante microscopía de campo claro. En algunos ejemplos, el uso del conjugado de anticuerpo-nanopartícula permite la detección y cuantificación de un número reducido de copias de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico presente en alrededor de 1-3 copias por célula) o una proteína de baja abundancia sin una etapa de amplificación de señal convencional (por ejemplo, amplificación de señal con tiramida, que normalmente es necesaria).

15 Un experto en la técnica apreciará que los modos de realización de los procedimientos divulgados en el presente documento para la detección de una o más moléculas diana pueden automatizarse. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de una serie de patentes de Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de Estados Unidos n.º 5.650.327; 5.654.200; 6.296.809; 6.352.861; 6.827.901; y 6.943.029, y las solicitudes publicadas de Estados Unidos n.º 2003/0211630 y 2004/0052685.

20 A. Conjugados de anticuerpo-enzima

Los procedimientos divulgados incluyen un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima. En algunos ejemplos, el anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima es un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo que, a su vez, se une a una molécula diana (a veces conocido como "anticuerpo secundario"). En otros ejemplos, el anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima es un anticuerpo que se une a una molécula diana o una sonda de ácido nucleico marcada con hapteno unida a una molécula de ácido nucleico diana (a veces conocido como "anticuerpo primario"). En otros ejemplos adicionales más, las una o más moléculas de enzima se conjugan con un anticuerpo anti-haptenos (por ejemplo, un anticuerpo anti-DNP, un anticuerpo anti-DIG, un anticuerpo anti-fluoresceína, un anticuerpo anti-biotina o un anticuerpo anti-benzofurazán).

30 La enzima conjugada al anticuerpo en los procedimientos divulgados es una enzima capaz de transformar un sustrato de enzima sin actividad redox para producir al menos un producto capaz de reducir iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero. En algunos ejemplos, la enzima puede ser una fosfatasa alcalina (AP), fosfatasa ácida, α -galactosidasa, α -lactamasa (por ejemplo, una cefalosporinasa o penicilinas), glucosidasa (por ejemplo, una α - o β -glucosidasa), o esterasa. El conjugado de enzima-anticuerpo incluye una o más moléculas de enzima (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más moléculas de enzima). En algunos ejemplos, el conjugado de enzima-anticuerpo incluye aproximadamente 2-10 moléculas de enzima, por ejemplo, aproximadamente 2-8 moléculas de enzima, por ejemplo de 3-5 moléculas de enzima. En ejemplos particulares no limitantes, el conjugado de enzima-anticuerpo incluye dos o tres moléculas de enzima. Los conjugados de anticuerpo-enzima y los procedimientos de producción de dichos conjugados son bien conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, la enzima se conjuga al anticuerpo con una molécula enlazadora (por ejemplo, un enlazador de maleimida) mediante la reacción de una molécula de maleimido-enzima con un anticuerpo reducido (por ejemplo, un anticuerpo que tiene al menos un tiol libre, por ejemplo, como mínimo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más tioles libres).

45 En modos de realización particulares descritos en el presente documento, la enzima es AP. En algunos ejemplos, la AP es una AP nativa (por ejemplo, AP intestinal, por ejemplo, AP intestinal o AP renal de ternera). La AP nativa se puede purificar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica y también está disponible comercialmente en muchas fuentes, incluyendo, pero sin limitación, BioZyme (BBI Enzymes, Madison, WI), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Worthington Biochemical (Lakewood, NJ) y US Biological (Swampscott, MA). En otros ejemplos, la AP es una AP recombinante, por ejemplo, una AP recombinante expresada y purificada a partir de un microorganismo (por ejemplo, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*). Los procedimientos para expresar y purificar la AP recombinante son bien conocidos en la técnica. La AP recombinante también está disponible comercialmente, por ejemplo, en Roche Applied Science (Indianapolis, IN), Worthington Biochemical (Lakewood, NJ) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). En un ejemplo particular, la AP se modifica con MAL-dPEGTM₁₂ NHS (Quanta Biodesign; Powell, OH) para producir una maleimido-AP y un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo) se reduce con DTT para producir un anticuerpo tiolado. La maleimido-AP y el anticuerpo tiolado se hacen reaccionar para producir un conjugado de AP-anticuerpo, que puede purificarse y utilizarse en los procedimientos divulgados.

60 Los procedimientos divulgados incluyen poner en contacto la muestra con un sustrato de enzima y un ion metálico, de tal manera que se forma un precipitado de metal. En ejemplos particulares, la muestra se pone en contacto con el sustrato de enzima y el ion metálico simultáneamente. En otros ejemplos, la muestra se pone en contacto con el sustrato de enzima y el ion metálico secuencialmente. Como se ha analizado anteriormente, las enzimas utilizadas en el conjugado de anticuerpo-enzima son las que son capaces de transformar un sustrato de enzima sin actividad redox para producir, al menos, una especie con actividad redox capaz de reducir iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero. Por tanto, el sustrato de la enzima es un sustrato que puede transformar la enzima concreta incluida en el conjugado de anticuerpo-enzima. En algunos ejemplos, la enzima es AP y el sustrato de la enzima es una molécula que incluye un fosfato que puede eliminar la fosfatasa alcalina, de modo que se genera una especie con actividad redox

capaz de reducir iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero. Entre los ejemplos de sustratos de la AP se incluyen, pero sin limitación, fosfatos de indolilo (por ejemplo, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP)), fosfato de ácido ascórbico, fosfato de α -tocoferol, fosfato de sesamol, fosfato de eugenol, y derivados de hidroquinona (por ejemplo, fosfato de hidroquinona, naftohidroquinona y antrahidroquinona). En la técnica se conocen sustratos adicionales de la AP (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 7.632.652 y 7.642.064). En algunos ejemplos, la muestra se pone en contacto con el sustrato de la enzima de aproximadamente de 0,1 mM a aproximadamente 100 mM (por ejemplo, de aproximadamente 0,4 mM a 75 mM, de aproximadamente 1 mM a 50 mM o de aproximadamente 2 mM a 20 mM). En un ejemplo particular, la muestra se pone en contacto con BCIP de aproximadamente 0,5 a 3 mM, por ejemplo, BCIP de 1 a 2 mM, por ejemplo BCIP aproximadamente 1,3 mM.

De manera similar, para otras enzimas, el sustrato es un compuesto sin actividad redox que la enzima puede transformar en, al menos, una especie con actividad redox capaz de reducir iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero. Por ejemplo, si la enzima es una P-galactosidasa, el sustrato puede ser un compuesto mono- o digalactósido (por ejemplo, digalactosilhidroquinona). Si la enzima es una \square -lactamasa, el sustrato puede ser un \square -lactama (por ejemplo, una C3' \square -lactama, por ejemplo, una cefalosporina). Si la enzima es una glucosidasa, el sustrato puede ser un monoglucósido o diglucósido y si la enzima es una esterasa, el sustrato puede ser un monoéster o diéster. Ejemplos particulares de sustratos de enzimas adecuados para los procedimientos descritos en el presente documento son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º n.º 7.632.652 y 7.642.064). Un experto en la técnica puede determinar sustratos para una enzima concreta y seleccionar sustratos concretos que producirán la especie con actividad redox.

Como se ha analizado anteriormente, los procedimientos divulgados incluyen un conjugado de enzima-anticuerpo, en el que la enzima transforma un sustrato en una especie con actividad redox capaz de reducir iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que el metal reducido forma un precipitado que se nuclea en la superficie de la nanopartícula presente en la muestra en forma de conjugado de anticuerpo-nanopartícula. Este precipitado o depósito de átomos metálicos aumenta el tamaño de la nanopartícula, que se puede detectar después, por ejemplo, utilizando un microscopio óptico. Los iones metálicos para los procedimientos descritos en el presente documento incluyen iones de plata, iones de oro, iones de cobre, iones de níquel, iones de platino, iones de paladio, iones de cobalto o iones de iridio. En los procedimientos descritos en el presente documento, la muestra se pone en contacto con un ion metálico, que puede estar en una solución. En ejemplos particulares, una sal de metal se disuelve en una solución. La sal de metal puede incluir un haluro de metal (por ejemplo, un cloruro de metal o fluoruro de metal), un nitrato de metal, un acetato de metal o un perclorato de metal. En otros ejemplos, la sal de metal puede incluir un sulfito de metal, fosfato de metal o carbonato de metal. En un ejemplo particular, la sal de metal es nitrato de plata.

En ejemplos particulares, los procedimientos divulgados en el presente documento utilizan un conjugado de anticuerpo-nanopartícula que incluye nanopartículas de oro y utilizan iones de plata, que se reducen a un átomo de plata y se depositan en la nanopartícula de oro. En algunos ejemplos, los iones de plata proceden de compuestos de plata (por ejemplo, acetato de plata, nitrato de plata, fluoruro de plata o perclorato de plata). En algunos ejemplos, la muestra se pone en contacto con una solución que incluye uno o más compuestos de plata de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M (por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a 500 mM o de aproximadamente 50 mM a 100 mM) durante aproximadamente 2 minutos a 90 minutos (por ejemplo, de aproximadamente 2 minutos a 60 minutos, de aproximadamente 4 minutos a 60 minutos o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos). En un ejemplo particular, la muestra se pone en contacto con nitrato de plata aproximadamente 50 mM durante aproximadamente 20 minutos.

B. Conjugados de anticuerpo-nanopartícula

Los procedimientos descritos en el presente documento utilizan un anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más nanopartículas). En algunos ejemplos, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula es uno descrito en el presente documento, en el que el conjugado de anticuerpo-nanopartícula incluye dos o más nanopartículas unidas directamente al anticuerpo mediante un enlace metal-tiol. En un ejemplo particular, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula es un conjugado que incluye de dos a cinco nanopartículas de oro por anticuerpo, por ejemplo, cinco nanopartículas de oro. En otros ejemplos, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula es cualquier conjugado de anticuerpo-nanopartícula conocido para un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.360.895, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2006/0246524.

Como se ha analizado anteriormente, en algunos ejemplos, la nanopartícula es una nanopartícula de metal (por ejemplo, una nanopartícula de oro, de paladio, de platino, de plata, de cobre, de níquel, de cobalto, de iridio, o una aleación de dos o más de los mismos). En algunos ejemplos, la nanopartícula conjugada al anticuerpo tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 200 nm (por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 5 nm). En ejemplos particulares, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 5 nm o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 nm, aproximadamente 4,5 nm, aproximadamente 4 nm, aproximadamente 3,5 nm, aproximadamente 3 nm, de aproximadamente 2,5 nm, de aproximadamente 2 nm, aproximadamente 1,5 nm, aproximadamente 1 nm, o aproximadamente 0,5 nm). En algunos

ejemplos de los procedimientos descritos en el presente documento, la muestra se pone en contacto con el conjugado de anticuerpo-nanopartícula de aproximadamente 10 nM a 2 μ M (por ejemplo, de aproximadamente 20 nM a 1,5 μ M, de aproximadamente 50 nM a 1 μ M o de aproximadamente 100 nM a 500 nM) durante de aproximadamente 4 minutos a 60 minutos (por ejemplo, de aproximadamente 8 minutos a 40 minutos, o de aproximadamente 16 minutos a 32 minutos). En un ejemplo particular, la muestra se pone en contacto con 100 nM de un conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro durante aproximadamente 32 minutos.

C. Acondicionado, amplificación y fijación

Los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen, opcionalmente, una etapa de "acondicionado" que incluye poner en contacto la muestra con un haluro de oro (por ejemplo, cloruro de oro). Históricamente, el acondicionado con oro se refiere al tratamiento de una muestra con cloruro de oro (con o sin ácido oxálico y tiosulfato) para proteger una capa de plata (por ejemplo, para microscopia inmunoelectrónica mejorada con plata). Véase, por ejemplo, Pohl y Stierhof, *Microsc. Res. Tech.* 42:59-65, 1998; Sawada y Esaki, *J. Histochem. Cytochem.* 48:493-498, 2000.

En ejemplos particulares de los procedimientos divulgados, la muestra se pone en contacto con un haluro de oro (por ejemplo, cloruro de oro), después de poner en contacto la muestra con el sustrato de la enzima y el ion metálico. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.632.652 y 7.642.064. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que el oro se reduce y oxida algunos de los átomos metálicos reducidos (por ejemplo, plata) que se depositan en la superficie de la nanopartícula del conjugado de anticuerpo-nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula de oro), que da como resultado un punto más oscuro (por ejemplo, el aumento de contraste y/o del tamaño de la señal). En algunos ejemplos, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 1 % (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 % a 0,8 %, de aproximadamente 0,1 % a 0,5 % o de aproximadamente 0,1 % a 0,2 %) de cloruro de oro durante aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 90 minutos (por ejemplo, de aproximadamente 2 minutos a 60 minutos, de aproximadamente 4 minutos a 60 minutos o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos). En un ejemplo particular, la muestra se pone en contacto con cloruro de oro al 0,2 % durante aproximadamente 4 minutos.

En algunos modos de realización, los procedimientos divulgados también incluyen opcionalmente una etapa de amplificación. La amplificación puede incluir poner en contacto la muestra con iones metálicos adicionales, proporcionando más iones metálicos para la reducción a metal en estado de oxidación cero y aumentando el precipitado de metal que se puede detectar. En algunos ejemplos, los procedimientos incluyen poner en contacto la muestra con el mismo ion metálico que el utilizado en el contacto de la muestra con el sustrato de enzima y el ion metálico. En algunos ejemplos, el ion metálico está en la forma de una sal metálica disuelta en una solución. La sal de metal puede incluir un haluro de metal (por ejemplo, un cloruro de metal o fluoruro de metal) o un nitrato de metal. En un ejemplo particular, el ion metálico es plata (por ejemplo, cuando la muestra se ha puesto en contacto previamente con un sustrato de enzima e iones de plata), por ejemplo en forma de uno o más compuestos de plata (por ejemplo, nitrato de plata). En algunos ejemplos, la muestra se pone en contacto con una solución que incluye uno o más compuestos de plata de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M (por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a 500 mM o de aproximadamente 50 mM a 100 mM) durante aproximadamente 2 minutos a 90 minutos (por ejemplo, de aproximadamente 2 minutos a 60 minutos, de aproximadamente 4 minutos a 60 minutos o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos). En un ejemplo particular, la muestra se pone en contacto con nitrato de plata aproximadamente 50 mM durante aproximadamente 4 minutos.

En realizaciones adicionales, los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen, opcionalmente, una etapa de fijación, que detiene la reacción de reducción del metal y elimina todos los iones metálicos no reducidos de la muestra. En algunos ejemplos, la fijación incluye poner en contacto la muestra con un agente reductor. En algunos ejemplos, los procedimientos incluyen poner en contacto la muestra con de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % de tiosulfato sódico (por ejemplo, de aproximadamente 0,0625 % a 4 %, de aproximadamente 0,1 % a 3 % o de aproximadamente 0,5 % a 2 %) durante aproximadamente 2 minutos a 90 minutos (por ejemplo, de aproximadamente 2 minutos a 60 minutos, de aproximadamente 4 minutos a 60 minutos o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos). En un ejemplo particular, la fijación incluye poner en contacto la muestra con aproximadamente 2 % de con tiosulfato de sodio durante aproximadamente 4 minutos.

V. Kits

En el presente documento se divulgan kits, que pueden utilizarse para llevar a cabo diversas realizaciones de los procedimientos divulgados. En algunos ejemplos, los kits incluyen un primer anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más nanopartículas), por ejemplo los conjugados de anticuerpo-nanopartícula divulgados en el presente documento. En ejemplos particulares, el primer anticuerpo se conjuga con una o más nanopartículas de oro, una o más nanopartículas de paladio, una o más nanopartículas de platino o una o más nanopartículas de oro-aleación de paladio. En algunos ejemplos, los kits también incluyen un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más moléculas de enzima), en los que el primer anticuerpo se une específicamente al segundo anticuerpo. En algunos ejemplos, el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo son anticuerpos anti-hapteno. En algunos ejemplos, el

anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas es un conjugado de anticuerpo-nanopartícula divulgado en el presente documento, por ejemplo un conjugado de anticuerpo-nanopartícula que incluye dos o más nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas de oro) directamente unidas al anticuerpo mediante un enlace metal-tiol. En un ejemplo específico, los anticuerpos se incluyen en recipientes separados.

En algunos ejemplos específicos, el kit incluye un primer anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nanopartículas) y un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de AP (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más, por ejemplo, 3 moléculas de AP), donde el primer anticuerpo se une específicamente al segundo anticuerpo. En algunos ejemplos, el segundo anticuerpo es un "anticuerpo primario" que se une específicamente a una molécula diana (por ejemplo, una proteína diana o un hapteno, donde una sonda marcada con haptenos se une a una molécula de ácido nucleico diana). En otros ejemplos, el segundo anticuerpo es un "anticuerpo secundario" que se une específicamente a un anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína diana o un hapteno, donde una sonda marcada con hapteno se une a una molécula de ácido nucleico diana).

El kit puede incluir, opcionalmente, componentes adicionales, por ejemplo, un sustrato para la enzima (por ejemplo, BCIP, si la enzima es AP) o una solución que incluye iones metálicos (por ejemplo, iones de plata, iones de oro, iones de cobre, iones de níquel, iones de platino, iones de paladio, iones de cobalto o iones de iridio). Además, el kit puede incluir componentes adicionales distintos de los reactivos identificados anteriormente, incluyendo, pero sin limitación, reactivos para etapas adicionales de los procedimientos divulgados, por ejemplo, reactivos para el acondicionamiento con oro (por ejemplo, cloruro de oro), amplificación con plata (por ejemplo, nitrato de plata) y/o de fijación (por ejemplo, tiosulfato de sodio). El kit también puede incluir anticuerpos (por ejemplo, uno o más anticuerpos primarios), sondas marcadas con haptenos u otros reactivos necesarios para la realización de IHC y/o ISH mediante los procedimientos divulgados en el presente documento. Cada componente de los kits divulgados puede proporcionarse en un recipiente separado. En algunos ejemplos, el kit puede incluir también muestras de control, por ejemplo, una o más muestras de control positivo (por ejemplo, una muestra que se sabe que expresa una diana en particular o que expresa una cantidad conocida o que tiene un número conocido de copias del gen de una diana en particular) o una o más muestras de control negativo (por ejemplo, una muestra que se sabe que expresa una diana en particular). En ejemplos particulares, los kits divulgados en el presente documento pueden usarse para detectar dianas en muestras de mamíferos que se sospecha que tienen un trastorno o enfermedad, por ejemplo, cáncer o una infección.

VI. Muestras y dianas

Las muestras incluyen componentes biológicos y generalmente se sospecha que incluyen (o incluso se sabe que incluyen) una o más moléculas diana de interés. Las moléculas diana pueden estar en la superficie de las células y las células pueden estar en una suspensión o en una sección de tejido (por ejemplo, una sección de tejido incluido en parafina). Las moléculas diana también pueden ser intracelulares y se detectan después de la lisis celular o la penetración de la célula por una sonda o anticuerpo. Un experto en la técnica apreciará que el procedimiento de detección de moléculas diana en una muestra variará dependiendo del tipo de muestra y de la sonda o anticuerpo utilizado. En la técnica se conocen procedimientos de preparación y recogida de muestras.

Las muestras usadas en los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo un tejido u otra muestra biológica, se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las muestras incluyen cualquier muestra sólida o fluida obtenida, excretada o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo, sin limitación, organismos unicelulares, por ejemplo, bacterias, levaduras, protozoos y amebas entre otros, organismos multicelulares (por ejemplo, plantas o animales). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un fluido biológico obtenido, por ejemplo, de sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, el líquido obtenido de un absceso o de cualquier otro sitio de infección o inflamación), o fluido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por la enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una muestra de biopsia o autopsia, por ejemplo, una biopsia de tumor) o un xenoinjerto o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o célula cultivada) o medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En modos de realización particulares, la muestra biológica incluye una sección de tejido (por ejemplo, la obtenida por biopsia) o una muestra de citología (por ejemplo, un frotis de Papanicolaou o un frotis de sangre).

Las muestras se pueden obtener de sujetos para el cribado de rutina o de sujetos que se sospecha que tienen un trastorno, por ejemplo, una infección, una anomalía genética o una neoplasia. Los procedimientos descritos también se pueden aplicar a las muestras que no tienen anomalías genéticas, enfermedades, trastornos, etc., que se conocen como muestras "normales". Dichas muestras normales son útiles, entre otras cosas, como controles para la comparación con otras muestras. Las muestras pueden analizarse para muchas finalidades diferentes. Por ejemplo, las muestras pueden usarse en un estudio científico o para el diagnóstico de una posible enfermedad.

Las muestras descritas en el presente documento se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido o desarrollado más adelante en la técnica. Generalmente, las muestras de tejido se preparan mediante fijación e inclusión del tejido en un medio. En otros ejemplos, las muestras incluyen una suspensión celular que se prepara como una monocapa sobre un soporte sólido (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) por ejemplo, mediante extensión o

centrifugado de las células sobre el soporte sólido. En ejemplos adicionales, en los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar secciones de tejido reciente congelado (por ejemplo, sin fijar).

5 En algunos ejemplos se utiliza un medio de inclusión. Un medio de inclusión es un material inerte en el que se incluyen los tejidos y/o las células para ayudar a preservarlos para futuros análisis. La inclusión también permite cortar láminas de las muestras de tejido en secciones finas. Los medios de inclusión incluyen parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plástico o acrílicos.

10 Muchos medios de inclusión son hidrófobos; por lo tanto, puede ser necesario eliminar el material inerte antes del análisis histológico o citológico, que utilizan principalmente reactivos hidrófilos. El término desparafinización o desparafinado se usa ampliamente en el presente documento para hacer referencia a la eliminación parcial o completa de cualquier tipo de medio de inclusión de una muestra biológica. Por ejemplo, las secciones de tejido incluidas en parafina se desparafinan pasándolas por disolventes orgánicos, por ejemplo, tolueno, xileno, limoneno u otros disolventes adecuados.

15 El procedimiento de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra de tejido conserva las células y los constituyentes del tejido en un estado lo más cercano posible a la vida y permite realizar procedimientos preparativos sin cambios significativos. La fijación detiene los procesos de autólisis y descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte celular y estabiliza los constituyentes celulares y del tejido de modo que sean capaces de soportar las etapas posteriores del procesamiento del tejido, por ejemplo, para IHC o ISH.

20 Los tejidos se pueden fijar mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo perfusión o inmersión en un fijador. Los fijadores se pueden clasificar en agentes de reticulación (por ejemplo, aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de reticulación no aldehídicos), agentes oxidantes (por ejemplo, iones y complejos metálicos, por ejemplo, tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro de mercurio, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, metacam, fluido de Bouin, fijador B5, fluido de Rossman y fluido de Gendre), microondas y otros fijadores (por ejemplo, excepto fijación en volumen y fijación con vapor). Los aditivos también pueden incluirse en el fijador, por ejemplo, tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (por ejemplo, cloruro de cinc, sulfato de cinc, y sales de litio) y lantano.

25 El fijador de uso más habitual en la preparación de muestras para IHC es el formaldehído, generalmente en forma de una solución de formalina (4 % de formaldehído en una solución tampón, conocida como formalina tamponada al 10 %). En un ejemplo, el fijador es formalina neutra tamponada al 10 %.

30 Las muestras pueden incluir múltiples dianas que se pueden unir específicamente mediante una sonda o anticuerpo o molécula indicadora. Las dianas pueden ser moléculas de ácido nucleico o proteínas. A lo largo de la presente divulgación, cuando se hace referencia a una proteína diana, se entiende que las moléculas de ácido nucleico asociadas a dicha proteína también se pueden utilizar como dianas. En algunos ejemplos, la diana es una proteína o molécula de ácido nucleico de un patógeno, por ejemplo, un virus, bacteria, o parásito intracelular, por ejemplo, de un genoma viral. Por ejemplo, una proteína diana se puede producir a partir de una secuencia de ácido nucleico diana asociado a (por ejemplo, correlacionada con, causalmente implicada en, etc.) una enfermedad.

35 Una molécula de ácido nucleico diana puede variar sustancialmente de tamaño. Sin limitación, la molécula de ácido nucleico puede tener un número variable de restos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico diana puede tener al menos aproximadamente 10 restos de ácido nucleico o al menos aproximadamente 20, 30, 50, 100, 150, 500, 1000 o más restos. En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico diana es una molécula de ácido nucleico "corta", por ejemplo, de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 20 kb (por ejemplo, de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 15 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 20 kb, o de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb). En ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico diana "cortas" incluyen secuencias del genoma viral, por ejemplo HPV o virus de hepatitis. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico diana es una molécula de ácido nucleico "larga", por ejemplo, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 500 kb (por ejemplo, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 300 kb, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente 200 kb, o de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 200 kb) o más. En ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico diana "largas" incluyen genes asociados a la transformación neoplásica, por ejemplo, EGFR, HER2, C-MYC, ABL, C-MET, TOP2A, BCL, p53 o RBI. La sonda (por ejemplo, una sonda marcada con haptenos) se puede unir a la molécula de ácido nucleico diana y proporcionar una señal detectable.

40 Una molécula de ácido nucleico diana también puede variar sustancialmente en lo que respecta al número de copias. Sin limitación, la molécula de ácido nucleico puede estar presente en un número variable de copias en una muestra concreta. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico diana puede estar presente en una muestra en aproximadamente 1 copia o, al menos, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 500, 1000 o más copias. En algunos ejemplos, una molécula de ácido nucleico diana es un ácido nucleico con un "número de copias bajo", por ejemplo, un ácido nucleico que está presente en de aproximadamente 1 a 100 copias por célula en la muestra, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 50 copias, de aproximadamente 1 a 20 copias, de aproximadamente 1 a 10 copias, o de aproximadamente de 1 a 3 copias. En ejemplos particulares, las moléculas de ácido nucleico con un número de

copias bajo incluyen HER2 y HPV. En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico diana es tanto una secuencia de ácido nucleico "corta" como un ácido nucleico con un número de copias bajo (por ejemplo, HPV).

5 Del mismo modo, una proteína o polipéptido diana pueden variar sustancialmente de tamaño. Sin limitación, la proteína o polipéptido diana incluirán al menos un epítipo que se une a una sonda o anticuerpo. En algunos modos de realización, la proteína o polipéptido pueden incluir al menos dos epítipos que se unen a una sonda o anticuerpo. La sonda o anticuerpo puede unirse al epítipo y proporcionar una señal detectable.

10 En ejemplos no limitantes específicos, una molécula de ácido nucleico diana o una proteína diana (por ejemplo, una proteína producida por un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ácido nucleico genómico diana)) está relacionada con una neoplasia (por ejemplo, un cáncer). En las células neoplásicas se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluidas translocaciones y otros reordenamientos, reduplicación o delección), especialmente en las células cancerosas, por ejemplo, leucemias de células B y de células T, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon, cánceres neurológicos y similares. Por lo tanto, en algunos ejemplos, al menos una parte de la molécula diana es una molécula de ácido nucleico o una proteína producida por una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico genómico diana) que está reduplicado o delecionado en al menos una subpoblación de células de una muestra.

20 Se sabe que los oncogenes son responsables de varias neoplasias malignas humanas. Por ejemplo, los reordenamientos cromosómicos que afectan al gen SYT situado en la región del punto de ruptura del cromosoma 18q1.2 son frecuentes entre los tumores de tejidos blandos de sarcoma sinovial. La translocación t(18q1.2) puede identificarse, por ejemplo, utilizando sondas con diferentes marcadores: la primera sonda incluye moléculas de ácido nucleico generadas a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende distalmente desde el gen SYT y la segunda sonda incluye ácido nucleico generado a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende 3' o próximal al gen SYT. Cuando las sondas que corresponden a estas secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico genómico diana) se usan en un procedimiento de hibridación *in situ*, las células normales, que carecen de una t(18q1.2) en la región del gen SYT, exhiben dos señales de fusión (generadas por los dos marcadores en proximidad estrecha), lo que refleja las dos copias intactas de SYT. Las células anormales con t(18q1.2) exhiben una única señal de fusión.

30 En otros ejemplos, se selecciona un ácido nucleico diana o una proteína diana (por ejemplo, una proteína producida por un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácido nucleico genómico diana)) que es un gen supresor de tumor que está delecionado (se ha perdido) en las células malignas. Por ejemplo, la región p16 (que incluye D9S1749, D9S1747, p16 (INK4A), p14 (ARF), D9S1748, p15 (INK4B) y D9S1752) localizada en el cromosoma 9p21 está delecionada en ciertos tipos de cáncer de vejiga. Las delecciones cromosómicas que implican a la región distal del brazo corto del cromosoma 1 (que abarca, por ejemplo, SHGC57243, TP73, EGFL3, ABL2, ANGPTL1 y SHGC-1322) y la región pericentromérica (por ejemplo, 19p13-19q13) del cromosoma 19 (que abarca, por ejemplo, MAN2B1, ZNF443, ZNF44, CRX, GLTSCR2 y GLTSCR1) son rasgos moleculares característicos de ciertos tipos de tumores sólidos del sistema nervioso central.

40 Los ejemplos mencionados anteriormente se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Los expertos en la técnica conocen numerosas anomalías citogenéticas que se correlacionan con la transformación y/o crecimiento neoplásico. Los ácidos nucleicos diana o las proteínas diana (por ejemplo, una proteína producida por un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ácido nucleico genómico diana)) que se han correlacionado con la transformación neoplásica y que son útiles en los procedimientos divulgados, también incluyen el gen del EGFR (7p12 por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000007, nucleótidos 55054219-55242525), el gen de C-MYC (8q24.21; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000008, nucleótidos 128817498-128822856), D5S271 (5p15.2), gen de la lipoproteína lipasa (LPL) (8p22; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000008, nucleótidos 19841058-19869049), RBI (13q14; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000013, nucleótidos 47775912-47954023), p53 (17p13.1; e.g., n.º de acceso en GENBANK™ NC_000017, complemento, nucleótidos 7512464-7531642), N-MYC (2p24; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000002, complemento, nucleótidos 151835231-151854620), CHOP (12q13; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000012, complemento, nucleótidos 56196638-56200567), FUS (16p11.2; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000016, nucleótidos 31098954-31110601), FKHR (13p14; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000013, complemento, nucleótidos 40027817-40138734), así como, por ejemplo: ALK (2p23; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000002, complemento, nucleótidos 29269144-29997936), cadena pesada de Ig, CCND1 (11q13; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000011, nucleótidos 69165054-69178423), BCL2 (18q21.3; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000018, complemento, nucleótidos 58941559-59137593), BCL6 (3q27; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000003, complemento, nucleótidos 188921859-188946169), MALF1, AP1 (1p32-p31; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000001, complemento, nucleótidos 59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000017, complemento, nucleótidos 35798321-35827695), TMPRSS (21q22.3; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000021, complemento, nucleótidos 41758351-41801948), ERG (21q22.3; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000021, complemento, nucleótidos 38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000007, complemento, nucleótidos 13897379-13995289), EWS (22q12.2; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000022, nucleótidos 27994271-28026505), FLI1 (11q24.1-q24.3; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000011, nucleótidos 128069199-128187521), PAX3 (2q35-q37; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000002, complemento, nucleótidos 222772851-222871944), PAX7 (1p36.2-p36.12; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000001, nucleótidos

18830087-18935219, PTEN (10q23.3; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000010, nucleótidos 89613175-89716382), AKT2 (19q13.1-q13.2; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000019, complemento, nucleótidos 45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000001, complemento, nucleótidos 40133685-40140274), REL (2p13-p12; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000002, nucleótidos 60962256-61003682) y CSFIR (5q33-q35; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC_000005, complemento, nucleótidos 149413051-149473128).

En otros ejemplos, un ácido nucleico diana o proteína diana se selecciona de un virus u otro microorganismo asociado a una enfermedad o afección. La detección del ácido nucleico diana derivado de virus o de microorganismo (por ejemplo, ácido nucleico genómico diana) o proteína diana en una muestra de célula o tejido es indicativa de la presencia del organismo. Por ejemplo, el ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína diana pueden seleccionarse del genoma de un virus oncogénico o patogénico, una bacteria o un parásito intracelular (por ejemplo, *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como especies de *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* y *Babesia*).

En algunos ejemplos, el ácido nucleico diana o proteína diana (por ejemplo, una proteína producida por un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácido nucleico genómico diana)) es de un genoma viral. Entre los ejemplos de virus y las correspondientes secuencias genómicas (n.º de acceso en GENBANK™ y RefSeq entre paréntesis) se incluyen adenovirus A humano (NC_001460), adenovirus B humano (NC_004001), adenovirus C humano (NC_001405), adenovirus D humano (NC_002067), adenovirus E humano (NC_003266), adenovirus F humano (NC_001454), astrovirus humano (NC_001943), poliomavirus BK humano (V01109; GI:60851) bocavirus humano (NC_007455), coronavirus 229E humano (NC_002645), coronavirus HKUI humano (NC_006577), coronavirus NL63 humano (NC_005831), coronavirus OC43 humano (NC_005147), enterovirus A humano (NC_001612), enterovirus B humano (NC_001472), enterovirus C humano (NC_001428), enterovirus D humano (NC_001430), eritrovirus V9 humano (NC_004295), virus espumoso humano (NC_001736), herpesvirus 1 humano (virus del herpes simple de tipo 1) (NC_001806), herpesvirus 2 humano (virus del herpes simple de tipo 2) (NC_001798), herpesvirus 3 humano (virus de varicela zóster) (NC_001348), virus del herpes simple humano de tipo 1 (virus de Epstein-Barr de tipo 1) (NC_007605), herpesvirus 4 humano de tipo 2 (virus de Epstein-Barr de tipo 2) (NC_009334), herpesvirus humano 5 cepa AD169 (NC_001347), herpesvirus humano 5 cepa Merlin (NC_006273), herpesvirus humano 6A (NC_001664), herpesvirus humano 6B (NC_000898), herpesvirus humano 7 (NC_001716), herpesvirus humano 8 tipo M (NC_003409), herpesvirus humano 8 tipo P (NC_009333), virus de la inmunodeficiencia humana 1 (NC_001802), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (NC_001722), metapneumovirus humano (NC_004148), virus del papiloma humano -1 (NC_001356), virus del papiloma humano -18 (NC_001357), virus del papiloma humano -2 (NC_001352), virus del papiloma humano -54 (NC_001676), virus del papiloma humano -61 (NC_001694), virus del papiloma humano -cand90 (NC_004104), virus del papiloma humano RTRX7 (NC_004761), virus del papiloma humano de tipo 10 (NC_001576), virus del papiloma humano de tipo 101 (NC_008189), virus del papiloma humano de tipo 103 (NC_008188), virus del papiloma humano de tipo 107 (NC_009239), virus del papiloma humano de tipo 16 (NC_001526), virus del papiloma humano de tipo 24 (NC_001683), virus del papiloma humano de tipo 26 (NC_001583), virus del papiloma humano de tipo 32 (NC_001586), virus del papiloma humano de tipo 34 (NC_001587), virus del papiloma humano de tipo 4 (NC_001457), virus del papiloma humano de tipo 41 (NC_001354), virus del papiloma humano de tipo 48 (NC_001690), virus del papiloma humano de tipo 49 (NC_001591), virus del papiloma humano de tipo 5 (NC_001531), virus del papiloma humano de tipo 50 (NC_001691), virus del papiloma humano de tipo 53 (NC_001593), virus del papiloma humano de tipo 60 (NC_001693), virus del papiloma humano de tipo 63 (NC_001458), virus del papiloma humano de tipo 6b (NC_001355), virus del papiloma humano de tipo 7 (NC_001595), virus del papiloma humano de tipo 71 (NC_002644), virus del papiloma humano de tipo 9 (NC_001596), virus del papiloma humano de tipo 92 (NC_004500), virus del papiloma humano de tipo 96 (NC_005134), virus de parainfluenza humano 1 (NC_003461), virus de parainfluenza humano 2 (NC_003443), virus de parainfluenza humano 3 (NC_001796), parechovirus humano (NC_001897), parvovirus 4 humano (NC_007018), parvovirus humano B19 (NC_000883), virus sincitial respiratorio humano (NC_001781), rinovirus A humano (NC_001617), rinovirus B humano (NC_001490), spumaretrovirus humano (NC_001795), virus linfotrópico T 1 humano (NC_001436), virus linfotrópico T 2 humano (NC_001488).

En determinados ejemplos, el ácido nucleico diana o proteína diana (por ejemplo, una proteína producida por un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácido nucleico genómico diana)) es de un virus oncogénico, por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (EBV) o un virus del papiloma humano (HPV, por ejemplo, HPV16, HPV18). En otros ejemplos, la proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómico diana) es de un virus patogénico, por ejemplo, un virus sincitial respiratorio, un virus de hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis C), un coronavirus (por ejemplo, el virus del SRAS), un adenovirus, un poliomavirus, un citomegalovirus (CMV) o un virus del herpes simple (HSV).

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de un conjugado de nanopartícula de oro-anticuerpo Síntesis de AuNP

Se introdujo agua (30 ml) a la que se había inyectado N_2 en un matraz de 500 ml de fondo redondo equipado con una gran barra de agitación ovalada y nitrógeno. A continuación, se añadieron 0,5 g (1,27 mmol) de $H AuCl_4$ al matraz de reacción y se agitó hasta que se solubilizó toda la sal. A continuación, se añadieron 30 ml de tolueno a la que se había inyectado N_2 ; seguido de 0,700 gramos del agente de transferencia de fases, bromuro de tetraoctilamonio (TOABr). La mezcla se agitó hasta que el ácido áurico se transfirió desde la fase acuosa a la fase orgánica. Una vez completada la transferencia de fase del ácido áurico, se añadieron 1,15 g de trifenilfosfina (TPP) y se agitaron enérgicamente hasta que apareció una suspensión blanca, momento en el que continuó la agitación durante 10-15 minutos. Toda la agitación se realizó a una velocidad que mezcló las capas acuosa y orgánica.

En un recipiente separado, se prepararon 0,72 g de $NaBH_4$ en 5 ml de agua y se agitaron suavemente hasta que se disolvió todo el agente reductor. La solución de $NaBH_4$ se añadió rápidamente al matraz de reacción con agitación rápida durante 3 horas. El sistema se cerró de forma estanca con un burbujeador para descargar el gas producido en esta reacción.

Al final de la reacción, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación y se separó la capa acuosa. La capa orgánica se lavó tres veces con 100 ml de agua o hasta que la capa acuosa estaba transparente. En caso de que se formara una emulsión, se añadiría salmuera o citrato trisódico para romperla.

El tolueno se evaporó a presión reducida (evaporador rotatorio) hasta que quedó un sólido negro. El material se resuspendió en hexanos (mediante lo cual se deshicieron los agregados) y se transfirió a una frita de vidrio sinterizado fina o media de 250 a 500 ml en un matraz Erlenmeyer de vacío. Los hexanos se retiraron por filtración del precipitado y se lavaron tres veces con 100 ml de hexanos. A continuación, el precipitado se lavó cinco veces con 100 ml de agua:metanol en una relación de 2:1, cinco veces con 100 ml de agua, cinco veces con 100 ml de agua:metanol en una relación de 3:2 y, después, cinco veces con 100 ml de agua. Se realizó un lavado final de cinco porciones de 100 ml de hexanos. Para la purificación adicional, los sólidos se transfirieron a un matraz y se volvieron a solvatar en 20 ml de diclorometano. Esto se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos y, a continuación, se añadieron lentamente hexanos hasta que se enturbió la solución. La solución se transfirió a tubos de centrifuga y se recogieron los sólidos a 2500 rpm. En caso necesario, esta solvatación y precipitación se realizó otra vez para purificar aún más el material.

El espectro de absorción UV-Vis se midió a 250-750 nm. La absorbancia a 520 nm se inspeccionó para determinar si había una banda pre-SPR. Esto indicó una nanopartícula a aproximadamente entre 1,5 nm y 2 nm. Se midió la absorbancia a 460 nm para determinar la concentración y la cantidad de muestra en solución utilizando el coeficiente de extinción de $64.000 \text{ (cm}^{-1}\text{)(M}^{-1}\text{)}$.

Conversión de AuNP en nanopartículas solubles en agua

Se añadieron AuNP (50 mg) a un matraz de 250 ml de fondo redondo equipado con una gran barra de agitación ovalada y una vía de nitrógeno. A continuación, se añadieron 20 ml de diclorometano y se agitaron hasta que los AuNP estaban en solución. Después, al matraz de reacción se añadieron 30 ml de agua a la que se había inyectado N_2 , seguido de 50 mg de bis-(sulfonatofenil)fenilfosfina (BSPP); la reacción se agitó enérgicamente durante al menos 24 horas. Si el material no se había transferido completamente a la fase acuosa, se añadieron otros 50 mg de BSPP y se agitó durante otras 24 horas.

Una vez estuvo el material en la fase acuosa, el contenido de la reacción se transfirió a un embudo de separación y se eliminó la capa orgánica. La fase acuosa se lavó con 20 ml de diclorometano y después se filtró a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$. Se eliminó el agua a presión reducida y se almacenó el nanomaterial a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Conjugación de AuNP con anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra

Se sacó del congelador el material de AuNP y se llevó a temperatura ambiente. Se introdujeron 5 mg en un tubo Eppendorf® de 2 ml y se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato (PB) 20 mM a pH 7,4. El material se sometió a ultrasonidos durante 2-3 minutos y, suavemente, se filtró a través de un filtro de jeringa de $0,2 \mu\text{m}$ para eliminar los agregados grandes. La solución eluida se pasó a través de una columna de exclusión por tamañodesalado de tamaño PD-10 (equilibrada con PB 20 mM a pH 7,4) para eliminar las moléculas pequeñas y las sales.

Se preparó una solución de ditiotreitól (DTT) mediante la adición de 7,7 mg de DTT a 100 μl de agua. A continuación, se introdujeron 1,5 mg de anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra en un tubo Eppendorf® de 2 ml y se añadieron 43,8 μl de solución de DTT y se mezclaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 minutos. La proteína reducida se separó del exceso de solución de DTT usando una columna de exclusión por tamaño-desalado de tamaño PD-10 (equilibrada con PB 20 mM a pH 7,4). Después, se recogieron diez fracciones de 500 μl y cada fracción se midió mediante absorción UV-Vis a 280 nm para determinar el contenido de proteína. Las fracciones que contenían proteína se combinaron y se añadieron a la solución de AuNP. La solución se mezcló suavemente a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

Se llevó a cabo una etapa de pre-purificación de filtración suave de la reacción de conjugación a través de un filtro de jeringa de $0,2 \mu\text{m}$ antes de la purificación final, que se realizó en un purificador AKTA SEC usando una columna de GE

Superdex® 200 usando PB 20 mM a pH 7,4. El cromatograma se ajustó para medir la absorbancia a 280 nm y 460 nm y se recogieron fracciones de 500 µl. Se recogieron las fracciones debajo del pico principal (FIG. 2A). Después de combinadas las fracciones, se realizó una filtración final a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm para una etapa de purificación final. Se efectuó absorción en el UV-Vis para caracterizar el material a 280 nm y 460 nm para cuantificar las proporciones de proteína y AuNP y las concentraciones finales de conjugado (FIG. 2B). El conjugado de anticuerpo-nanopartícula resultante incluyó aproximadamente 3,5 nanopartículas por anticuerpo.

Ejemplo 2

10 Síntesis de conjugados adicionales de nanopartícula-anticuerpo

Se sintetizaron nanopartículas de platino (PtNP) como se describe en el Ejemplo 1 para las AuNP, excepto que se substituyó el HAuCl₄ por tetracloroplatinato de potasio. También se sintetizaron nanopartículas de paladio (PdNP) como se describe en el Ejemplo 1 para las AuNP, excepto que se substituyó el HAuCl₄ por tetracloropaladato de sodio. Finalmente, se sintetizaron nanopartículas de oro-aleación de paladio (AuPdNP) como se describe en el Ejemplo 1 para las AuNP, excepto que se substituyó el HAuCl₄ por 0,25 g (0,64 mmol) de HAuCl₄ y 0,19 g (0,64 mmol) de Na₂PdCl₄. La purificación, el intercambio de ligandos y la conjugación con los anticuerpos para cada uno se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

20 Ejemplo 3

Síntesis y caracterización de conjugados de fosfatasa alcalina-anticuerpo

Se produjo un conjugado de AP-anticuerpo mediante reacción de maleimido-AP con un anticuerpo reducido. El número de moléculas de AP por enzima se varió ajustando la relación entre AP y el anticuerpo en la reacción.

La AP (BBI Enzymes, Madison, WI) se sometió a intercambio de tampones a través de una columna PD-10 equilibrada con tampón 1 de AP (Na₃PO₄ 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, pH 7,5) para eliminar el tampón Tris. A continuación, la AP se activó para la conjugación mediante el tratamiento con un exceso molar de 50-100 veces de éster NHS de MAL-dPEGTM₁₂ (éster de succinimidilo del ácido 1-maleinimido-3-oxo-77,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-4-azatritetracontan-43-oico, Quanta Biodesign, Powell, OH) a temperatura ambiente (23-25 °C) durante 60 minutos. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna de Superdex® 200 10/300 GL equilibrada con tampón 2 de AP (Tris-HCl 0,1M, MgCl₂ 1 mM, ZnCb 0,1 mM, pH 7,5) produjo la maleimido-AP purificada.

El anticuerpo anti-IgG de ratón, anti-IgG de conejo, anticuerpo de ratón anti-benzofurazán o anticuerpo de ratón anti-DNP se incubó con DTT 25 mM a temperatura ambiente (23-25 °C) durante 25 minutos. Después de la purificación a través de una columna PD-10 de desalado (NaOAc 0,1 M, pH 5, 0), se obtuvo anticuerpo sin DTT con de cuatro a ocho tioles libres.

El anticuerpo tiolado purificado se combinó con la maleimido-AP purificada en un exceso molar de tres veces de la maleimido-AP. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (23-25 °C) durante 16-18 horas. La SEC con una columna Superdex® 200 10/300 GL equilibrada con tampón 2 de AP produjo el conjugado de AP-anticuerpo purificado.

Para examinar los tipos de conjugados formados, se sintetizaron conjugados de AP-IgG con diferentes estequiometrías. En la síntesis se utilizaron relaciones de 1 de IgG:1 de AP a 1 de IgG:5 de AP. El conjugado de 1 IgG: 1 de AP se agregó completamente; se observó un precipitado. Cuando el sobrenadante se analizó mediante SEC, se observó un pico correspondiente a los materiales de gran tamaño no resueltos por la columna. Las relaciones 1 IgG: 2 AP y 1 IgG: 3 AP dieron algunos materiales agregados, pero mostraron un segundo pico cuando se aislaron y funcionaron excepcionalmente bien en la tinción de tejidos. Estos conjugados funcionaron igual o mejor que un conjugado de AP de control que es una relación de 1 IgG:1 AP (Ventana Medical Systems, n.º de catálogo: 253-4327). La relación 1 de IgG:3 de AP a 1 de IgG:5 de AP exhibió más fosfatasa alcalina sin reaccionar y funcionó de manera equivalente al conjugado 1 de IgG: 2 de AP cuando se analizó en tejidos.

Además de la variación de las estequiometrías entre AP e IgG, los conjugados se sintetizaron con una estequiometría diferente entre AP y éster de MAL dPEGTM₁₂ NHS(Mal). Una vez que han reaccionado con la IgG reducida, las reacciones se analizaron con SEC. Las reacciones de Mal 50X y 100X de IgG:3 de AP proporcionaron una mejor resolución y dieron menos material de partida de AP libre-Mal. Otras relaciones mostraron niveles aumentados de agregación y de complejos de AP-Mal sin reaccionar. En la tinción del tejido funcional, los conjugados de Mal IgG:3 AP 50X y 100X funcionaron mejor que el Mal en exceso 200X y 400X.

El tamaño hidrodinámico de los conjugados de IgG-AP se analizó mediante dispersión de luz dinámica. La biodistribución del tamaño de los conjugados se muestra en la Tabla 1. Esto demuestra que el conjugado de IgG-AP hecho con una estequiometría 1:3 es mayor y contiene más AP que el conjugado de AP de control.

65 Tabla 1. Análisis por dispersión de luz dinámica de los conjugados de IgG-AP

Muestra	Tamaño
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo	9,6 nm
Fosfatasa alcalina	7,6 nm
Conjugado de IgG-AP de control (1 IgG:1 AP)	15,95 nm
Anticuerpo de cabra antiIgG de conejo:3 AP (sin diluir)	21,73 nm
Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo:3 AP (diluido a la concentración del conjugado de control)	17,09 nm

Se realizó un ensayo de comparación de la actividad enzimática con tres conjugados de IgG-AP diferentes (dos lotes diferentes de IgG: 3 AP y un lote de IgG: 2 AP) y el conjugado de IgG-AP de control (1 IgG: 1 AP). La actividad enzimática se midió a 405 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU-530 UV/VIS, con 4- nitrofenilfosfato como sustrato (véase, por ejemplo, ThermoScientific n.º de cat. TR11103). El conjugado de IgG:3 AP tenía 2,3 veces más actividad enzimática que el conjugado de control. El conjugado de IgG:2 AP tenía mayor actividad que el conjugado de control, pero solo la mitad que el del conjugado de IgG:3 AP (Tabla 2). Los dos lotes de IgG:3 AP funcionaron de forma equivalente.

10 **Tabla 2. Ensayo de la actividad enzimática**

Muestra	Actividad enzimática (U/ml)
Conjugado de IgG-AP de control (1 IgG:1 AP)	4464
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo: 3 AP (lote 1)	10.414
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo: 3 AP (lote 2)	10.354
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo: 2 AP	5908

El rendimiento de la AP intestinal bovina nativa se comparó con la AP recombinante producida en *Pischia pastoris* (Roche Diagnostics, n.º de cat. 03 359 123 001). La AP recombinante tenía un menor número de isoenzimas y una N-glicosilación ligeramente diferente en comparación con la AP nativa. Tanto la AP nativa como recombinante se trataron con enlazador de MAL-dPEGTM₁₂ NHS y se purificaron con SEC. Los cromatogramas mostraron perfiles de retención y elución similares. Las AP modificadas con el enlazador se acoplaron después a un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón reducido con DTT. Los conjugados de AP-anticuerpo se purificaron mediante SEC y los perfiles de elución de los conjugados tanto nativos como recombinantes fueron similares. Una evaluación adicional del conjugado de AP recombinante-anticuerpo mediante tinción con ISH e IHC demostró una intensidad de señal y una especificidad similares en comparación con el conjugado de AP nativa-anticuerpo. Esto demuestra que la AP recombinante se puede utilizar como alternativa a la AP nativa convencional.

Los conjugados de IgG-AP se analizaron mediante SDS-PAGE nativa y reductora. El conjugado de IgG-AP de control migró como dos bandas principales (de aproximadamente 290 kDa y 530 kDa) en un gel Novex de Bis-Tris al 4-16 % (Invitrogen, n.º de cat. BN2111BX10), mientras que los conjugados de IgG-AP producidos como se ha descrito anteriormente migraron más lentamente con al menos dos bandas principales (de aproximadamente 450 kDa y 570 kDa) y una banda menor a aproximadamente 500 kDa (FIG. 3A). Los perfiles electroforéticos de los conjugados sintetizados con diferentes excesos molares del éster NHS de MAL-dPEGTM₁₂ fueron similares. El conjugado sintetizado con un exceso 2 molar de AP parecía haberse agregado en solución, a diferencia de los conjugados que se sintetizaron con un exceso 3 molar de AP (FIG. 3A). Esto fue consistente con los datos de la SEC (anteriormente).

Los conjugados también se analizaron en un gel reductor NuPAGE Novex SDS de Tris-acetato al 3-8 %. Similar a los resultados de la PAGE nativa, el control del conjugado de IgG-AP migró más rápido que los nuevos conjugados de AP. Los conjugados de IgG-AP sintetizados por los procedimientos actuales estaban representados por tres bandas principales con pesos moleculares que variaban de aproximadamente 430 a 710 kDa, en consonancia con la estequiometría de conjugación de 1 IgG: 2 AP (aproximadamente 430 kDa) 1 IgG:3 AP (aproximadamente 570 kDa), y 1 IgG:4 AP (aproximadamente 710 kDa) (FIG. 3B). Los perfiles electroforéticos de los conjugados sintetizados con diferentes excesos molares de éster NHS de MAL-dPEGTM₁₂ fueron similares. El conjugado sintetizado con AP recombinante se representó mediante una banda principal a aproximadamente 710 kDa. Esta diferencia puede deberse al diferente patrón de ramificación de la manosa de la AP recombinante, lo que puede facilitar la conjugación de más moléculas de AP por anticuerpo y/o crear una estructura secundaria muy estable.

El número de moléculas de AP por anticuerpo en el conjugado de AP-anticuerpo se determinó marcando el anticuerpo

5 con un marcador fluorescente. El anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo en tampón fosfato 20 mM (pH 7,4) se combinó con éster NHS de Alexa Fluor® 610 (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA) en DMSO y se rotó 12-15 horas a temperatura ambiente. El conjugado resultante se purificó usando una columna de exclusión por tamaño Superdex® 200 10/300 GL que se equilibró con tampón fosfato 20 mM (pH 7,4). El producto se diluyó en serie en tampón de fosfato y se tomaron lecturas en el UV a 280 y 610 nm. Se calculó el número de moléculas de Alexa Fluor® 610 por anticuerpo. La síntesis de los conjugados anticuerpo de cabra contra IgG de conejo-Alexa Fluor® se realizó dos veces; se calculó el número promedio de AP por anticuerpo y se calculó que era 3,15.

10 La conjugación del anticuerpo marcado con fluorescencia con AP se realizó como se ha descrito anteriormente, utilizando una relación de anticuerpo:AP de 1:2 o 1:3. Los conjugados se purificaron usando una columna Superdex® 200 10/300 GL y se calculó el número de AP por anticuerpo. El conjugado sintetizado con una relación 1:2 de anticuerpo:AP tenía 1,67 AP por anticuerpo. El conjugado sintetizado con una relación 1:3 de anticuerpo:AP tenía 2,6 AP por anticuerpo. Esto confirma que se pueden conjugar múltiples moléculas de AP con un anticuerpo y que el número se puede ajustar cambiando la estequiometría de los reactivos.

15

Ejemplo 4

Hibridación *in situ* utilizando conjugados de anticuerpo-nanopartícula de oro

20 Una evaluación del nuevo kit de detección de AP-plata frente a un sistema de detección de HRP se realizó utilizando una sonda del cromosoma 17 en líneas celulares de xenoinjerto. La tinción en portaobjetos se realizó en un Instrumento BenchMark® XT automatizado (Ventana Medical Systems, Inc. (VMSI)) usando portaobjetos con xenoinjerto con HER2 3-en-1 (N.º de cat. de VMSI 783-4332). Brevemente, los portaobjetos de tejido incluidos en parafina y fijados con formalina (FFPE) se calentaron a 75 °C durante 4 minutos, se trataron dos veces con EZPrep™ (10X, N.º de cat. de VMSI 950-102) y se cubrieron mediante la aplicación de cubreobjetos líquido (N.º de cat. de VMSI650-010). Después de cubrir, los portaobjetos de tejidos se calentaron a 76 °C durante 4 minutos, se aclararon con EZPrep™ y se volvió a aplicar cubreobjetos líquido para la desparafinización de los tejidos. El portaobjetos se enfrió a 37 °C, se incubó durante 4 minutos y se aclaró con tampón de reacción (10X, N.º de cat. de VMSI 950-300).

30 Una vez aclarado con tampón de reacción, los portaobjetos de tejidos se calentaron a 95 °C y se pretrataron con solución de acondicionado celular n.º 1 (CC1, N.º de cat. de VMSI 950-124) para los ciclos de 8, 12 y 8 minutos, donde el cubreobjetos líquido se aplicó entre cada aplicación de CC1/ciclo. Después de completar un ciclo con CC1, los portaobjetos se calentaron a 37 °C, se incubaron durante 4 minutos y se aclararon una vez con tampón de reacción. Las muestras de tejido se trataron con proteasa mediante la aplicación de ISH-Proteasa 3 (N.º de cat. de VMSI 780 a 4.149) durante 4 minutos, se aclararon con tampón de reacción para eliminar la proteasa y, finalmente, se aclararon con SSC (10X, N.º de cat. de VMSI 950-110).

40 A los portaobjetos de tejido tratados con proteasa se añadió solución de detección de hibridación *in situ* con plata (VMSI, kit de detección ultraView™ SISH n.º 780-001), los portaobjetos se incubaron durante 4 minutos y la sonda de ADN marcada con HER2 DNP (N.º de cat. de VMSI 780-4332) o la sonda del cromosoma 17 (Chr1 7) (N.º de cat. de VMSI 780-4331) se aplicó al portaobjetos adecuado. Después de la aplicación de la sonda, los portaobjetos se incubaron durante 4 minutos, seguidos de la desnaturalización del ácido nucleico a 95 °C durante 12 minutos. Después se aplicó el cubreobjetos líquido sobre los portaobjetos y se dejó que se produjera la hibridación durante 2 horas a 52 °C (sonda de HER2) o 44 °C durante 2 horas (sonda de Chr17).

45

Después de la hibridación, los portaobjetos se aclararon en SSC, se lavaron tres veces a 72 °C durante 8 minutos cada uno usando 2X SSC, momento en el cual se detuvo el calentamiento de los portaobjetos y se dejó enfriar los portaobjetos. Una vez enfriados, los portaobjetos se aclararon en tampón de reacción y se calentaron a 37 °C durante 4 minutos, después de lo cual se aplicó anticuerpo de conejo anti-DNP (N.º de cat. de VMSI780-4335), los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos líquido y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Después de la incubación, los portaobjetos se aclararon dos veces con tampón de reacción, se aplicaron 15 µg/ml de conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina (Ejemplo 3) y los portaobjetos se incubaron otros 32 minutos a 37 °C. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron cuatro veces con tampón de reacción. A continuación, se aplicó conjugado de anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra 100 nM-nanopartícula (ejemplo 1) y los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante otros 32 minutos antes de lavar tres veces con tampón de Tris-acetato 0,1 M a pH 9,0.

55

60 Para detectar los acontecimientos de hibridación sonda/diana, se añadió nitrato de plata 50 mM y BCIP 1,3 mM a los portaobjetos y los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante 20 minutos después de cubrir con cubreobjetos líquido. El acondicionado con oro se realizó mediante lavado de los portaobjetos dos veces en tampón Tris, aplicación de aproximadamente 100 µl de solución al 0,2 % de cloruro de oro, cubreobjetos e incubación de los portaobjetos durante 4 minutos a 37 °C. Los portaobjetos se aclararon dos veces en tampón Tris, se volvió a aplicar nitrato de plata, se aplicó el cubreobjetos líquido y los portaobjetos se incubaron durante 4 minutos adicionales para efectuar la amplificación de la señal. Después de un lavado adicional con tampón Tris, la deposición de la señal de detección se fijó mediante la aplicación de tiosulfato de sodio a los portaobjetos. Tras una incubación de 4 minutos con tiosulfato de sodio, los portaobjetos se aclararon en tampón de reacción y se realizó tinción de contraste mediante la aplicación y la incubación con hematoxilina Hematoxylin II (N.º de cat. de VMSI 790 a 2208) y cubreobjetos líquido durante 4 minutos. Se añadió

65

Bluing Reagent (N.º de cat. de VMSI 760-2037) después de lavar la hematoxilina II y el cubreobjetos líquido de los portaobjetos y después de unos 4 minutos adicionales de incubación se terminó la tinción de contraste.

5 Una vez completadas la tinción y la tinción de contraste, se retiraron los portaobjetos del instrumento, se lavaron con detergente, se deshidrataron a través de una serie graduada de soluciones de alcohol y xileno, se aplicó un cubreobjetos sólido al porta y, finalmente, se vieron los portaobjetos al microscopio de campo claro.

10 Los portaobjetos teñidos se analizaron para determinar la tinción de fondo/no específica, la intensidad de la señal y la sensibilidad. En ambos casos, la detección de plata utilizando el conjugado de anticuerpo-nanopartícula de oro sintetizado como en el Ejemplo 1 y el conjugado de IgG-AP sintetizado como en el Ejemplo 3 exhibieron una mayor intensidad de la señal con niveles de fondo iguales a los del sistema de detección de HRP convencional (FIG. 4). Los dos sistemas también se compararon usando tejido de carcinoma de mama con las sondas HER2 y del cromosoma 17. En el caso de la sonda del cromosoma 17, se observó una alta calidad de detección, intensidad de la señal y claridad similares en el carcinoma de mama y en los xenoinjertos. Para la sonda de HER2, el nuevo procedimiento superó al sistema de detección de HRP convencional con un mayor número de células detectadas y una mayor intensidad de la señal sin fondo apreciable (FIG. 5).

20 Para determinar el efecto del conjugado de anticuerpo-nanopartícula en la tinción de tejidos, los xenoinjertos Calu se tiñeron para la sonda de ácido ribonucleico HER2 con y sin el conjugado de anticuerpo-nanopartícula en un sistema de SISH con AP. La tinción del portaobjetos se realizó en un Instrumento XT BenchMark® automatizado. Brevemente, los portaobjetos que contenían tejido Calu 3 FFPE se calentaron a 75 °C durante 4 minutos, se trataron dos veces con EZPrep™, y se cubrieron mediante la aplicación de cubreobjetos líquido. Después de cubrir, los portaobjetos de tejidos se incubaron a 75 °C durante 16 minutos, se aclararon con EZPrep™ y se volvió a aplicar cubreobjetos líquido para la desparafinización de los tejidos. Los portaobjetos se enfriaron a 37 °C, se incubaron durante 4 minutos y se aclararon con SSC. Se aplicó una gota (aproximadamente 100 µl) de reactivo RiboPrep™ (VMSI, RiboMap® Kit n.º de cat. 760-102) a los portaobjetos, se aplicó el cubreobjetos líquido y los portaobjetos se incubaron durante 32 minutos a 37 °C. Después de la incubación, los portaobjetos se aclararon en EZPrep™, se aplicó RiboClear™ (aproximadamente 100 µl, un componente de RiboMap® Kit) y los portaobjetos se incubaron otros 12 minutos a 37 °C después de la aplicación de cubreobjetos líquido.

30 El tampón de reacción se utilizó para aclarar los portaobjetos dos veces, se volvió a aplicar el cubreobjetos líquido y los portaobjetos se incubaron a 90 °C durante 8 minutos, después de lo cual se aclararon los portaobjetos y se aplicó ISH-Proteasa 3 una vez enfriada la temperatura a 37 °C y los portaobjetos se incubaron durante 4 minutos. Después de la digestión de la proteasa, los portaobjetos se aclararon tres veces con tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de sonda de ARN marcada con DNP para HER2 junto con solución de hibridación de detección de SISH, los portaobjetos se incubaron durante 12 minutos a 80 °C y se aplicó un cubreobjetos líquido y se dejó proceder la hibridación durante 6 horas a 65 °C. Después de la hibridación, los portaobjetos se enjuagaron con EZPrep™ y se realizaron tres lavados rigurosos de 0,1 X SSC a 8 minutos por lavado a 75 °C. Después de los lavados, los portaobjetos se aclararon en EZPrep™ y se aplicaron aproximadamente 100 µl de RiboFix™ (un componente de RiboMap® Kit), se aplicó el cubreobjetos líquido y los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante 32 minutos.

45 Se aplicaron a los portaobjetos aproximadamente 100 µl (1 gota) de anticuerpo de conejo anti-DNP, seguido de cubreobjetos líquido, que se incubaron a 37 °C durante 20 minutos adicionales, punto en el que los portaobjetos se lavaron dos veces en tampón de reacción, se aplicaron 15 µg/ml de conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina recombinante (Ejemplo 3), los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos líquido y la incubación tuvo lugar a 37 °C durante 32 minutos. Después de lavar los portaobjetos tres veces en tampón de reacción, se aplicó el conjugado de anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-nanopartícula de oro 100 nM (Ejemplo 1) y la incubación continuó durante otros 32 minutos. Los portaobjetos se lavaron en tampón Tris 0,1 M a pH 9,0, se aplicaron nitrato de plata y BCIP, se aplicó el cubreobjetos líquido y la incubación procedió durante 32 minutos. Se aplicaron cloruro de oro y cubreobjetos líquido después de lavar los portaobjetos con tampón Tris, seguido de 4 minutos de incubación. Después de dos lavados de tampón Tris, se volvió a aplicar nitrato de plata, así como cubreobjetos líquido y los portaobjetos se incubaron 4 minutos más, seguido de un lavado con tampón Tris. Se aplicaron tiosulfato de sodio y cubreobjetos líquido, los portaobjetos se incubaron durante 4 minutos, se lavaron con tampón de reacción, se sometieron a tinción de contraste con hematoxilina II, se lavaron y se cubrieron con cubreobjetos para el análisis final con microscopía de campo claro.

60 La tinción de tejidos mostró que cuando el conjugado de anticuerpo-nanopartícula estaba ausente del sistema de detección, la señal era difusa y contenía una tonalidad marrón, dificultando la observación de la señal. Era necesario un aumento mayor para observar la señal y la tinción sin el conjugado de anticuerpo-nanopartícula no detectó todas las señales positivas en el tejido. Sin embargo, cuando el conjugado de anticuerpo-nanopartícula se incluyó en el sistema de detección, la señal se hizo nítida y negra. Más células eran positivas y eran más fáciles de diferenciar basándose en el contraste nítido proporcionado por la señal negra y en las señales producidas por la mayor sensibilidad (FIG. 6). Por lo tanto, el conjugado de anticuerpo-nanopartícula mejoró significativamente la sensibilidad del sistema de detección basado en AP y el sistema pudo usarse para detectar ribosondas.

65 Los experimentos anteriores con la sonda de HER2 mostraron la presencia de fondo en el núcleo de la célula (conocido

como "polvo"). Para determinar si este fondo se debía a la sonda de HER2 o al sistema de detección con AP-plata, la rigurosidad de la temperatura de lavado se aumentó y varió de 68 °C a 77 °C, 82 °C y 87 °C. A medida que la temperatura de los lavados aumentaba, la formación de polvo se disipó, lo que implica que la sonda de HER2 contenía una gran cantidad de secuencias no específicas marcadas con DNP que se hibridaron con el ADN y causaron el fondo. Esto apoya aún más el aumento de la sensibilidad del sistema de detección con AP-plata. El sistema de detección con AP-plata fue capaz de detectar estas pequeñas secuencias haptenadas que estaban unidas no específicamente. Aunque el aumento de la temperatura redujo la cantidad de polvo observado, hizo que algunas sondas unidas específicamente se separaran de su secuencia diana. Un aumento en la temperatura durante los lavados de rigurosidad puede aliviar de este modo la tinción de fondo y no específica, pero también puede disminuir la señal específica.

Ejemplo 5

Comparación bioestadística de SISH con anticuerpo-nanopartícula e ISH con HRP

Se usaron treinta casos de cáncer de mama para comparar el sistema de detección con AP-plata divulgado con el kit de SISH con HRP actual. Se evaluaron secciones en serie de cada caso tanto para HER2 como para el cromosoma 17 (Chr17) usando el sistema de detección con AP-plata y el kit de detección de SISH con HRP como se describe en el Ejemplo 4. Una vez teñidos los portaobjetos y cubiertos con cubreobjetos, fueron evaluados a ciegas por dos lectores de portaobjetos expertos diferentes. Se instruyó a los lectores a que enumeraran los recuentos de copias de HER2 y Chr17 a través del "procedimiento *cowboy*", que requiere que el lector estime el número medio de copias para cada sonda que se está observando. Estos números se registraron y se utilizaron para el análisis. Si la señal era demasiado escasa o si el tejido observado no podía enumerarse, se consideró que la tinción del tejido era inadecuada.

Las puntuaciones de la muestra de tejido para cada lector se muestran en las FIG. 7A y B (Chr1 7) y las FIG. 8A y B (HER2). Los resultados se utilizaron para calcular la relación de copias de HER2/Chr1 7. Si la relación de copias era mayor que o igual a 2, la muestra se consideró HER2 positiva. Si la muestra de HER2 o Chr17 se consideró inadecuada, la relación también se consideró inadecuada. Los resultados se tabularon para mostrar la distribución del estado de HER2 determinado por los dos lectores (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Tabla de concordancia de los resultados del Lector 1

		Detección con Ag y AP			
		Inadecuada	Negativa	Positiva	Total
SISH con HRP	Inadecuada	10	4	3	17
	Negativa	1	4	0	5
	Positiva	1	0	7	8
	Total	12	8	10	30

La Tabla 3 muestra que Lector 1 fue capaz de interpretar las muestras teñidas con el sistema de detección con AP-plata que se consideraban inadecuadas cuando se tiñeron con el kit de SISH con HRP. Siete casos que eran inadecuados para la SISH con HRP pudieron determinarse con el sistema de detección con AP-plata, mientras que sólo dos casos que eran inadecuados para el sistema de detección con AP-plata pudieron analizarse con el kit de SISH con HRP.

Tabla 4. Tabla de concordancia de los resultados del Lector 2

		Detección con Ag y AP			
		Inadecuada	Negativa	Positiva	Total
SISH con HRP	Inadecuada	13	1	0	14
	Negativa	1	7	2	10
	Positiva	0	0	6	6
	Total	14	8	8	30

La Tabla 4 muestra que Lector 2 interpretó los portaobjetos teñidos con cada sistema de una forma casi idéntica, a excepción de 2 casos, que dieron un resultado negativo con la SISH con HRP, pero positivo con el sistema de detección con AP-plata. En cada caso, la discordancia se puede atribuir al procedimiento "*cowboy*" que se le impuso al lector para leer el portaobjetos. Este procedimiento se basa en un enfoque más liberal de calcular el número medio de copias haciendo que el lector calcule el número de cabeza. Por otra parte, no hay ninguna garantía de que los lectores utilizaran exactamente la misma área del tejido al dar sus puntuaciones.

Las puntuaciones dadas por cada lector para cada sistema de detección se tabularon para comprobar la reproducibilidad de los resultados entre los dos lectores diferentes. La Tabla 5 muestra que hubo un desacuerdo entre los lectores al observar las muestras de tejido que se tiñeron con SISH con HRP ($\kappa = 0,5213$). Los lectores

coincidieron más en su puntuación cuando se utilizó el sistema de detección con AP-plata (Tabla 6, kappa = 0,6429).

Tabla 5. Comparación de las puntuaciones de SISH con HRP entre los lectores

		Lector 2			
		Inadecuada	Negativa	Positiva	Total
Lector 1	Inadecuada	12	3	2	17
	Negativa	0	5	0	5
	Positiva	2	2	4	8
	Total	14	10	6	30

5

Tabla 6. Comparación de las puntuaciones de detección con AP-plata entre los lectores

		Lector 2			
		Inadecuada	Negativa	Positiva	Total
Lector 1	Inadecuada	10	2	0	12
	Negativa	1	6	1	8
	Positiva	3	0	7	10
	Total	14	8	8	30

Ejemplo 6

10

Hibridación *in situ* utilizando conjugados de anticuerpo-nanopartícula de aleación de oro y paladio

15

La hibridación *in situ* de HER2 se llevó a cabo como en el Ejemplo 4, excepto que las muestras de tejido mamario o de la línea celular de cáncer de mama ZR-75-1 se incubaron con conjugado de AuNP-anticuerpo 100 nM, conjugado de AuPdNP-anticuerpo 100 nM o conjugado de AuPdNP-anticuerpo 50 nM. La tinción de HER2 utilizando el conjugado de AuPdNP-anticuerpo era específica, pero era más débil que la obtenida utilizando el conjugado de AuNP-anticuerpo (FIG. 9A-F).

Ejemplo 7

20

Inmunohistoquímica utilizando conjugados de anticuerpo-nanopartícula de oro

25

Una evaluación del nuevo sistema de detección con AP-plata frente a un sistema de detección con HRP se realizó en tejido de carcinoma de mama usando diversos biomarcadores de proteínas. La evaluación se llevó a cabo en muestras de tejido de carcinoma ductal infiltrante de mama. Se usaron anticuerpos anti-receptor de estrógenos (ER), anti-Ki-67, y anti-receptor de progesterona (PR) como anticuerpos primarios en el protocolo sin acondicionado con oro.

30

La tinción de portaobjetos se realizó en un Instrumento XT BenchMark® automatizado como se describe en el Ejemplo 4, a excepción de los siguientes cambios. Después de la desparafinización, se sometió a los portaobjetos a acondicionado celular estándar con CC1, de tal manera que se sometió a los portaobjetos a una serie de 13 repeticiones de cubreobjetos de CC1/líquido a 100 °C, después de lo cual se dejó que los portaobjetos se enfriaran durante 3 minutos y se aclararon en tampón de reacción tres veces. Se añadieron anticuerpos primarios a los portaobjetos apropiados para la identificación de las proteínas diana: anticuerpo de conejo anti-Ki67 (SPI; N.º de cat. de VMSI 790-4325), anticuerpo de conejo anti-ER (SPI; N.º de cat. de VMSI 790-4325), anticuerpo de conejo anti-PR (1E2, N.º de cat. de VMSI 790-4296), anticuerpo de conejo anti-HER2 (4B5, N.º de cat. de VMSI 790-2991) en muestras de tejido mamario y anticuerpo de conejo anti-BCL2 (N.º de cat. de VMSI760-4240) en tejido de las amígdalas y los portaobjetos se incubaron durante 16 minutos a 37 °C después de la aplicación de cubreobjetos líquido.

40

Después de lavar los portaobjetos con tampón de reacción dos veces, se añadieron 15 µg/ml de conjugado de anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-fosfatasa alcalina recombinante (Ejemplo 3) a los portaobjetos. Seguidamente se aplicó cubreobjetos líquido y se incubaron durante 16 minutos a 37 °C. A continuación, se aplicó conjugado de anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-nanopartícula de oro 100 nM (ejemplo 1) como en el ejemplo 4. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron dos veces en tampón Tris acetato 0,1 M a pH 9,0, a continuación, se aplicaron nitrato de plata y BCIP, se volvió a aplicar cubreobjetos líquido y los portaobjetos se incubaron 16 minutos adicionales. Los portaobjetos se lavaron, se acondicionó el oro con cloruro de oro, se fijó con tiosulfato de sodio (excepto para las muestras mostradas en la FIG. 10) y se realizó tinción de contraste con hematoxilina II como se ha descrito anteriormente. Para la tinción de contraste rojo, se incubó Fast Red nuclear (N.º de cat. de VMSI 280-2119) en los portaobjetos adecuados durante 4 minutos. Los portaobjetos se deshidrataron, se cubrieron con cubreobjetos y se prepararon para visualizar con microscopía de campo claro.

50

Todas las muestras mostraron una buena cantidad de señal, aunque había cierta turbidez de fondo (FIG. 10). Se usaron anticuerpos anti-HER-2/neu, anti-ER, anti-Ki-67 y anti-PR como anticuerpos primarios en el protocolo, incluyendo las etapas de acondicionamiento con oro y de fijación. Se observó una señal específica para todos los anticuerpos primarios (FIG. 11). La etapa de acondicionamiento con oro mejoró significativamente la calidad de la tinción al eliminar la neblina de fondo e intensificar la señal.

El novedoso sistema de detección con plata-AP también se evaluó en tejido de carcinoma de mama con una expresión baja de PR. El nuevo sistema se comparó con el kit de detección iView™ DAB (VMSI, n.º de cat. 760-091), usando anticuerpo anti-PR(16) como anticuerpo primario. El nuevo sistema ha demostrado una mayor sensibilidad sin fondo apreciable.

Por último, el novedoso sistema de detección con AP-plata se evaluó en tejido de las amígdalas. El nuevo sistema se comparó con el kit de detección iView™ DAB, usando anticuerpo anti-Bcl-2 como anticuerpo primario (FIG. 12). Se utilizaron tinciones de contraste tanto con Fast Red como con Bluing/hematoxilina con el sistema de detección de AP-plata.

Ejemplo 8

Inmunohistoquímica utilizando conjugados de anticuerpo-nanopartícula de aleación de oro y paladio

La inmunohistoquímica se realizó como en el ejemplo 7, a excepción de que las muestras de tejido se incubaron con conjugado de AuNP-anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra 100 nM, conjugado de AuPdNP-anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra 100 nM o conjugado de AuPdNP-anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra 50 nM o conjugado de AuPdNP-anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra 50 nM. La tinción con conjugado de anticuerpo-AuPdNP 100 nM o 50 nM era detectable, pero no tan fuerte como la que se obtiene utilizando el conjugado de AuNP-anticuerpo. La tinción no fue detectable cuando se utilizó conjugado de AuPdNP-anticuerpo 10 nM.

Ejemplo 9

Procedimientos de inmunohistoquímica de ejemplo

Este ejemplo proporciona procedimientos de ejemplo para IHC utilizando los procedimientos divulgados, incluyendo el uso de conjugados de anticuerpo-nanopartícula. Un esquema del procedimiento se muestra en la FIG. 1A. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que los procedimientos que se desvían de estos procedimientos específicos también se pueden utilizar para llevar a cabo con éxito procedimientos de IHC usando conjugados de anticuerpo-nanopartícula.

Se preparan muestras de tejido para IHC, incluyendo desparafinización y recuperación del antígeno y/o digestión con proteasas utilizando procedimientos convencionales. La muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario que se une específicamente a una proteína diana (por ejemplo, HER2/neu), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (por ejemplo, un anticuerpo secundario conjugado con tres moléculas de AP). A continuación, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas de oro; el anticuerpo es uno que se une específicamente al anticuerpo secundario. A continuación, la muestra se pone en contacto con un sustrato de AP (por ejemplo, BCIP), seguido de un compuesto de plata (por ejemplo, nitrato de plata). Después, se somete a la muestra a acondicionamiento con oro (por ejemplo, tratamiento con cloruro de oro), seguido de fijación de la señal con un agente reductor (por ejemplo, tiosulfato de sodio). La proteína diana se puede detectar mediante la detección del precipitado de metal formado mediante la deposición de átomos de plata en el sitio de la nanopartícula de oro. El precipitado de metal se puede detectar, por ejemplo, mediante microscopía de campo claro, donde aparece como un depósito negro.

Ejemplo 10

Procedimientos de hibridación *in situ* de ejemplo

Este ejemplo proporciona procedimientos de ejemplo para ISH utilizando los procedimientos divulgados, incluyendo el uso de conjugados de anticuerpo-nanopartícula. Un esquema del procedimiento se muestra en la FIG. 1B. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que también se pueden utilizar procedimientos que se desvían de estos procedimientos específicos para llevar a cabo con éxito procedimientos de ISH usando conjugados de anticuerpo-nanopartícula.

Se preparan muestras de tejido para ISH, incluyendo desparafinización y digestión con proteasas utilizando procedimientos convencionales. La muestra se pone en contacto con una sonda marcada con hapteno que se une específicamente a la molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, HER2/neu), seguido de lavados de rigurosidad adecuada. A continuación, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario que se une específicamente al hapteno (por ejemplo, dinitrofenilo), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (por ejemplo, un anticuerpo secundario conjugado con tres moléculas de AP). Después, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo conjugado con una o más nanopartículas de oro; el anticuerpo es uno que se une específicamente al

anticuerpo secundario. A continuación, la muestra se pone en contacto con un sustrato de AP (por ejemplo, BCIP), seguido de un compuesto de plata (por ejemplo, nitrato de plata).

5 A continuación, la muestra se somete a acondicionado con oro (por ejemplo, tratamiento con cloruro de oro), seguido de la amplificación de la señal (por ejemplo, mediante tratamiento con un compuesto de plata, por ejemplo, nitrato de plata) y fijación de la señal con un agente reductor (por ejemplo, tiosulfato de sodio). La molécula de ácido nucleico diana se puede detectar mediante la detección del precipitado de metal formado mediante la deposición de átomos de plata en el sitio de la nanopartícula de oro. El precipitado de metal se puede detectar, por ejemplo, mediante microscopia de campo claro, donde aparece como un depósito negro.

10 En vista de las muchas posibles realizaciones a las que se pueden aplicar los principios de la divulgación, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas solo son ejemplos y no se tomarán como limitantes del alcance de la invención, sino que el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una molécula diana en una muestra, que comprende:
- 5 poner en contacto una muestra con un primer anticuerpo que se une a la molécula diana;
- poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que las moléculas de enzima son capaces de producir al menos un producto capaz de reducir los iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero y en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al primer anticuerpo;
- 10 poner en contacto la muestra con un tercer anticuerpo, en el que el tercer anticuerpo es un conjugado de anticuerpo-nanopartícula que comprende dos o más nanopartículas unidas directamente a un anticuerpo a través de un enlace metal-tiol y se une específicamente al segundo anticuerpo;
- 15 poner en contacto la muestra con un sustrato de las moléculas de enzima y un ion metálico, de manera que se forme un precipitado de metal y se coloque con la molécula diana; y
- detectar el precipitado de metal, detectando de este modo la molécula diana.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo anticuerpo comprende además un hapteno y el tercer anticuerpo se une específicamente al hapteno del segundo anticuerpo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula diana comprende una sonda de ácido nucleico marcada con hapteno que se une específicamente a la molécula diana y en el que el primer anticuerpo se une específicamente a la sonda de ácido nucleico marcada con hapteno.
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ion metálico comprende ion de plata, ion de oro, ion de cobre, ion de níquel, ion de platino, ion de paladio, ion de cobalto o ion de iridio.
- 30 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, poner en contacto la muestra con una sal de haluro de oro, opcionalmente en el que la sal de haluro de oro comprende cloruro de oro.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además amplificar la señal, en el que la amplificación de la señal comprende poner en contacto la muestra con una sal de plata, opcionalmente en el que la sal de plata comprende nitrato de plata, óxido de plata, acetato de plata o perclorato de plata.
- 35 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, poner en contacto la muestra con un agente reductor, opcionalmente en el que el agente reductor comprende tiosulfato de sodio.
- 40 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el segundo anticuerpo comprende un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo o se conjuga con tres moléculas de fosfato alcalino.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la enzima comprende una fosfatasa alcalina, una fosfatasa ácida, una β -galactosidasa, una β -glucosidasa, una β -lactamasa o una esterasa, opcionalmente en el que la enzima es fosfatasa alcalina y el sustrato de la enzima comprende fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, fosfato de ácido ascórbico o un derivado de fosfato de hidroquinona.
- 45 10. Un procedimiento para detectar una molécula diana en una muestra, que comprende:
- 50 poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que las moléculas de enzima son capaces de producir al menos un producto capaz de reducir los iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero y en el que el primer anticuerpo se une a la molécula diana;
- poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo es un conjugado de anticuerpo-nanopartícula que comprende dos o más nanopartículas unidas directamente a un anticuerpo a través de un enlace metal-tiol y se une específicamente al tercer anticuerpo;
- 55 poner en contacto la muestra con un sustrato de las moléculas de enzima y un ion metálico, de manera que se forme un precipitado de metal y se coloque con la molécula diana; y
- 60 detectar el precipitado de metal, detectando de este modo la molécula diana.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el primer anticuerpo comprende un hapteno y en el que el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente al hapteno del primer anticuerpo.
- 65 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el conjugado de anticuerpo-nanopartícula

comprende de dos a siete nanopartículas, opcionalmente en el que el conjugado comprende cinco nanopartículas.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el metal del enlace metal-tiol se conjuga con un resto de cisteína del anticuerpo.

5

14. El procedimiento de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el conjugado de anticuerpo-nanopartícula comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

10

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el anticuerpo del conjugado de anticuerpo-nanopartícula comprende un anticuerpo de conejo, cabra, ratón anti-hapteno.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la nanopartícula comprende oro, paladio, platino, plata, cobre, níquel, cobalto, iridio o una aleación de dos o más de los mismos.

15

17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que la nanopartícula tiene un diámetro de 5 nm o menos, opcionalmente en el que la nanopartícula tiene un diámetro de 0,5 a 5 nm.

18. Un kit para detectar una molécula diana en una muestra, que comprende uno o más recipientes que comprenden:

20

un primer anticuerpo, en el que el primer anticuerpo es un conjugado de anticuerpo-nanopartícula que comprende dos o más nanopartículas unidas directamente a un anticuerpo a través de un enlace metal-tiol.

25

un segundo anticuerpo conjugado con una o más moléculas de enzima, en el que las moléculas de enzima son capaces de producir al menos un producto capaz de reducir los iones metálicos a metal en un estado de oxidación cero y en el que el primer anticuerpo se une específicamente al segundo anticuerpo; y

un sustrato para la una o más moléculas de enzima y un ion metálico.

30

19. El kit de la reivindicación 18, que comprende, además, un haluro de oro, opcionalmente en el que el haluro de oro comprende cloruro de oro.

20. El kit de la reivindicación 18 o 19, que comprende además una sal de plata, opcionalmente en la que la sal de plata comprende nitrato de plata, óxido de plata o cloruro de plata.

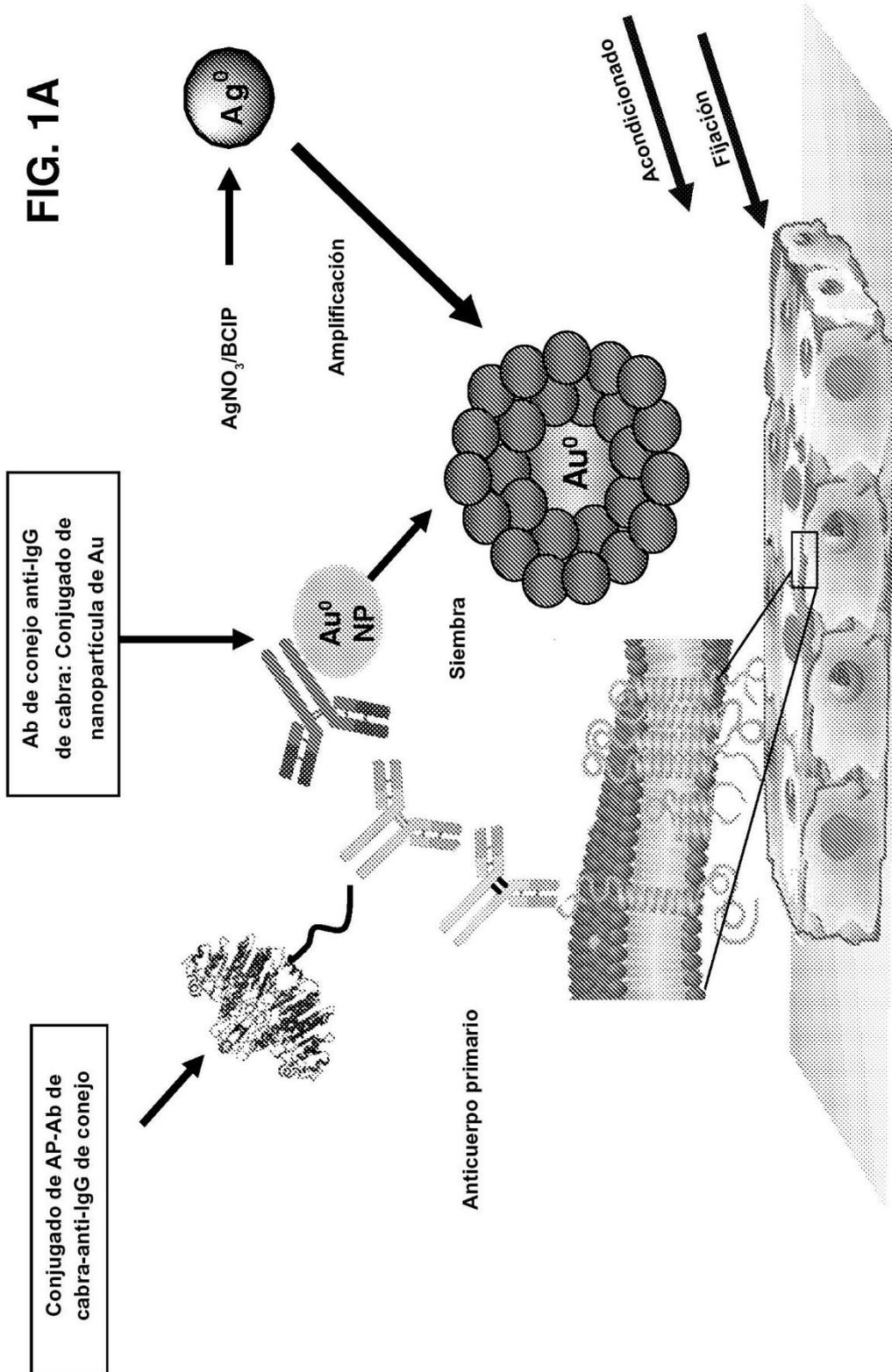
35

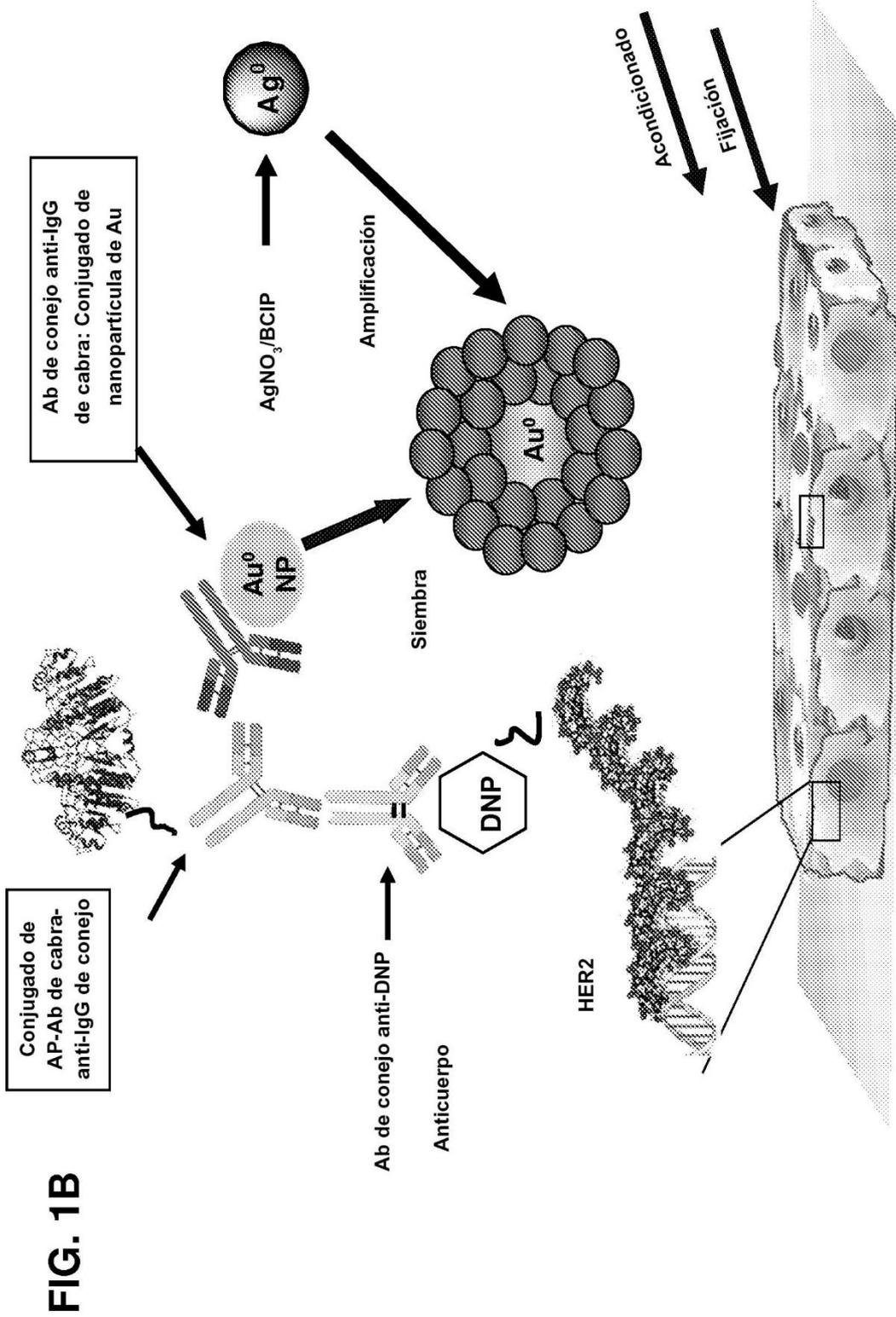
21. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que comprende, además, un agente reductor, opcionalmente en el que el agente reductor comprende tiosulfato de sodio.

40

22. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, que comprende, además, un tercer anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana, en el que el segundo anticuerpo se une específicamente al tercer anticuerpo.

FIG. 1A





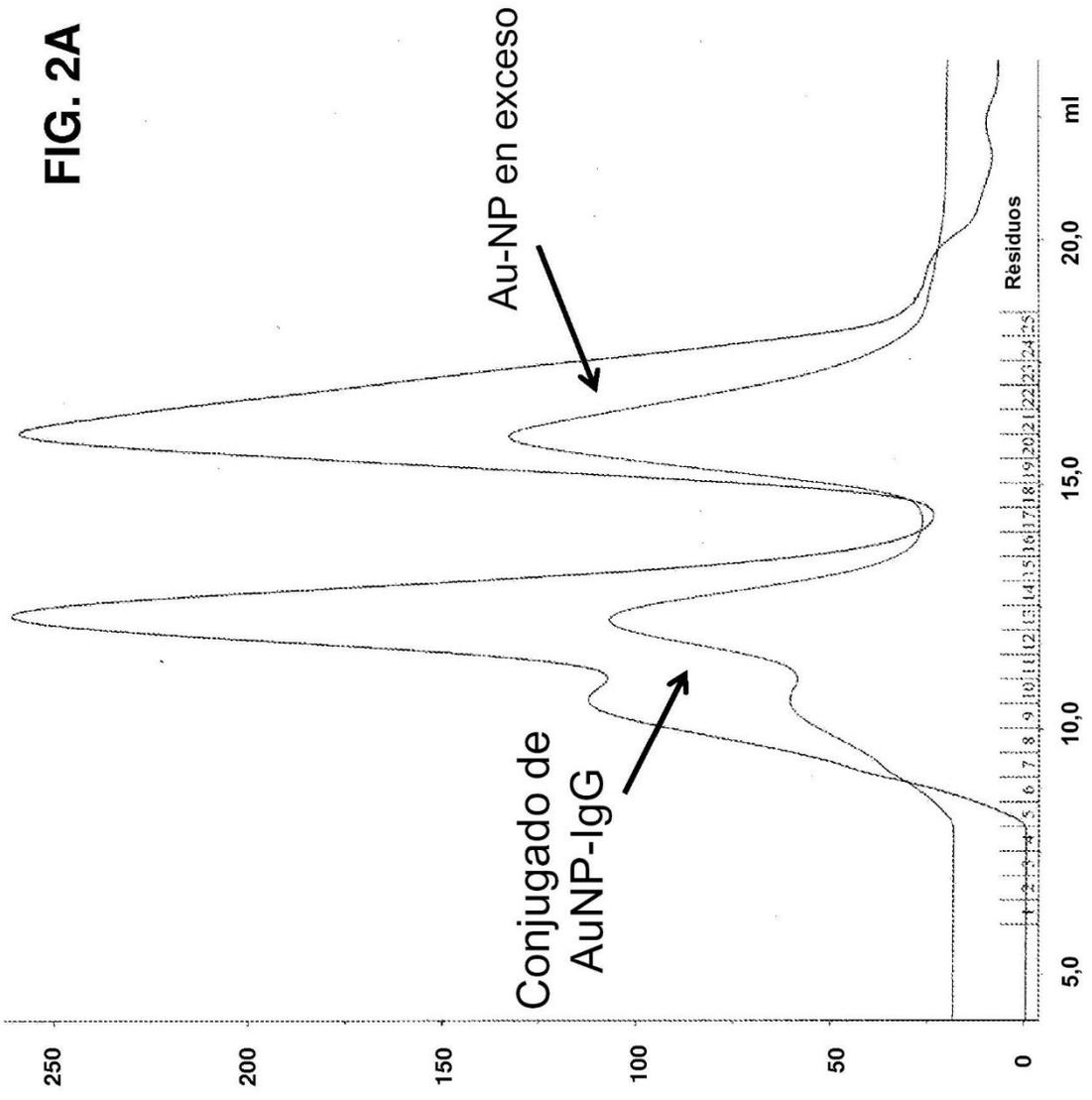
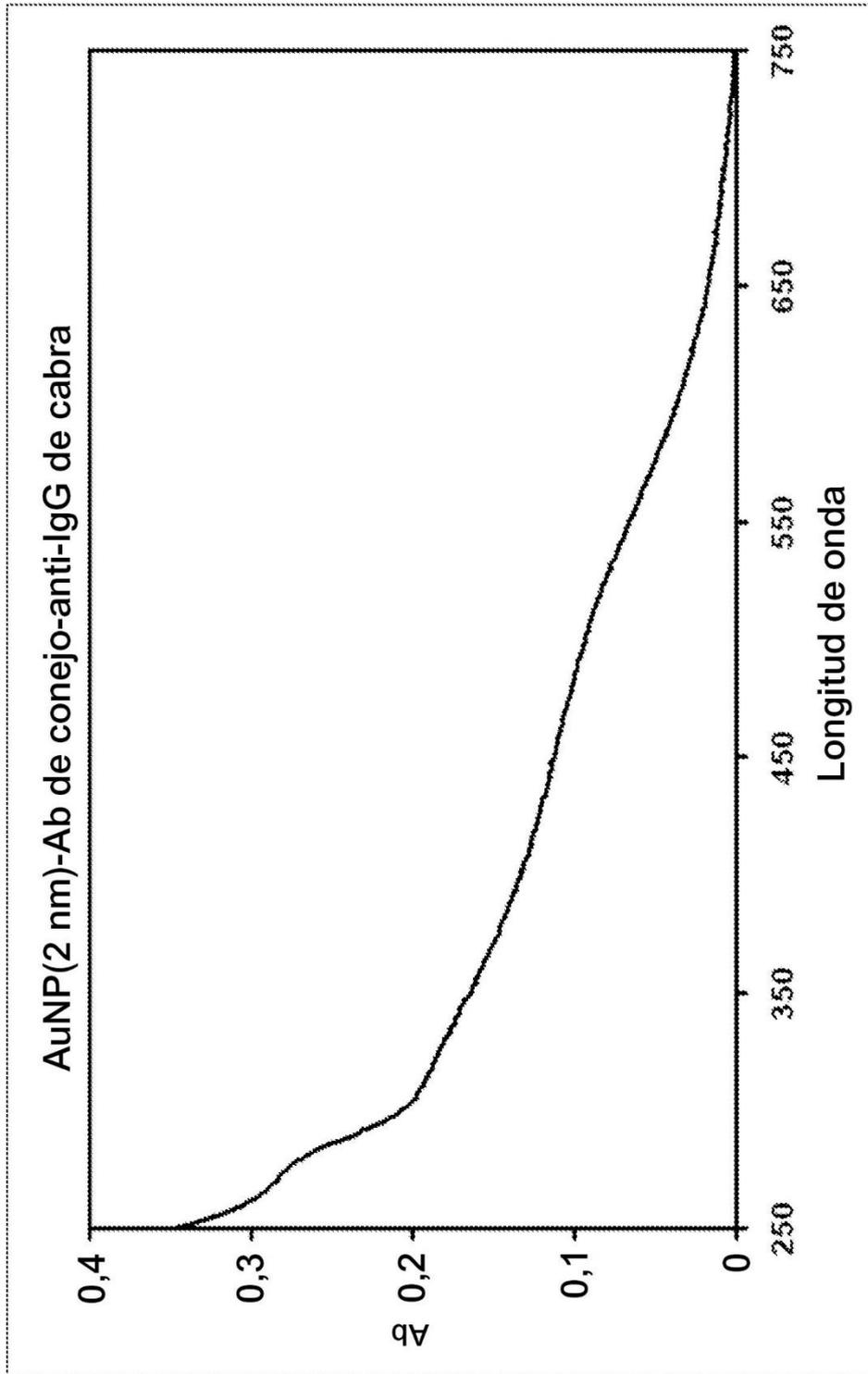


FIG. 2B



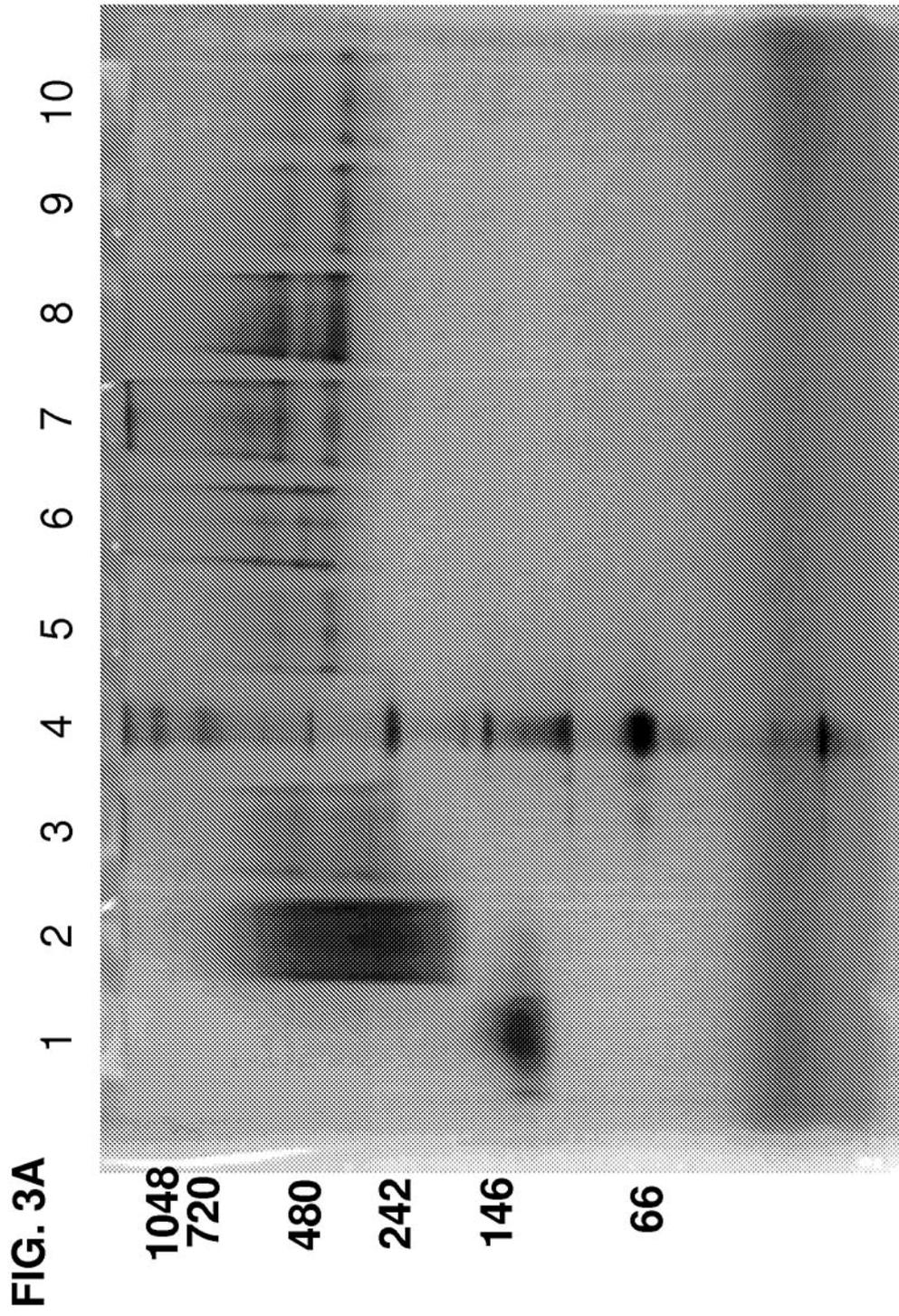
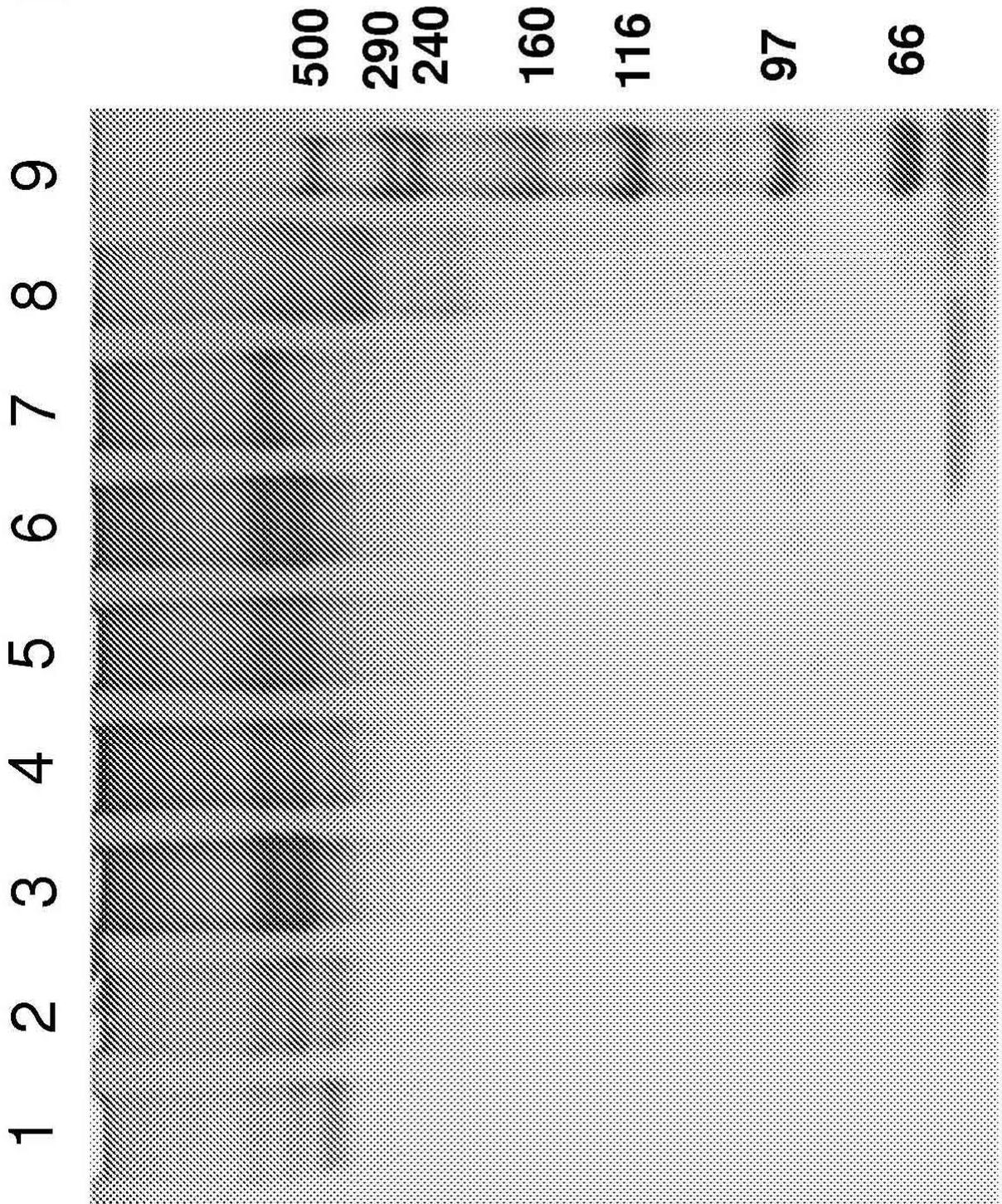
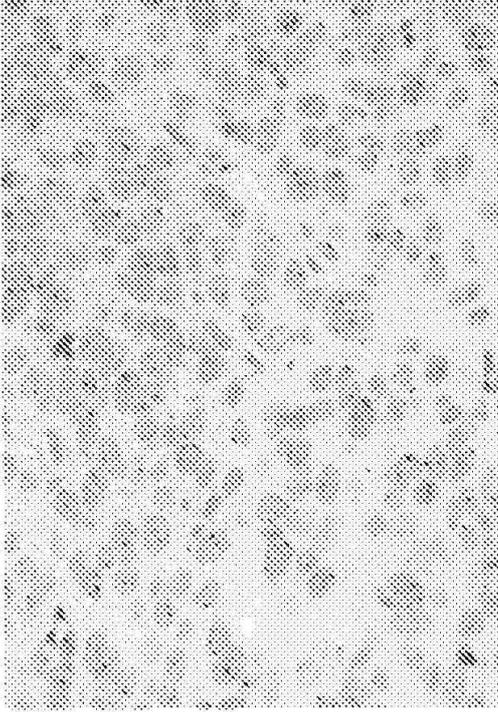


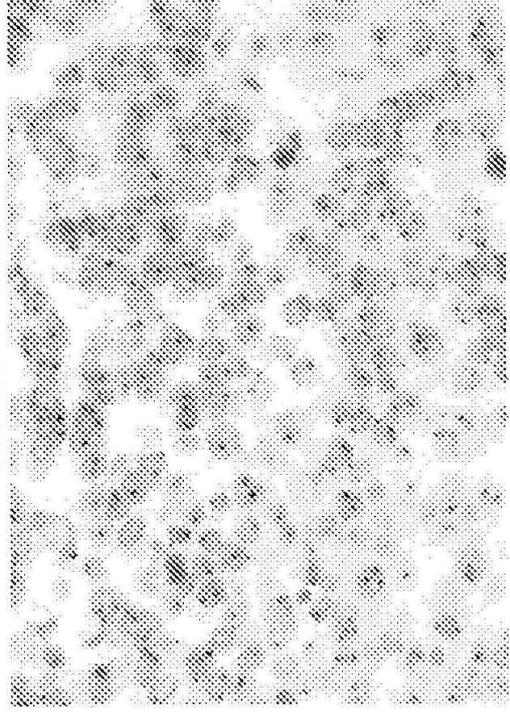
FIG. 3B



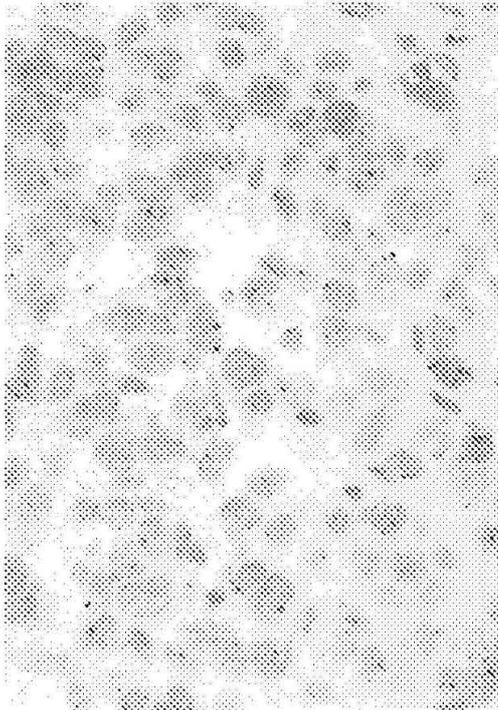
MCF7 HRP



MCF7 AP



BT-474 HRP



BT-474 AP

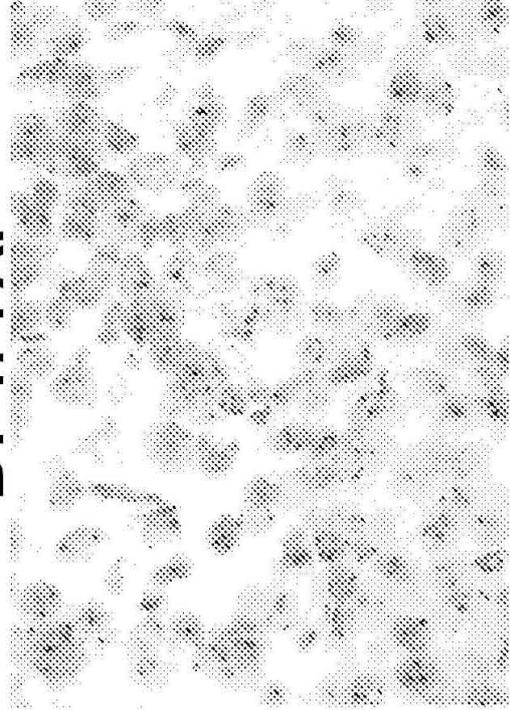


FIG. 4

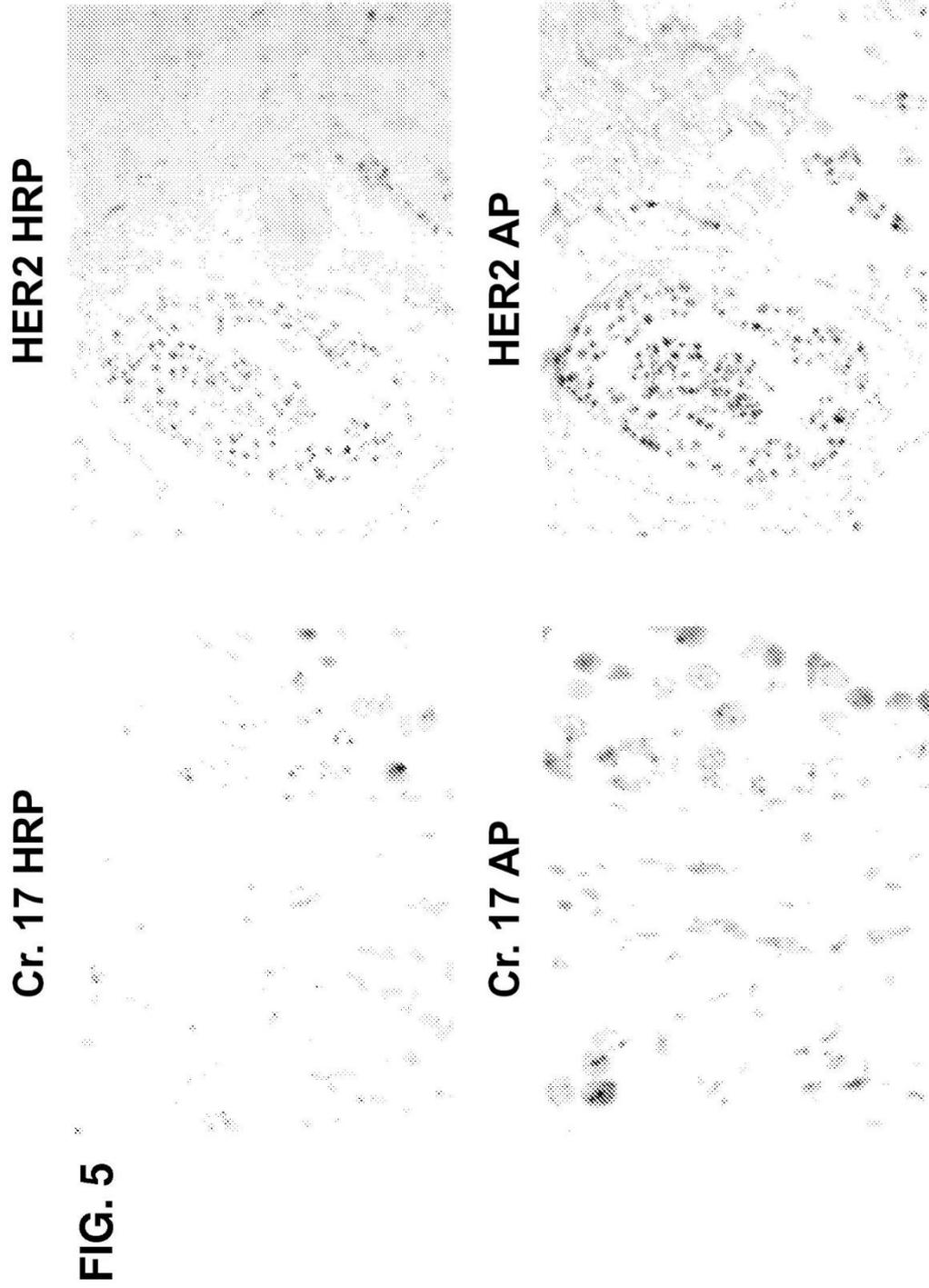
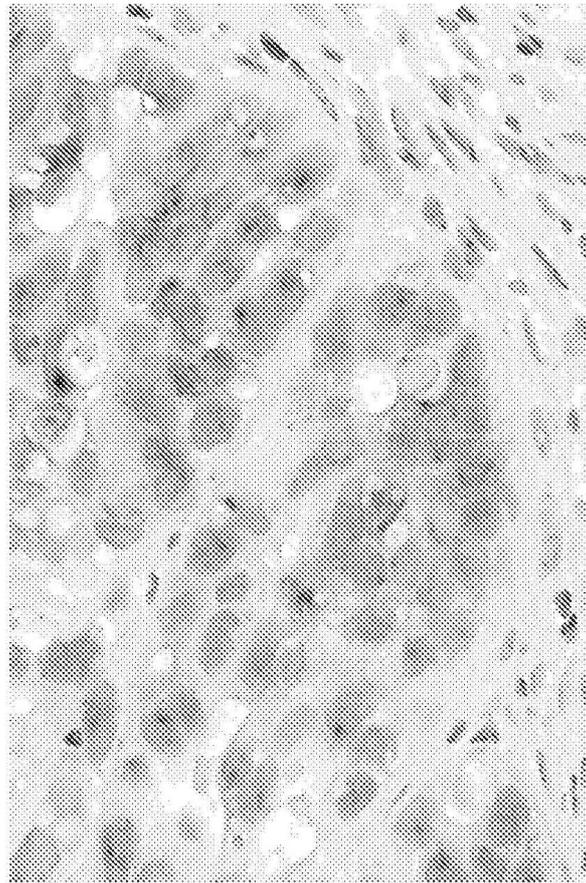


FIG. 6

sin conjugado de AuNP-Ab



con conjugado de AuNP-Ab

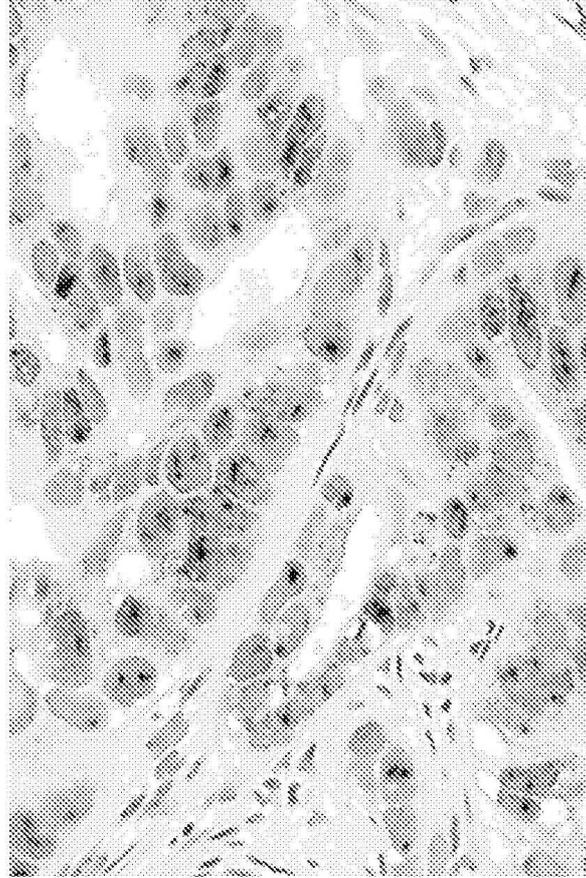


FIG. 7A

Lector 1: Comparación de AP y HRP-SISH

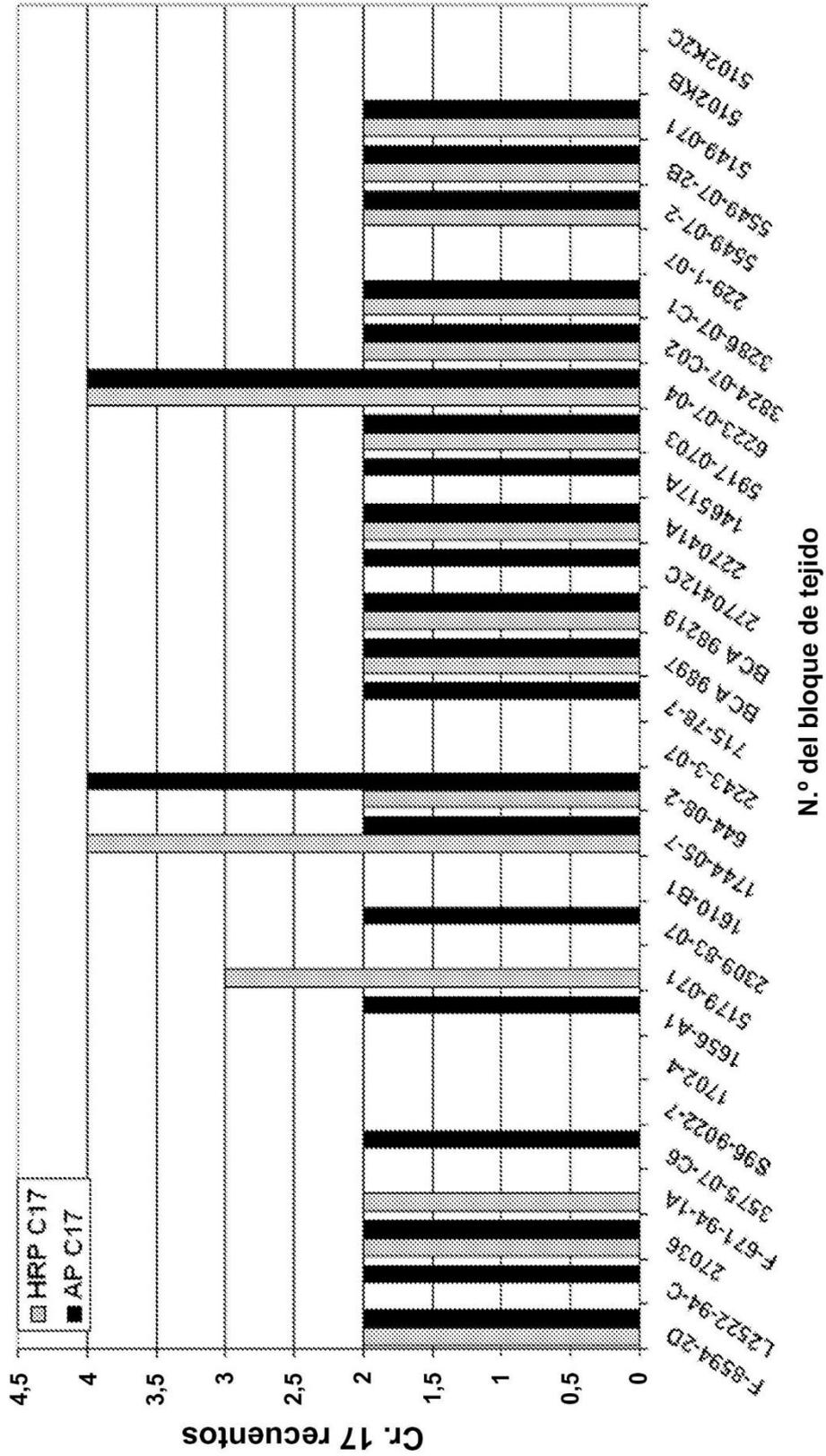


FIG. 7B

Lector 2: Comparación de AP y HRP-SISH

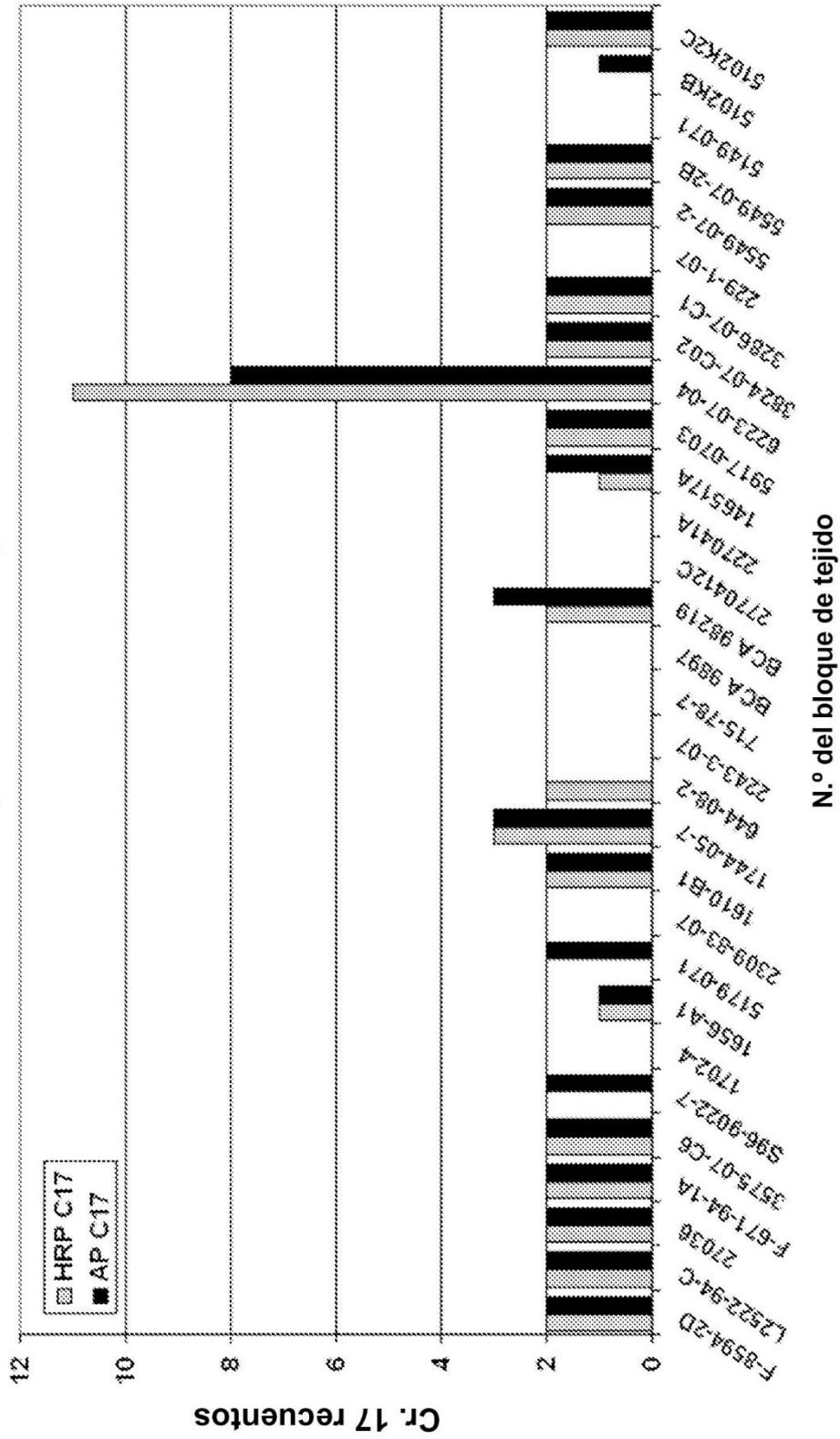


FIG. 8A

Lector 1: Comparación de AP y HRP-SISH

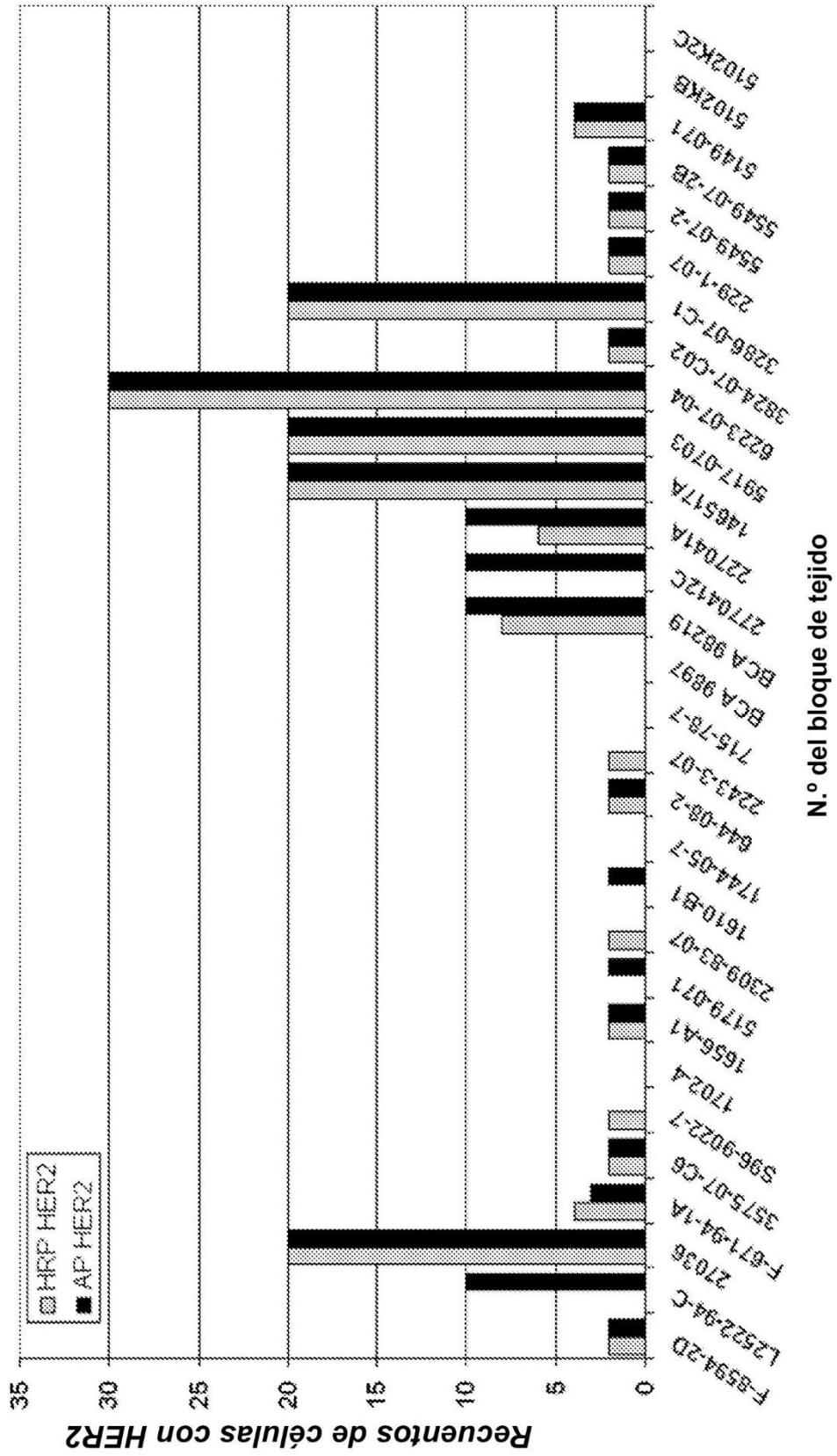
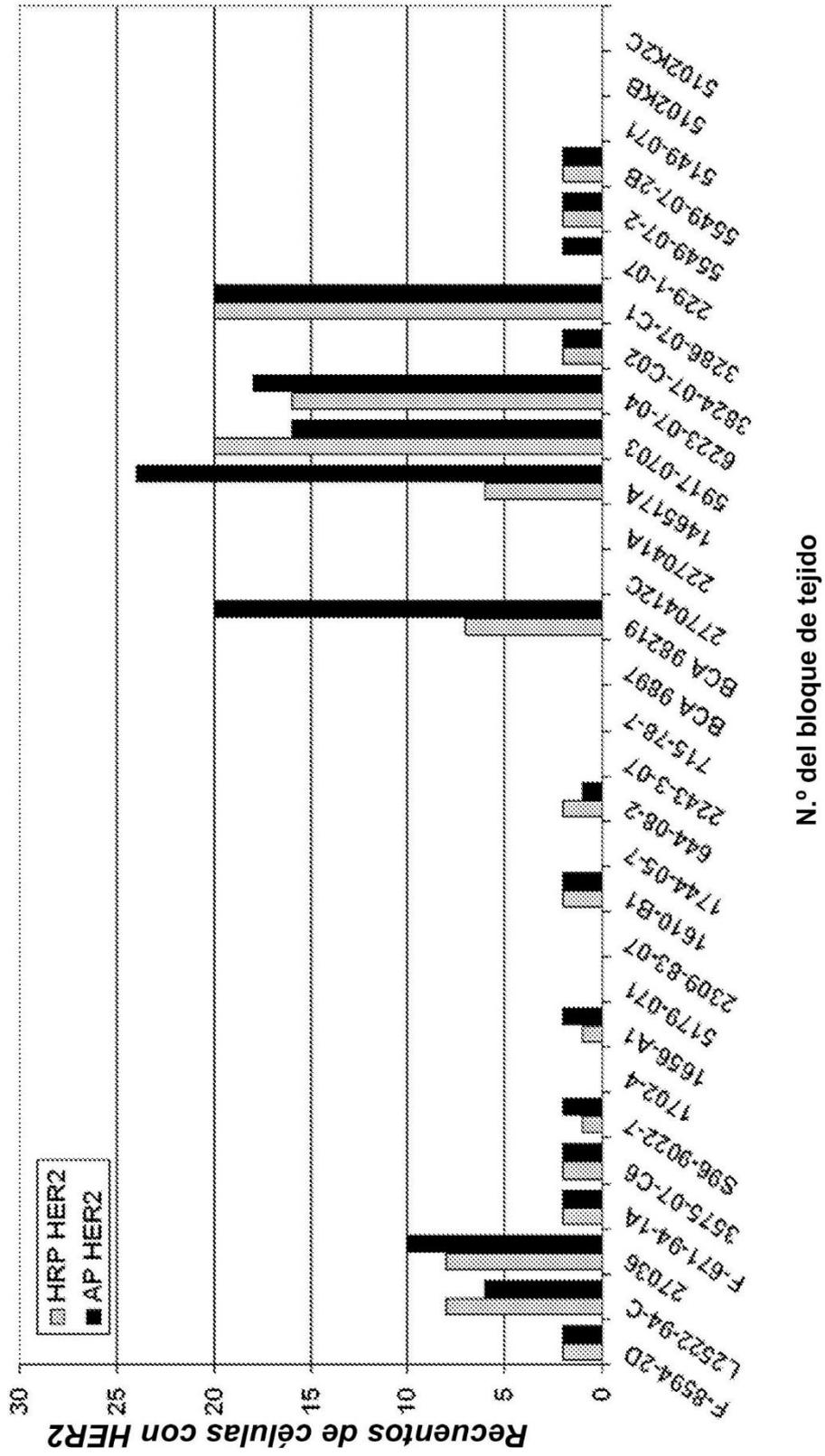


FIG. 8B Lector 2: Comparación de AP y HRP-SISH



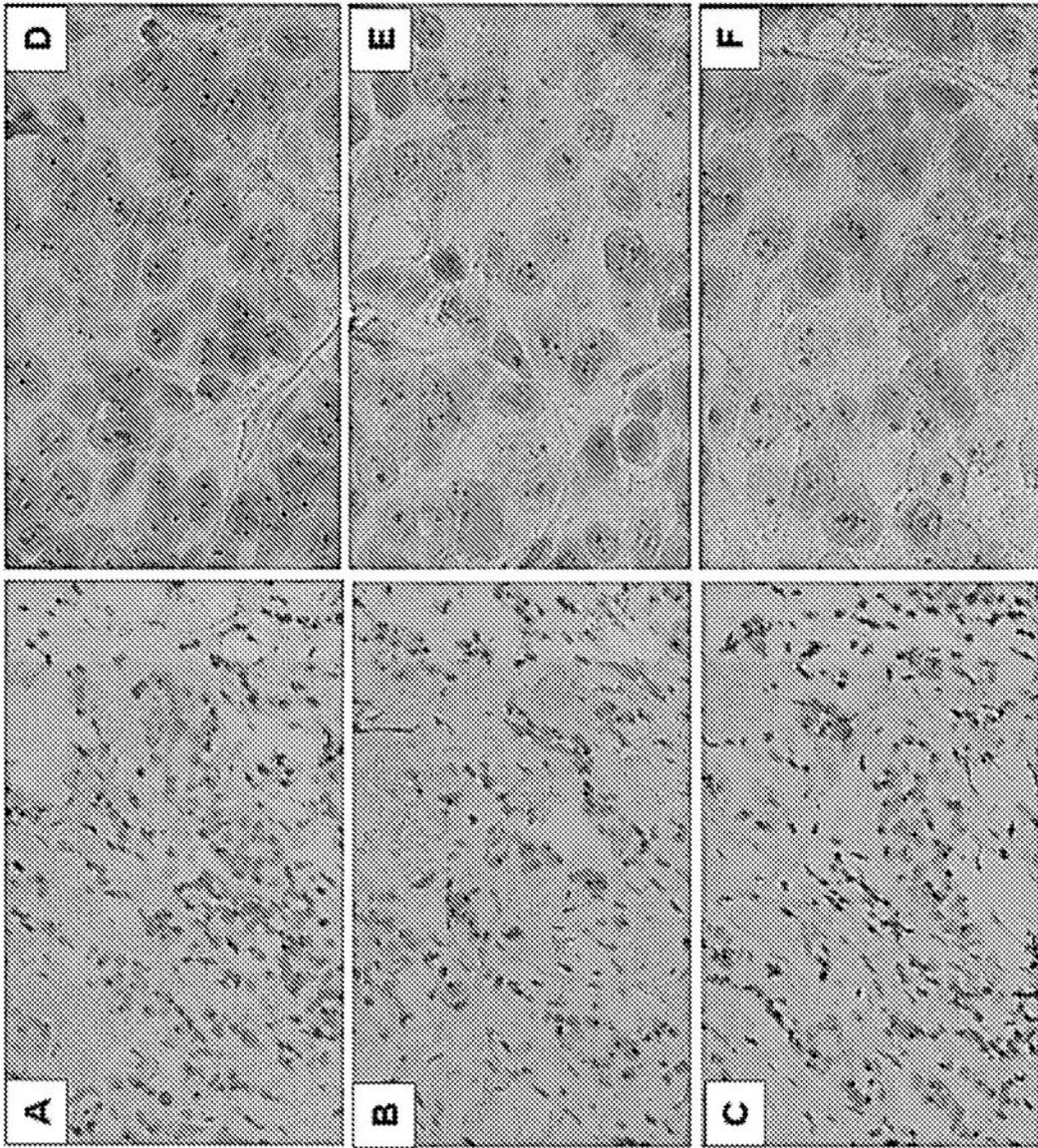


FIG. 9

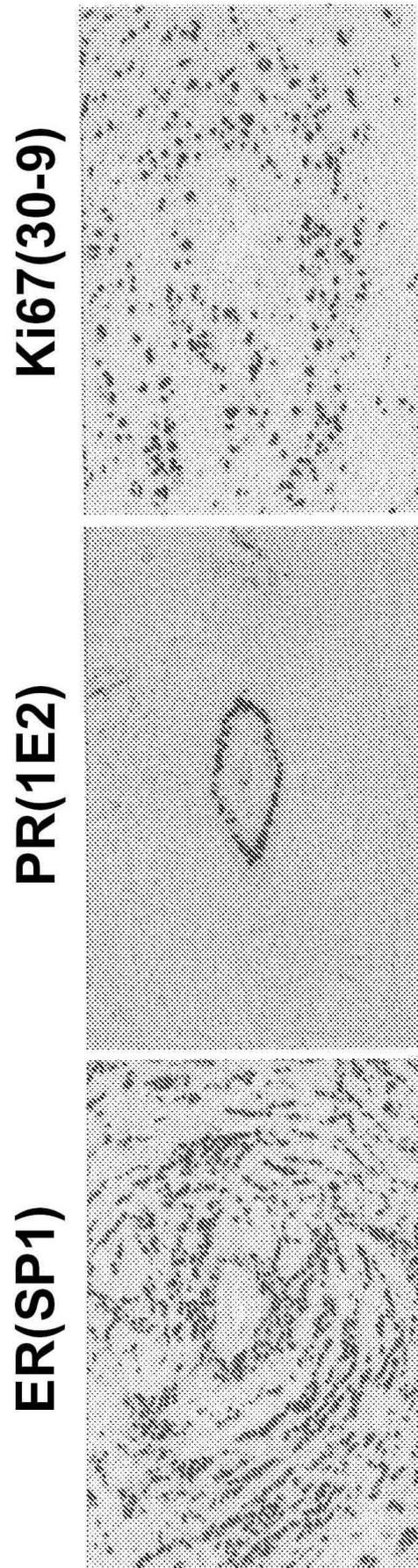


FIG. 10

FIG. 11

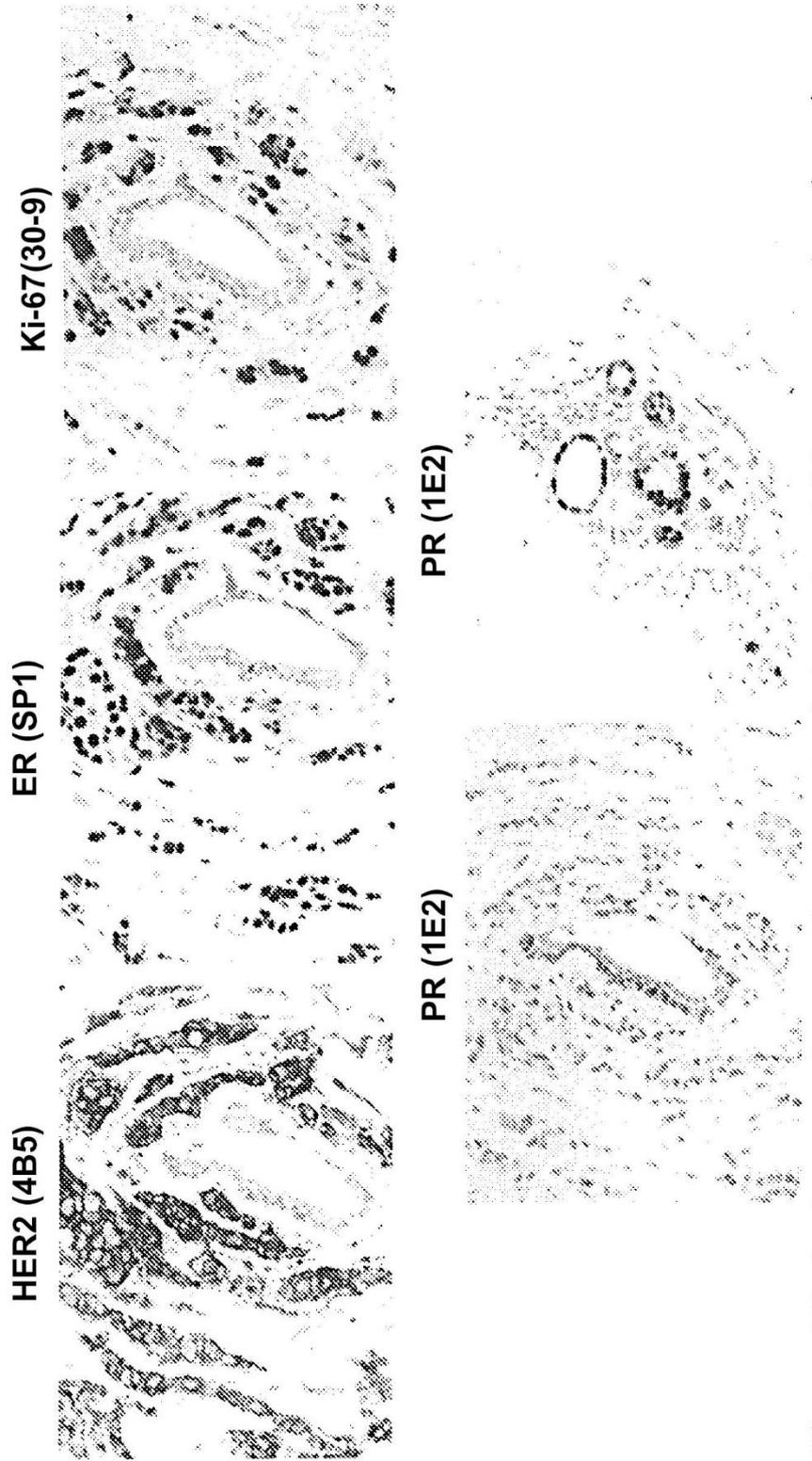
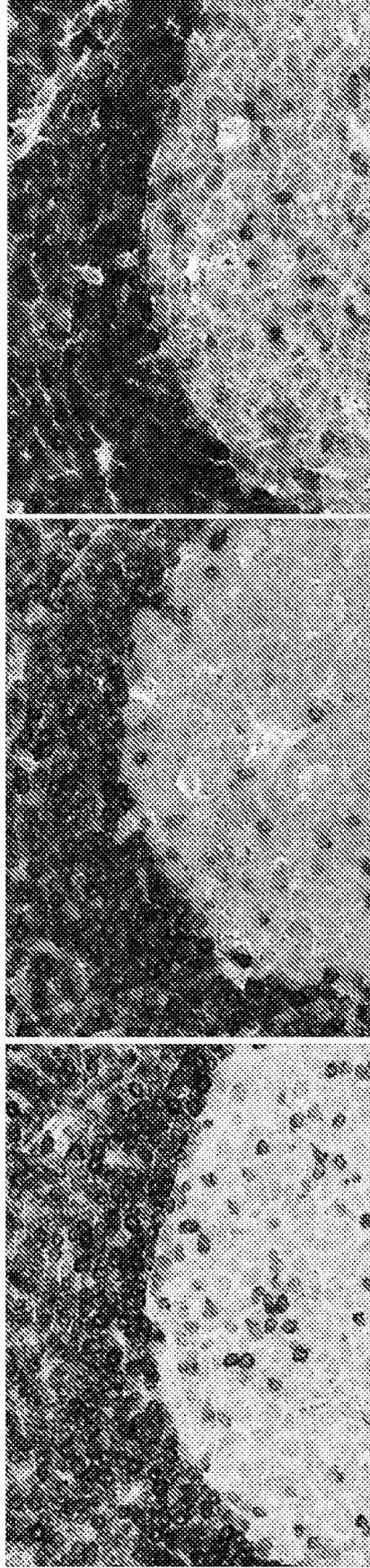


FIG. 12



**UltraView DAB en tejido de
amígdala con Bcl-2 (Bluing
y hematoxilina como tinción
de contraste)**

**AP-plata en tejido de
amígdala con Bcl-2 (Nuclear
Fast Red como tinción de
contraste)**

**AP-plata en tejido de
amígdala con Bcl-2 (Bluing
y hematoxilina como tinción
de contraste)**