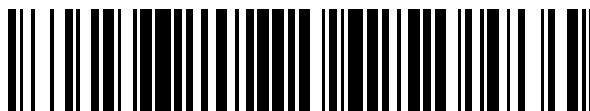


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 564**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2011 E 15194058 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 3034625**

54 Título: **Método ultrasensible para la detección in situ de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

21.10.2010 US 405503 P
10.11.2010 US 412276 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.01.2018

73 Titular/es:

ADVANCED CELL DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
7707 Gateway Blvd.
Newark, CA 94560, US

72 Inventor/es:

WU, XINGYONG;
WANG, HUEI-YU FAY;
SU, NAN;
WANG, LI-CHONG y
LUO, YULING

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 648 564 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método ultrasensible para la detección *in situ* de ácidos nucleicos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere, en general, a ensayos químicos y bioquímicos relacionados con ácidos nucleicos. Más particularmente, la invención se refiere a una célula fijada y permeabilizada que comprende al menos una molécula de ácido nucleico diana y al menos un conjunto de dos o más sondas de captura particulares que se hibridan con el mismo y un corte tisular que comprende una célula, en donde la célula comprende al menos una molécula de ácido nucleico diana y al menos un conjunto de dos o más sondas de captura particulares que se hibridan con el mismo como se define en las reivindicaciones adjuntas 1 a 14.

Antecedentes de la invención

15 La hibridación *in situ* (ISH; del inglés, *in situ hybridization*) es una técnica que permite la detección y localización de moléculas de ácido nucleico específicas en células individuales morfológicamente conservadas, cortes tisulares histológicos, o preparaciones de cromosomas. Se describió por vez primera en 1969 y se basa en la hibridación complementaria de una sonda de nucleótidos con una secuencia diana específica de DNA o RNA en la célula. Éste puede ser DNA endógeno, RNA mensajero (mRNA), microRNA (miRNA), secuencias víricas o secuencias bacterianas. La sonda añadida está marcada con una molécula informadora, y los sitios de unión se visualizan fluorescentemente [hibridación *in situ* fluorescente (FISH; del inglés, *fluorescent in situ hybridization*)] o cromogénicamente [hibridación *in situ* cromogénica (CISH; del inglés, *chromogenic in situ hybridization*)].

20 En los últimos años, una vez completada la secuenciación del genoma humano completo, se han anotado muchos miles de nuevas secuencias génicas humanas en bases de datos públicas y privadas. Esto abrió una nueva puerta para la ISH, ya que es relativamente sencillo, rápido y barato diseñar y sintetizar sondas antisentido para detectar una secuencia específica de cualquier nuevo gen en la célula. Con la ISH se pueden obtener patrones de expresión específicos del tejido y específicos del tipo celular junto con el nivel de expresión del gen, lo que proporcionará una información valiosa para analizar la función del gen.

25 Sin embargo, la aplicación de técnicas de ISH puede estar limitada por su incapacidad para detectar dianas de DNA o RNA con bajos números de copias en las células a causa de una falta de sensibilidad y especificidad. Es especialmente exigente aplicar la ISH en el escenario clínico donde la fijación con formalina y la imbibición en parafina (FFPE; del inglés, *formalin fixation and paraffin embedding*) es el método más comúnmente empleado en el mundo para almacenar muestras tisulares clínicas. El método de FFPE conserva bien la morfología tisular, pero la fijación con entrecruzamiento por formaldehído puede causar una mala accesibilidad de la secuencia diana a la sonda de detección, una mala interacción química o física de las moléculas de la sonda con otras moléculas o estructuras, y daño a los ácidos nucleicos, especialmente a mRNAs.

30 Con objeto de sortear la limitación de la ISH y prolongar su utilidad en la patología diagnóstica, se han desarrollado varias estrategias para mejorar la sensibilidad de la ISH. Recientemente, un nuevo método para amplificación de señales por ISH llamado RNAscope[®] ha sido desarrollado por Advanced Cell Diagnostics, Inc. (Patente de EE.UU. n° 7.709.198). Este ensayo incluye sondas oligonucleotídicas de captura exclusivamente diseñadas y un sistema de amplificación de señales compuesto de preamplificadores, amplificadores y sondas de marcación, que permiten una sustancial amplificación de señales sin amplificar la señal de fondo, lo que permite la detección de moléculas de RNA individuales para casi todos los genes. Una realización ejemplar de la tecnología RNAscope[®] se ilustra esquemáticamente en la Figura 1 y se describirá con detalle en las Sección 2 de esta solicitud.

35 En un ensayo RNAscope[®] típico para detectar un ácido nucleico diana, un mRNA diana cuya expresión se va a detectar es liberado de células y es capturado sobre una superficie sólida (por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación). También se proporcionan un conjunto de dos o más sondas de captura y un multímero generador de señales. Las sondas de captura se hibridan tanto con el ácido nucleico diana como con el multímero generador de señales y, por lo tanto, capturan el multímero generador de señales para el ácido nucleico diana. El multímero generador de señales comprende sondas de marcación (LPs; del inglés, *label probes*). Pero más típicamente, el multímero generador de señales comprende preamplificadores y/o amplificadores además de sondas de marcación. La sonda de marcación es capaz de unirse a una partícula o molécula de marcación que proporciona una señal detectable. La sonda de marcación tiene una estructura molecular más grande que permite la fijación de una pluralidad de partículas o moléculas de marcación, las cuales proporcionan una señal más intensa que una sola partícula o molécula de marcación. De este modo, el ensayo RNAscope[®] mejora la sensibilidad y la especificidad de la detección de ácido nucleico.

55 Sin embargo, el ensayo RNAscope[®] solo aún no permite detectar fiablemente algunos genes de pocas copias en cortes tisulares retroactivos fijados con formalina y embebidos en parafina (FFPE), donde el RNA está significativamente degradado. Además, una sola molécula de RNA no puede ser visualizada con un aumento de 40X

usando la tecnología RNAscope® actual. Es deseable potenciar más la señal de detección para permitir una detección más robusta de cualesquier moléculas de RNA, incluyendo las moléculas de RNA significativamente degradadas, y para permitir una fácil visualización de la señal de RNA detectada con un aumento de 10X.

5 En esta memoria describimos un nuevo ensayo de amplificación de señales por ISH para prolongar la utilidad de la ISH en la patología diagnóstica, al combinar dos métodos de amplificación de señales en un sistema. Este sistema tiene tres formatos: (1) RNAscope® en combinación con biotina-(estrept)avidina, (2) RNAscope® en combinación con un anticuerpo, y (3) RNAscope® en combinación con amplificación de señales con tiramida (TSA; del inglés, tyramide signal amplification). Todos estos métodos pueden aprovechar la excepcional especificidad de la tecnología RNAscope® con el poder de amplificación de los tres métodos de amplificación. Hemos hallado sorprendentemente que los tres anteriores métodos de amplificación de señales combinados permiten amplificar enormemente las señales asociadas con la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra mientras producen una excelente razón de señal a ruido.

15 La biotina-avidina (o biotina-estreptavidina) es un sistema de amplificación de señales bien conocido basado en el hecho de que las dos moléculas tienen una afinidad extraordinariamente elevada entre sí y de que una molécula de avidina/estreptavidina puede unirse a cuatro moléculas de biotina. Los anticuerpos son ampliamente empleados para la amplificación de señales en inmunohistoquímica e ISH. La TSA se basa en el depósito de un gran número de moléculas de tiramida "haptizadas" por una actividad peroxidasa. La tiramida es un compuesto fenólico. En presencia de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno, la peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) inmovilizada convierte el sustrato marcado en un producto intermedio muy reactivo de vida corta. Las moléculas de sustrato activadas reaccionan entonces muy rápidamente con, y se unen covalentemente a, componentes de proteínas ricos en electrones, tales como tirosina, en, o cerca de, el sitio de unión de la peroxidasa. De este modo, se puede introducir un lote de moléculas extra de hapteno conjugadas con tiramida en el sitio de hibridación *in situ*. Posteriormente, las moléculas de tiramida-hapteno depositadas pueden ser directa o indirectamente visualizadas.

25 Todos estos métodos para amplificación de señales han sido empleados en la ISH con diferentes grados de éxito pero, normalmente, la intensidad de las señales y/o la razón de señal a ruido no son lo suficientemente buenas para una patología diagnóstica rutinaria. En el caso de la TSA, en particular cuando se emplea sola en ISH, produce un alto grado de ruido de fondo. Las consistencias día a día y laboratorio a laboratorio son también menos que deseables.

30 A la vista de lo anterior, existe la necesidad de métodos para amplificar ácidos nucleicos tanto con elevada intensidad como con elevada especificidad. También existe la necesidad de dicho método con una sólida consistencia. La presente descripción proporciona estas y otras características que resultarán evidentes tras la revisión de lo siguiente.

Sumario de la invención

35 La presente descripción combina el método para amplificación de señales de RNAscope® con los métodos generales para amplificación de señales por ISH en un método ultrasensible para detectar, cuantificar e identificar uno o más ácidos nucleicos diana en una muestra. El ensayo RNAscope® ofrece una especificidad excepcional a causa de su diseño único de sondas de captura apareadas. Al añadirse métodos generales para amplificación de señales por ISH, tales como la amplificación de señales basada en TSA, al ensayo RNAscope®, los métodos combinados alcanzan una elevada intensidad de señales y un bajo fondo. Los métodos y el sistema para amplificación de señales descritos en esta memoria son relativamente simples de utilizar y producen un resultado consistente. El método se puede adaptar fácilmente para usar en procedimientos de diagnóstico clínico rutinarios.

45 En un aspecto preferido, la especificidad y la sensibilidad del método descrito para amplificación de señales están equilibradas. El equilibrio se alcanza mediante una reducción moderada del factor de amplificación de señales en RNAscope®. En una realización, se diseña un preamplificador para que se una a entre 1 y 16 amplificadores. En una realización preferida, se diseña un preamplificador para que se una a entre 2 y 10 amplificadores. En otra realización más preferida, se diseña un preamplificador para que se una a entre 2 y 5 amplificadores.

50 En una realización preferida de la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, se proporciona primero la muestra que comprende, o de la que se sospecha que comprende, el ácido nucleico diana, junto con al menos un conjunto de dos o más sondas de captura capaces de hibridarse con el ácido nucleico diana, un multímero generador de señales capaz de hibridarse con el conjunto de dos o más sondas de captura, en donde dicho multímero generador de señales comprende una sonda de marcación, y una sonda de amplificación de señales capaz de unirse a la sonda de marcación, en donde la sonda de amplificación de señales comprende un marcador. En el método, se hibrida primero el ácido nucleico diana con el conjunto de dos o más sondas de captura, y el multímero generador de señales es luego capturado por el conjunto de dos o más sondas de captura, capturándose de este modo el multímero generador de señales para el ácido nucleico diana. La sonda de amplificación de señales es luego capturada por la sonda de marcación, capturándose de este modo el multímero generador de señales. En la última operación se detecta la presencia, ausencia o cantidad del marcador en la sonda de amplificación de señales.

- 5 En una realización, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de biotina que es capaz de conjugarse con la sonda de marcación, una molécula de avidina/estreptavidina que es capaz de unirse a la molécula de biotina, y moléculas de biotina adicionales que están conjugadas con peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP; del inglés, *alkaline phosphatase*) o un fluoróforo y son capaces de unirse a la molécula de avidina/estreptavidina.
- 10 En otra realización, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de HRP, AP, dinitrofenilo (DNP; del inglés, *dinitrophenyl*) o fluoróforo que es capaz de conjugarse con la sonda de marcación, uno o más anticuerpos primeros que son capaces de unirse a dicha molécula de HRP, AP, DNP o fluoróforo, y uno o más anticuerpos segundos que están conjugados con HRP, polímero-HRP, AP, polímero-AP o fluoróforo y son capaces de unirse a dichos uno o más anticuerpos primeros.
- 15 En aún otra realización, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de HRP que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, una pluralidad de moléculas de tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo que son capaces de reaccionar con dicha molécula de HRP, y marcadores de detección que permiten detectar visualmente dichas moléculas de tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo. Los marcadores de detección son una combinación de avidina/estreptavidina-HRP y un sustrato cromogénico o una combinación de avidina/estreptavidina-AP y un sustrato cromogénico. El sustrato cromogénico es seleccionado del grupo que consiste en diaminobencidina (DAB) y Fast Red.
- 20 En una realización, el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación capaz de hibridarse con el conjunto de dos o más sondas de captura. En otra realización, el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación y un amplificador hibridado con la sonda de marcación. El amplificador es capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura. En una realización preferida, el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación, un amplificador hibridado con el marcador, y un preamplificador hibridado con uno o más de los amplificadores. El preamplificador es capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura.
- 25 El ácido nucleico diana puede ser de cualquier tipo, tal como, por ejemplo, DNA, cDNA, RNA, mRNA, rRNA, miRNA, siRNA y/o similares.
- 30 En una realización, la amplificación puede tener lugar sobre un soporte sólido antes de que se lleve a cabo la hibridación.
- Los métodos de la descripción proporcionan además una diversidad de modos para realizar ensayos "multiplex" de dos o más ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, la muestra puede comprender una célula que comprenda, o de la que se sospecha que comprenda, dos o más ácidos nucleicos diana diferentes. La muestra puede también comprender dos o más células diferentes, comprendiendo cada una o sospechándose que comprende cada una un ácido nucleico diana diferente.
- 35 Los dos ácidos nucleicos diana diferentes pueden ser detectados utilizando una hibridación *in situ* cromogénica (CISH) de color dual o una hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de color dual. En una realización, la CISH de color dual se lleva a cabo utilizando dos diferentes sondas de amplificación de señales, en donde la primera sonda de amplificación de señales comprende tiramida-biotina, estreptavidina-HRP y DAB, y la segunda sonda de amplificación de señales comprende anti-DNP-AP y Fast Red.
- 40 La presente descripción incluye kits. Los kits pueden incluir reactivos para llevar a cabo la detección de ácido nucleico y proporcionan las condiciones necesarias para llevar los métodos de la descripción a la práctica. Los kits incluyen p. ej. un kit que comprende: un ácido nucleico diana, un conjunto de dos o más sondas de captura capaces de hibridarse con dicho ácido nucleico diana, un multímero generador de señales capaz de hibridarse con el conjunto de dos o más sondas de captura, en donde el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación, y una sonda de amplificación de señales capaz de unirse a la sonda de marcación, en donde la sonda de amplificación de señales comprende un marcador.
- 45 En un tipo de kit, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de biotina que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, una molécula de avidina/estreptavidina que es capaz de unirse a dicha molécula de biotina, y moléculas de biotina adicionales que están conjugadas con HRP, AP o fluoróforos y son capaces de unirse a la molécula de avidina/estreptavidina.
- 50 En otro tipo de kit, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de HRP, AP, DNP o fluoróforo que es capaz de conjugarse con la sonda de marcación, uno o más anticuerpos primeros que son capaces de unirse a la molécula de HRP, AP, DNP o fluoróforo, y uno o más anticuerpos segundos que están conjugados con HRP, polímero-HRP, AP, polímero-AP o fluoróforo y son capaces de unirse a los uno o más anticuerpos primeros.
- 55 En aún otro tipo de kit, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de HRP que es capaz de conjugarse con la sonda de marcación, una pluralidad de moléculas de tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo que son capaces de reaccionar con dicha molécula de HRP, y marcadores de detección que permiten detectar visualmente

las moléculas de tiramida-biotina. Los marcadores de detección pueden ser una combinación de avidina/estreptavidina-HRP y un sustrato cromogénico o una combinación de avidina/estreptavidina-AP y un sustrato cromogénico. El sustrato cromogénico puede ser seleccionado del grupo que consiste en DAB y Fast Red.

5 En un kit, el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación capaz de hibridarse con el conjunto de dos o más sondas de captura. En otro kit, el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación y un amplificador hibridado con la sonda de marcación. El amplificador es capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura. En un kit preferido, el multímero generador de señales comprende una sonda de marcación, un amplificador hibridado con el marcador, y un preamplificador hibridado con uno o más de los amplificadores.

10 La razón preamplificador:amplificador en el kit puede ser entre 1 y 16, o preferiblemente entre 2 y 10 o entre 2 y 5.

El kit puede servir para el ensayo multiplex de amplificaciones múltiples de ácido nucleico. El kit se puede utilizar para detectar dianas de ácido nucleico en dos o más células diferentes, comprendiendo cada una o sospechándose que comprende cada una un ácido nucleico diana diferente, o para detectar dos o más dianas de ácido nucleico en una célula. La sonda de amplificación de señales del kit puede ser una sonda para hibridación *in situ* cromogénica (CISH) de color dual o una sonda para hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de color dual. En el caso de que se empleen las sondas para CISH de color dual, la primera sonda de amplificación de señales comprende tiramida-biotina, estreptavidina-HRP y DAB, y la segunda sonda de amplificación de señales comprende anti-DNP-AP y Fast Red.

Definiciones

20 A menos que se defina otra cosa, todas las expresiones técnicas y científicas empleadas en esta memoria tienen los mismos significados que los comúnmente entendidos por quien tiene una experiencia normal en la técnica a la cual pertenece la invención. Las definiciones siguientes complementan las de la técnica y se dirigen a la solicitud actual, y no han de ser imputadas a ningún caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a ninguna patente o solicitud en propiedad común. Aunque cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria pueden ser empleados en la práctica para el examen de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en esta memoria. En consecuencia, la terminología empleada en esta memoria tiene la única finalidad de describir realizaciones particulares y no ha de ser considerada restrictiva.

30 La expresión "ácido nucleico" (y el término equivalente "polinucleótido") abarca cualquier cadena física de unidades monoméricas que pueda corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero típico de DNA o RNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNAs; del inglés, peptide nucleic acids), oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son típicos del RNA o DNA biológicos, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. Los nucleótidos del polinucleótido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o compuestos análogos a nucleótidos, pueden ser naturales o artificiales, y pueden estar no sustituidos, no modificados, sustituidos o modificados. Los nucleótidos pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o por enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato, enlaces boranofosfato, o similares. El polinucleótido puede comprender además elementos no nucleotídicos tales como marcadores, agentes sofocadores, grupos bloqueadores o similares. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, de cadena simple o cadena doble.

40 Una "diana de ácido nucleico" o un "ácido nucleico diana" se refieren a un ácido nucleico, u opcionalmente una región del mismo, que se va a detectar.

Una "secuencia polinucleotídica" o "secuencia nucleotídica" es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un DNA, un ácido nucleico, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero de nucleótidos, dependiendo del contexto. A partir de cualquier secuencia polinucleotídica especificada se puede determinar el ácido nucleico dado o la secuencia polinucleotídica complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).

45 El término "gen" se utiliza en términos generales para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Los genes incluyen típicamente secuencias de codificación y/o las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de dichas secuencias de codificación. El término "gen" se puede aplicar a una secuencia genómica específica así como a un cDNA o un mRNA codificado por esa secuencia genómica.

50 El término "anticuerpo" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio y abarca anticuerpos completamente ensamblados, fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente al antígeno [por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos], anticuerpos de cadena simple, diacuerpos, quimeras de anticuerpo, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, y similares. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos tanto policlonales como monoclonales.

55 Las expresiones "muestra biológica" y "muestra tisular", como se emplean en esta memoria, se refieren a una muestra obtenida de un sujeto biológico, incluyendo una muestra de tejido o fluido de origen biológico, obtenida, conseguida o recogida *in vivo* o *in situ*. Una muestra biológica también incluye muestras de una región de un sujeto

biológico que contiene células o tejidos precancerosos o cancerosos. Dichas muestras pueden ser, pero no se limitan a, órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de un mamífero. Las muestras biológicas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, y similares. Las muestras biológicas preferidas incluyen, pero no se limitan a, una muestra de piel, biopsias tisulares, y similares.

La expresión "sonda de marcación" se refiere a un elemento que se une a una molécula diana, directa o indirectamente, y permite que se detecte la diana, por ejemplo, mediante un instrumento de lectura. Una sonda de marcación (o "LP") es típicamente un polinucleótido de cadena simple que comprende uno o más marcadores que proporcionan directa o indirectamente una señal detectable. El marcador puede estar covalentemente fijado al polinucleótido, o el polinucleótido puede estar configurado para que se una al marcador (por ejemplo, un polinucleótido biotinilado puede unirse a un marcador asociado con estreptavidina). La sonda de marcación, por ejemplo, puede hibridarse directamente con un ácido nucleico diana o puede hibridarse con un ácido nucleico que, a su vez, está hibridado con el ácido nucleico diana o con uno o más ácidos nucleicos distintos que están hibridados con el ácido nucleico. De esta manera, la sonda de marcación puede comprender una secuencia polinucleotídica que sea complementaria de una secuencia polinucleotídica del ácido nucleico diana, o puede comprender al menos una secuencia polinucleotídica que sea complementaria de una secuencia polinucleotídica de una sonda de captura, un amplificador, o similar.

Un "marcador" es un componente que facilita la detección de una molécula. Los marcadores comunes en el contexto de la presente invención incluyen marcadores fluorescentes, luminiscentes, dispersores de luz y/o colorimétricos. Los marcadores adecuados incluyen enzimas y componentes fluorescentes, así como radionucleidos, sustratos, cofactores, inhibidores, componentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Los marcadores ejemplares incluyen: peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), fluoróforo, dinitrofenilo (DNP), etc. Las patentes en que se enseña el uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de EE.UU. números 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241. Muchos marcadores son comercialmente asequibles y pueden ser empleados en el contexto de la invención.

Una "sonda de captura" es un polinucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana y capturar una sonda de marcación para ese ácido nucleico diana. La sonda de la diana puede hibridarse directamente con la sonda de marcación o puede hibridarse con uno o más ácidos nucleicos que, a su vez, se hibridan con la sonda de marcación; por ejemplo, la sonda de la diana puede hibridarse con un amplificador o un preamplificador. De este modo, la sonda de la diana incluye una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica del ácido nucleico diana, y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica de la sonda de marcación, el amplificador, el preamplificador o similar. La sonda de la diana es preferiblemente de cadena simple.

Un "amplificador" es una molécula, típicamente un polinucleótido, que es capaz de hibridarse con múltiples sondas de marcación. Típicamente, el amplificador se hibrida con múltiples sondas de marcación idénticas. El amplificador también se hibrida con al menos una sonda de la diana o un ácido nucleico unido a una sonda de la diana. Por ejemplo, el amplificador se puede hibridar con al menos una sonda de la diana y con una pluralidad de sondas de marcación, o con un preamplificador y una pluralidad de sondas de marcación. El amplificador puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico lineal, bifurcado, de tipo peine o ramificado. Como se indicó para todos los polinucleótidos, el amplificador puede incluir nucleótidos modificados y/o enlaces internucleotídicos no estándares, así como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o enlaces fosfodiéster estándares. En, por ejemplo, los documentos USPN 5.635.352, USPN 5.124.246, USPN 5.710.264 y USPN 5.849.481 se describen amplificadores adecuados.

Un "preamplificador" es una molécula, típicamente un polinucleótido, que actúa como un compuesto intermedio entre una o más sondas de la diana y amplificadores. Típicamente, el preamplificador se hibrida simultáneamente con una o más sondas de la diana y con una pluralidad de amplificadores. En, por ejemplo, los documentos USPN 5.635.352 y USPN 5.681.697 se describen preamplificadores ejemplares.

Una "ISH" o "hibridación *in situ*" se refiere a un tipo de hibridación en que se emplea una cadena de DNA o RNA complementaria marcada (es decir, una sonda) para localizar una secuencia de DNA o RNA específica en una porción o corte tisular (*in situ*). Los tipos de sonda son DNA de cadena doble (dsDNA; del inglés, double stranded DNA), DNA de cadena simple (ssDNA; del inglés, single stranded DNA), RNA complementario de cadena simple (sscRNA; del inglés, single stranded complementary RNA), RNA mensajero (mRNA), microRNA (miRNA) y oligonucleótidos sintéticos.

Una "FISH" o "hibridación *in situ* fluorescente" se refiere a un tipo de ISH con un marcador fluorescente.

Una "CISH" o "hibridación *in situ* cromogénica" se refiere a un tipo de ISH con un marcador cromogénico.

Un ensayo o sistema para "amplificación general de señales por ISH" se refiere a cualquier ensayo o sistema de hibridación *in situ* basado en ISH que permite amplificar la secuencia de DNA o RNA específica a la que apunta el método. Incluye, pero no se limita a, los tres sistemas ejemplares para amplificación general de señales por ISH

descritos en la presente invención (es decir, ISH basada en biotina, ISH basada en anticuerpo e ISH basada en TSA).

Breve descripción de los dibujos

- 5 En la Figura 1 se ilustra el principio del ensayo RNAscope[®]. Un ácido nucleico diana tal como mRNA se hibrida con conjuntos de sondas de captura. Cada conjunto de sondas de captura comprende dos o más sondas de captura. El conjunto de sondas de captura se hibrida con un preamplificador. Cada preamplificador se hibrida además con una pluralidad de amplificadores. La señal es adicionalmente amplificada hibridando los amplificadores con múltiples sondas de marcación. Cada sonda de marcación está conjugada con uno o más marcadores tales como fluoróforos o enzimas. Se detectan las señales usando un microscopio estándar de campo claro o de epifluorescencia.
- 10 En la Figura 2 se ilustra el principio de la amplificación RNAscope[®] + biotina/(estrept)avidina. Las sondas de marcación de RNAscope[®] están conjugadas con moléculas de biotina y unidas además por avidina/estreptavidina. Cada avidina/estreptavidina tiene la capacidad de unirse a un máximo de 4 moléculas de biotina que están conjugadas con marcadores enzimáticos o fluorescentes, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP) o fluoróforo, lo que conduce a un factor de aumento de señal de 4 por sonda de marcación.
- 15 En la Figura 3 se ilustra el principio de la amplificación RNAscope[®] + anticuerpo. Las sondas de marcación de RNAscope[®] están conjugadas con moléculas de HRP, AP, DNP o fluoróforo y son reconocidas por un anticuerpo (producido en una especie animal A, tal como cabra) contra moléculas de HRP, AP, DNP o fluoróforo. El primer anticuerpo puede ser luego reconocido por un anticuerpo secundario, conjugado con HRP, polímero-HRP, AP o polímero-AP, contra el primer anticuerpo de la especie A, lo que conduce a una amplificación más de la señal de RNAscope[®].
- 20 En la Figura 4 se ilustra el principio de la amplificación RNAscope[®] + TSA. Las sondas de marcación de RNAscope[®] están conjugadas con HRP. Las sondas de marcación conjugadas con HRP catalizan que múltiples copias de tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo se unan covalentemente a componentes de proteínas ricos en electrones en las inmediaciones de sitios de unión de LP-HRP. La tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo es posteriormente detectada por avidina/estreptavidina-HRP o avidina/estreptavidina-AP junto con sustratos cromogénicos para HRP o AP (tales como DAB y Fast Red). Puesto que se pueden depositar muchas copias de tiramida-biotina alrededor de cada sitio de unión de LP-HRP, la intensidad de la señal final, que es la suma de la amplificación RNAscope y la amplificación TSA, resulta significativamente aumentada.
- 25 En la Figura 5 se ilustra la detección de los mRNAs del gen HPRT1 de pocas copias en cortes FFPE de cáncer de mama humano usando procedimientos RNAscope y RNAscope + TSA. La señal obtenida con RNAscope + TSA (a la derecha) fue significativamente más intensa que la obtenida con RNAscope solo (a la izquierda).

Descripción detallada

- La presente descripción proporciona métodos y sistemas para detectar la presencia de un ácido nucleico diana de la descripción en una muestra con una sensibilidad y una especificidad mejoradas. La descripción combina el método RNAscope[®] con métodos generales para la amplificación de señales por ISH, tales como el método para amplificación de señales basado en TSA, el método para amplificación de señales basado en anticuerpo y el método para amplificación de señales basado en biotina-avidina. El método RNAscope[®] es conocido por su elevada especificidad a la hora de detectar un ácido nucleico diana. En otras palabras, en un ensayo RNAscope[®] se puede detectar un ácido nucleico diana con una elevada razón de señal a ruido. Dicha elevada especificidad, como se explicará más adelante en la Sección 2, procede del diseño de sondas en "doble Z" y del diseño de la cascada de señales del preamplificador-amplificador-sonda de marcación. Los métodos generales para la amplificación de señales por ISH son conocidos por su capacidad para potenciar la amplificación de señales de moléculas de ácido nucleico. Sin embargo, los métodos para amplificación de señales por ISH son también conocidos por su elevada razón de señal a ruido y por su falta de consistencia en los ensayos de amplificación.
- 35 La presente descripción combina el método RNAscope[®] con métodos generales para la amplificación de señales por ISH y ajusta además la razón de amplificación entre el amplificador y el preamplificador de RNAscope[®]. Entre otros beneficios, los métodos y sistemas de la presente descripción solventan las desventajas anteriormente indicadas de los métodos generales para la amplificación de señales por ISH mientras conservan los mecanismos únicos para la reducción del ruido de fondo de RNAscope[®]. Como resultado, el método descrito en esta memoria permite detectar fiablemente dianas de ácido nucleico con elevadas sensibilidad y especificidad. Dicha potenciación aumenta la consistencia entre los resultados de la detección de ácido nucleico hasta el nivel que puede ser implementado en ensayos diagnósticos.
- 40 1. Detección de ácido nucleico diana mediante una combinación de RNAscope[®] y métodos generales para la amplificación de señales por ISH
- 45 En esta descripción se describe un método de hibridación *in situ* nuevo, sencillo y ultrasensible para detectar ácido nucleico diana en una muestra. Este método puede ser empleado en ensayos tanto de ISH fluorescente (FISH)
- 50
- 55

como de ISH cromogénica (CISH). El método permite detectar ácidos nucleicos (DNA y RNA) inmovilizados en células intactas, cortes tisulares, micromatrices tisulares y micromatrices de cDNA.

1.1. Métodos generales para la amplificación de señales por ISH

5 Hay muchos métodos para la amplificación de señales por ISH que se han desarrollado para detectar una diana de DNA o RNA. A continuación se describirán tres métodos ejemplares para la amplificación de señales por ISH: (1) amplificación de señales por ISH basada en biotina-(estrept)avidina; (2) amplificación de señales por ISH basada en anticuerpo; y (3) amplificación de señales por ISH basada en la amplificación de señales con tiramida (TSA). Es evidente para un técnico experto que se puede utilizar cualquier método para la amplificación de señales por ISH en la presente invención en combinación con el método RNAscope®. De este modo, estos ejemplos no deberían ser
10 considerados una limitación a la presente invención.

(1) Sistema RNAscope + biotina-(estrept)avidina (Figura 2)

En una realización se utilizó el método para amplificación de señales por ISH basada en biotina-(estrept)avidina en combinación con RNAscope®. En un aspecto, el sistema RNAscope® comprende un conjunto de dos o más sondas de captura, una pluralidad de sondas de marcación, una pluralidad de amplificadores y una pluralidad de preamplificadores. El ácido nucleico diana se hibrida con el conjunto de sondas de captura. El conjunto de sondas de captura se hibrida luego con un preamplificador. El preamplificador se hibrida además con una pluralidad de amplificadores. Cada amplificador se hibrida luego con una pluralidad de sondas de marcación. La sonda de marcación (LP) de la estructura del complejo de RNAscope se conjuga luego con una molécula de biotina de la estructura para amplificación de señales por ISH y forma un complejo de LP-biotina. El complejo de LP-biotina se une además a una molécula de avidina/estreptavidina. La molécula de avidina/estreptavidina tiene capacidad para unirse a un máximo de 4 moléculas de biotina, donde cada molécula de biotina está además conjugada con HRP o AP. La HRP o AP puede ser visualmente detectada mediante colorantes cromogénicos tales como diaminobencidina (DAB) o Fast Red. De este modo, la combinación del método para amplificación de señales por ISH basada en biotina-(estrept)avidina con el método RNAscope® conduce a un factor de aumento de la señal de 4 por cada sonda de marcación.
15
20
25

(2) Sistema RNAscope + anticuerpo (Figura 3)

En otra realización se utilizó el método para amplificación de señales por ISH basada en anticuerpo en combinación con RNAscope®. En un aspecto, el sistema RNAscope® comprende un conjunto de dos o más sondas de captura, una pluralidad de sondas de marcación, una pluralidad de amplificadores y una pluralidad de preamplificadores. El ácido nucleico diana se hibrida con el conjunto de sondas de captura. Las dos o más sondas de captura se hibridan con la diana de ácido nucleico. Se hibrida cada preamplificador con cada una de las dos o más sondas de captura, se hibrida una pluralidad de amplificadores con cada uno de los preamplificadores, y se hibrida la pluralidad de sondas de marcación con los amplificadores. Cada sonda de marcación de la estructura del complejo de RNAscope® se conjuga con una molécula de HRP, una molécula de AP, una molécula de DNP o una molécula de fluoróforo, formándose así un complejo de HRP-LP, un complejo de AP-LP, un complejo de DNP-LP o un complejo de fluoróforo-LP, respectivamente. El complejo de HRP-LP, AP-LP, DNP-LP o fluoróforo-LP es reconocido por un anticuerpo anti-HRP, un anticuerpo anti-AP-LP, un anticuerpo anti-DNP-LP o un anticuerpo anti-fluoróforo-LP, respectivamente. Los anticuerpos anteriores son producidos por una especie animal A, tal como una cabra. Este primer anticuerpo es luego reconocido por un segundo anticuerpo contra la especie A. El segundo anticuerpo está conjugado con HRP, polímero-HRP, AP, polímero-AP o fluoróforo y es capaz de unirse a uno o más de los anticuerpos primeros. La HRP o AP puede ser visualmente detectada mediante colorantes cromogénicos tales como diaminobencidina (DAB) o Fast Red. El resultado aquí es más amplificación de señales además de la amplificación de señales por RNAscope.
30
35
40

(3) Sistema RNAscope + TSA (Figura 4)

En aún otra realización se utilizó el método para amplificación de señales por ISH basada en TSA en combinación con RNAscope®. En un aspecto, el sistema RNAscope® comprende un conjunto de dos o más sondas de captura, una pluralidad de sondas de marcación, una pluralidad de amplificadores y una pluralidad de preamplificadores. El ácido nucleico diana se hibrida con el conjunto de sondas de captura. El conjunto de sondas de captura se hibrida luego con un preamplificador. El preamplificador se hibrida además con una pluralidad de amplificadores. Cada amplificador se hibrida luego con una pluralidad de sondas de marcación. Cada sonda de marcación de la estructura del complejo de RNAscope® se conjuga con una molécula de HRP formando un complejo de HRP-LP. El complejo de HRP-LP se une luego a una pluralidad de moléculas de tiramida-biotina o fluoróforo-biotina. En esta operación, el complejo de HRP-LP cataliza que múltiples copias de tiramida-biotina o fluoróforo-biotina se unan covalentemente a componentes de proteínas ricos en electrones en las inmediaciones de sitios de unión de LP-HRP. La tiramida-biotina o fluoróforo-biotina es posteriormente detectada mediante marcadores de detección. Los marcadores de detección son una combinación de avidina/estreptavidina-HRP y sustrato cromogénico o una combinación de avidina/estreptavidina-AP y sustrato cromogénico. La HRP o AP de los complejos de avidina/estreptavidina-HRP o avidina/estreptavidina-AP es visualmente detectada mediante sustratos cromogénicos tales como DAB y Fast Red. Puesto que se pueden depositar muchas copias de tiramida-biotina o fluoróforo-biotina alrededor de cada sitio de
45
50
55

unión de LP-HRP, la intensidad de la señal final, que es la suma de la amplificación RNAscope y la amplificación TSA, resulta significativamente aumentada.

5 En otras realizaciones del método para amplificación de señales por ISH basada en TSA, se puede también conjugar tiramida con otros haptenos tales como digoxigenina (DIG), trinitrofenilo (TNP; del inglés, trinitrophenyl), dinitrofenilo (DNP) y colorantes fluorescentes. Cuando se emplean moléculas de colorante fluorescente en la conjugación de tiramida, los productos de conjugación de tiramida-colorante pueden ser directamente empleados en un sistema RNAscope-TSA para una detección de fluorescencia (FISH) sencilla y eficaz.

1.2. Mejora de la razón amplificador/preamplificador en RNAscope®

10 La combinación del método RNAscope® con métodos generales para la amplificación de señales por ISH descritos en esta descripción puede ser más afinada para aumentar la sensibilidad y la especificidad de la amplificación de señales. En este planteamiento de RNAscope® + amplificación general de señales por ISH, la mayor contribución del ensayo RNAscope® es su especificidad. El sistema RNAscope® también proporciona una modesta amplificación de señales de la diana de ácido nucleico con alta especificidad. Una de las contribuciones de los métodos generales para la amplificación de señales por ISH es su capacidad potenciadora de señales. De esta manera, además de la
15 modesta capacidad para amplificación de señales proporcionada por RNAscope®, los métodos generales para la amplificación de señales por ISH permiten amplificar más la señal del ácido nucleico diana a un nivel mucho mayor.

Un posible problema es que los métodos generales para la amplificación de señales por ISH no sólo amplifican señales positivas ciertas sino también señales positivas falsas. De esta manera, una simple combinación de RNAscope® con métodos generales para la amplificación de señales por ISH afronta el problema del elevado ruido de fondo en la detección de señales. La presente descripción describe un modo inteligente para reducir el nivel de las señales positivas falsas.

Un factor equilibrador para la combinación del método RNAscope® con métodos generales para la amplificación de señales por ISH descritos en esta descripción es el tamaño del preamplificador empleado en RNAscope®. El preamplificador del sistema RNAscope® podría ser una molécula muy grande si se diseñara para que se uniera a un gran número de amplificadores. Por ejemplo, el preamplificador puede tener la capacidad para hibridarse con más de 20 amplificadores. Dicha molécula grande es propensa a unirse inespecíficamente en la matriz celular durante la hibridación *in situ*. Cuando uno de los preamplificadores se una inespecíficamente a la muestra, atraerá hacia sí al mismo gran número de amplificadores y sondas de marcación que cuando se une a un ácido nucleico diana. En el caso en que se utiliza el sistema RNAscope® solo, puede que el número de sondas de marcación que se unen a los pocos preamplificadores de unión inespecífica no genere ninguna señal observable. Sin embargo, si la señal de estas sondas de marcación es más potenciada mediante la adicional amplificación de señales por una subsiguiente amplificación general de señales por ISH, la señal positiva falsa será lo suficientemente elevada para ser detectada.

Un planteamiento para reducir dicha señal positiva falsa es reducir el tamaño del preamplificador para que, en primer lugar, sea menos probable que quede atrapado en la matriz celular y, en segundo lugar, incluso cuando quede unido inespecíficamente en la muestra, sólo se hibride con él un número más pequeño de moléculas de amplificador. Como resultado, es probable que la señal producida por la unión inespecífica sea demasiado pequeña para ser detectada incluso cuando la señal es potenciada mediante la amplificación general de señales por ISH. En una realización de este planteamiento, se diseña un preamplificador para que se una a entre 1 y 16 amplificadores. En una realización más preferida, se diseña un preamplificador para que se una a entre 2 y 10 amplificadores. En otra realización preferida, se diseña un preamplificador para que se una a entre 2 y 5 amplificadores.

Al equilibrar las potencias de amplificación y la especificidad de los sistemas RNAscope® y TSA en el ensayo, se ha alcanzado una razón óptima de señal a ruido para la detección de RNA *in situ* en una muestra tisular clínica rutinaria (véanse el Ejemplo 1 y la Figura 5).

2. Detección de ácido nucleico diana mediante el sistema RNAscope®

45 Un potente método de hibridación *in situ* llamado RNAscope® ha sido recientemente desarrollado por Advanced Cell Diagnostics, Inc. (Patente de EE.UU. n.º 7.709.198). Puesto que RNAscope® es parte del método descrito en la presente memoria, más adelante se describirá el principio operativo de RNAscope® para una mejor comprensión.

El sistema RNAscope® permite la visualización directa de RNA *in situ*. En este método se utilizan los conjuntos de sondas oligonucleotídicas y los nuevos sistemas para amplificación de señales descritos más adelante. El ensayo puede ser utilizado sobre una diversidad de tipos de muestra, incluyendo células en cultivo, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; del inglés, peripheral blood mononuclear cells), tejido congelado, y tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE). Además, en el ensayo se pueden utilizar reactivos de detección tanto cromogénicos como fluorescentes.

La tecnología de ensayo RNAscope® proporciona ensayos de ácido nucleico multiplex en células individuales (véase la Figura 1). En el meollo de esta tecnología está el diseño de sondas "en doble Z", que permite una potente amplificación de señales de hibridación específicas sin amplificar eventos inespecíficos. Cada sonda de captura ("Z")

tiene una secuencia, específica para la diana, que se une al mRNA diana, un espaciador, y una secuencia de "cola". Dos sondas de captura (doble Z) se hibridan contiguamente con un mRNA diana, y las dos secuencias de "cola" forman un sitio de hibridación de 28 bases para el preamplificador. El diseño de sondas en doble Z asegura una elevada fidelidad de la amplificación de señales porque: 1) es muy improbable que una pareja de sondas de la diana se hibriden inespecíficamente yuxtapuestas entre sí para formar un sitio ligante para el preamplificador; y 2) tampoco la cola sola puede unirse eficazmente al preamplificador bajo las condiciones de ensayo. El preamplificador, el amplificador y la sonda de marcación se hibridan secuencialmente con cada pareja de sondas de captura, lo que da lugar a la acumulación de hasta 8000 moléculas de marcador por 1 kb de RNA diana. La sonda de marcación se puede conjugar con un fluoróforo o una enzima cromogénica (por ejemplo, HRP o AP), lo que permite la visualización de las señales de hibridación bajo un microscopio estándar de campo claro o de epifluorescencia, respectivamente. Con una sonda de marcación fluorescente, las señales pueden contener al menos 100 veces más moléculas fluorescentes que con los métodos tradicionales por ISH fluorescente para RNA y son fácilmente visibles bajo un microscopio de fluorescencia estándar.

Además, se han construido múltiples amplificadores de señales, cada uno de los cuales reconoce una secuencia de cola única en la sondas de la diana, lo que permite la visualización simultánea de múltiples RNAs diana. Resulta importante que este ensayo sea compatible con el RNA parcialmente degradado presente en tejidos FFPE archivados ya que las parejas de sondas en doble Z se dirigen a regiones cortas de ~50 nucleótidos de longitud.

En un ejemplo se empleó el sistema RNAscope[®] para detectar un ácido nucleico diana. En el método se proporciona una muestra que comprende una o más células. La célula examinada comprende, o de ella se sospecha que comprende, el ácido nucleico diana. En el ensayo se proporcionan: un conjunto de sondas de captura que comprende dos o más sondas de captura, una sonda de marcación que comprende un marcador, y opcionalmente preamplificadores y amplificadores.

En el método, el conjunto de sondas de captura se hibrida, en la célula, con el ácido nucleico diana. La sonda de marcación es capturada por el conjunto de sondas de captura, capturándose de este modo la sonda de marcación para el ácido nucleico diana. Luego se detecta la señal del marcador. Puesto que el marcador está asociado con el ácido nucleico diana a través de las sondas de captura, la presencia del (de los) marcador(es) en la célula indica la presencia de la(s) correspondiente(s) diana(s) de ácido nucleico en la célula. Los métodos son opcionalmente cuantitativos. Por lo tanto, se puede medir la intensidad de la señal y se puede correlacionar la intensidad de la señal con una cantidad del ácido nucleico diana en la célula. Como otro ejemplo, se puede someter una mancha de señales a recuento para cada copia del ácido nucleico diana con objeto de cuantificarlas.

En un aspecto, las sondas de marcación se unen directamente a las sondas de captura. En otro aspecto, las sondas de marcación son capturadas indirectamente por las sondas de captura, por ejemplo, a través de la unión de preamplificadores y/o amplificadores. El uso de amplificadores y preamplificadores puede ser ventajoso a la hora de aumentar la intensidad de las señales ya que pueden facilitar la unión de grandes números de sondas de marcación a cada diana de ácido nucleico.

Aunque en la presente tecnología se pueden emplear tanto el planteamiento de captura directa como el planteamiento de captura indirecta, se prefiere el planteamiento de captura indirecta porque permite que la sonda de marcación sea independiente de la diana, y una descripción ulterior mostrará que puede ofrecer mejores especificidad y sensibilidad.

En el ensayo RNAscope[®] se diseña especialmente la sonda de captura. En cada sonda de captura hay al menos una sección, T, complementaria de una sección en la molécula diana, y otra sección, L, complementaria de una sección en la sonda de marcación. Las secciones T y L están conectadas por una sección C. En una realización de captura indirecta, se incorporan dos sondas de captura adyacentes a un conjunto de sondas que se dirigen a un gen de interés. Se diseñan T1 y T2 para que sean complementarias de dos secciones únicas y adyacentes en el ácido nucleico diana. L1 y L2, que pueden ser iguales o diferentes, son complementarias de dos secciones adyacentes en la sonda de marcación. Sus secciones ligantes, T, L o ambas, se diseñan para que el enlace entre la sonda de marcación y la diana sea inestable y tienda a caerse a la temperatura de hibridación cuando sólo está en su sitio una de las sondas de captura. Dicho diseño permitiría una especificidad excepcional porque la sonda de marcación que genera señales sólo se puede fijar al gen diana de interés cuando dos sondas de captura independientes reconocen la diana y se unen a las secuencias adyacentes de, o muy próximas a, el gen diana. En una realización se ajusta la temperatura de fusión, T_m , de las secciones T de las dos sondas de captura para que sea significativamente superior a la temperatura de hibridación, mientras que la T_m de las secciones L es inferior a la temperatura de hibridación. Como resultado, las secciones T se unen fuerte y establemente a la molécula diana durante la hibridación, mientras que las secciones L se unen débil e inestablemente a la sonda de marcación si sólo está presente una de las sondas de captura. Sin embargo, si están presentes ambas sondas de captura, la combinación de L1 y L2 mantiene fuerte y establemente la sonda de marcación durante la hibridación. Por ejemplo, las secciones T pueden tener una longitud de 20-30 nucleótidos, mientras que las secciones L tienen una longitud de 13-15 nucleótidos; C puede tener una longitud de 0 a 10 nucleótidos, por ejemplo, 5 nucleótidos. En otra realización, la T_m de las secciones T es inferior a la temperatura de hibridación mientras que la T_m de las secciones L es sustancialmente superior. Del mismo modo, el enlace entre la sonda de marcación y la diana sólo puede sobrevivir a la hibridación cuando ambas sondas de

captura se hibridan con la diana de una manera cooperativa. Véase la Patente de EE.UU. nº 7.709.198 para detalles adicionales sobre el diseño de sondas de captura.

5 En las clases anteriores de realizaciones, las sondas de captura se hibridan preferiblemente con secuencias polinucleotídicas no solapantes en sus respectivas dianas de ácido nucleico. Las sondas de captura pueden cubrir, aunque no es necesario, una región contigua de la diana de ácido nucleico. Se proporcionan opcionalmente, y se hibridan con la diana, sondas bloqueadoras, polinucleótidos que se hibridan con regiones de la diana de ácido nucleico no ocupadas por sondas de la diana. Para una diana de ácido nucleico dada, las correspondientes sondas de captura y sondas bloqueadoras son preferiblemente complementarias de secuencias no solapantes y físicamente distintas en la diana de ácido nucleico, secuencias no solapantes que son preferiblemente, aunque no necesariamente, contiguas. El que las sondas de captura y las sondas bloqueadoras opcionales sean contiguas entre sí puede, en algunas realizaciones, potenciar la fuerza de hibridación, eliminar la estructura secundaria y asegurar una señal más consistente y reproducible.

10 En la detección de dianas de ácido nucleico en una célula, la célula es típicamente fijada y permeabilizada antes de la hibridación de las sondas de captura para retener las dianas de ácido nucleico en la célula y permitir que las sondas de captura, las sondas de marcación, etc., entren en la célula. La célula es opcionalmente lavada para eliminar materiales no capturados para una de las dianas de ácido nucleico. La célula puede ser lavada después de cualquiera de diversas operaciones; por ejemplo, después de la hibridación de las sondas de captura con las dianas de ácido nucleico para eliminar sondas de captura no unidas, después de la hibridación de los preamplificadores, amplificadores y/o sondas de marcación con las sondas de captura, y/o similares.

20 En algunas realizaciones, la célula está en suspensión durante todas, o la mayoría de, las operaciones del método por facilidad de manipulación. Sin embargo, los métodos son también aplicables a células en muestras de tejido sólido (por ejemplo, cortes tisulares) y/o células inmovilizadas sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos u otra superficie). De esta manera, en una clase de realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o la célula está en suspensión durante las operaciones de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión en la muestra y durante las operaciones de hibridación, captura, lavado opcional y detección. En otras realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y la célula está fija sobre un sustrato durante las operaciones de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión durante las operaciones de hibridación, captura y lavado opcional y estar inmovilizada sobre un sustrato durante la operación de detección. En otras realizaciones, la muestra comprende un corte tisular.

3. Detección multiplex de ácidos nucleicos

Un aspecto de la descripción proporciona ensayos multiplex de ácidos nucleicos. De este modo, una clase general de realizaciones incluye métodos para detectar dos o más ácidos nucleicos diana. En la sección anterior se ha descrito un método para detectar un solo ácido nucleico diana usando el sistema RNAscope[®]. En esta sección se describirá primero un método para detectar un solo ácido nucleico diana usando una combinación de RNAscope[®] y un método general para amplificación de señales por ISH. A continuación se describirá un método para detectar dos o más ácidos nucleicos diana usando una combinación de RNAscope[®] y un método general para la amplificación de señales por ISH. La detección de dos o más ácidos nucleicos diana puede llevarse a cabo de la misma manera que la detección de un solo ácido nucleico diana excepto por el uso de diferentes marcadores y sondas específicos de la diana.

En una realización se proporciona un método para detectar un solo ácido nucleico diana. En este método se proporciona una muestra que comprende, o de la que se sospecha que comprende, el ácido nucleico diana. También se proporcionan: un conjunto de dos o más sondas de captura, en donde las sondas de captura son capaces de unirse al ácido nucleico diana, múltímeros generadores de señales y sondas de amplificación de señales.

El múltímero generador de señales comprende al menos una sonda de marcación. En una realización preferida, el múltímero generador de señales comprende una sonda de marcación y un amplificador. El amplificador es capaz de hibridarse con la sonda de marcación y es también capaz de hibridarse con el conjunto de dos o más sondas de captura. En otra realización preferida, el múltímero generador de señales comprende una sonda de marcación, un amplificador capaz de hibridarse con el marcador, y un preamplificador capaz de hibridarse con el amplificador y también capaz de hibridarse con el conjunto de dos o más sondas de captura.

Las sondas de amplificación de señales están hechas de componentes utilizados en ensayos generales para amplificación de señales por ISH. Por ejemplo, en una realización en que se combina el ensayo RNAscope[®] con un ensayo de ISH basada en biotina-(estrept)avidina, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de biotina que es capaz de conjugarse con la sonda de marcación de RNAscope[®], una molécula de avidina/estreptavidina que es capaz de unirse a la molécula de biotina, y moléculas de biotina adicionales que están conjugadas con HRP, AP o fluoróforo y son capaces de unirse a la molécula de avidina/estreptavidina.

En una realización en que se combina el ensayo RNAscope[®] con un ensayo de ISH basada en anticuerpo, la sonda

de amplificación de señales comprende: una molécula de HRP, DNP, fluoróforo o AP que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, uno o más anticuerpos primeros que son capaces de unirse a la molécula de HRP, DNP, fluoróforo o AP, y uno o más anticuerpos segundos que están conjugados con HRP, polímero-HRP, AP o polímero-AP y son capaces de unirse a uno o más de los anticuerpos primeros.

- 5 En una realización en que se combina el ensayo RNAscope[®] con un ensayo de ISH basada en TSA, la sonda de amplificación de señales comprende: una molécula de HRP que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, una pluralidad de moléculas de tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo que son capaces de reaccionar con la molécula de HRP, y marcadores de detección que son capaces de unirse a las moléculas de tiramida-biotina o tiramida-fluoróforo y, de este modo, presentan visualmente el ácido nucleico diana. Los marcadores de detección son una combinación de avidina/estreptavidina-HRP y un sustrato cromogénico o una combinación de avidina/estreptavidina-HRP y un sustrato cromogénico.

10 En el método para detectar un ácido nucleico diana, se proporciona primero una muestra que comprende, o de la que se sospecha que comprende, el ácido nucleico diana. Luego se hibrida el ácido nucleico diana con el conjunto de dos o más sondas de captura. Luego se añade el multímero generador de señales, que se hibrida con el conjunto de dos o más sondas de captura y, por ello, es capturado con el ácido nucleico diana. Luego se añaden secuencialmente componentes de la sonda de amplificación de señales a la disolución de ensayo, componentes que se unen al multímero generador de señales y, por ello, son capturados con el ácido nucleico diana. Los marcadores de la sonda de amplificación de señales son luego detectados mediante un citómetro de flujo u otros dispositivos de visualización. La presencia, ausencia o cantidad de los marcadores permite una detección sensible y la localización del ácido nucleico diana en la muestra.

15 En el método para detectar dos ácidos nucleicos diana, se proporciona una muestra que comprende, o de la que se sospecha que comprende, los dos ácidos nucleicos diana. También se proporcionan dos o más conjuntos de sondas de captura, comprendiendo cada conjunto dos o más sondas de captura. El primer conjunto de sondas de captura es capaz de hibridarse con el primer ácido nucleico diana pero no con el segundo ácido nucleico diana, y el segundo conjunto de sondas de captura es capaz de hibridarse con el segundo ácido nucleico diana pero no con el primer ácido nucleico diana. Se proporcionan además un primer multímero generador de señales y una primera sonda de amplificación de señales, junto con un segundo multímero generador de señales y una segunda sonda de amplificación de señales.

20 El primer multímero generador de señales puede hibridarse con el primer conjunto de sondas de captura pero no con el segundo conjunto de sondas de captura. El segundo multímero generador de señales puede hibridarse con el segundo conjunto de sondas de captura pero no con el primer conjunto de sondas de captura. El primer multímero generador de señales tiene una primera sonda de marcación que se hibrida directa o indirectamente, por medio de preamplificadores y amplificadores, con el primer conjunto de sondas de captura. El segundo multímero generador de señales tiene una segunda sonda de marcación que se hibrida directa o indirectamente, por medio de preamplificadores y amplificadores, con el segundo conjunto de sondas de captura. La primera sonda de marcación es diferente de la segunda sonda de marcación.

25 El primer multímero generador de señales y el segundo multímero generador de señales están marcados secuencialmente con diferentes sondas de amplificación de señales. Las dos sondas de amplificación de señales pueden ser una CISH de color dual o una FISH de color dual.

30 En una detección dúplex de ácido nucleico se llevarán a cabo al menos tres operaciones. En la primera operación, el primer multímero generador de señales es marcado con la primera sonda de amplificación de señales. En una realización ejemplar, la primera sonda de amplificación de señales es una sonda de amplificación de señales por ISH basada en TSA que se unió con la sonda de marcación de la amplificación RNAscope[®] a través de un complejo de LP-HRP conjugados. Una vez que se ha llevado a cabo el método RNAscope[®], la sonda de marcación de RNAscope[®] se conjuga primero con HRP. El complejo de LP-HRP conjugados es luego detectado con una incubación secuencial de tiramida-biotina, estreptavidina-HRP y sustrato cromático DAB, lo que da lugar a una señal marrón para el primer ácido nucleico diana. En la segunda operación, los agentes de marcación residuales para el primer multímero generador de señales son bloqueados con objeto de evitar que los marcadores reaccionen con el segundo multímero generador de señales que se va a añadir en la tercera operación. En la tercera operación, el segundo multímero generador de señales es marcado con la segunda sonda de amplificación de señales. En una realización ejemplar, una vez que se ha llevado a cabo el método RNAscope[®], la sonda de marcación de RNAscope[®] se conjuga primero con dinitrofenilo (DNP). El complejo de LP-DNP conjugados es luego detectado con una incubación secuencial de anti-DNP-AP y sustrato cromático Fast Red, lo que da lugar a una señal roja para el segundo ácido nucleico diana.

35 Los métodos anteriores son también útiles para la detección multiplex de ácidos nucleicos, incluyendo la detección secuencial de más de tres dianas de ácido nucleico. De esta manera, la célula que opcionalmente comprende, o de la que se sospecha que comprende, una diana de ácido nucleico tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima o incluso más puede ser analizada de un modo similar al anteriormente descrito.

4. Kits

Aún otra clase general de aspectos proporciona un kit para detectar uno o más ácidos nucleicos diana. En un aspecto, el kit incluye un ácido nucleico diana, un componente para RNAscope® y un componente para la amplificación general de señales por ISH. En una realización, el kit incluye un ácido nucleico diana, conjuntos de sondas de captura capaces de hibridarse con el ácido nucleico diana, un multímero generador de señales capaz de hibridarse con un conjunto de sondas de captura, y una sonda de amplificación de señales capaz de unirse a la sonda de marcación. El multímero generador de señales comprende una sonda de marcación, y la sonda de amplificación de señales comprende un marcador. En cierta realización, el multímero generador de señales del kit puede incluir amplificadores y preamplificadores apropiados. El kit puede incluir también un soporte sólido. El componente del kit para la amplificación de señales por ISH puede ser cualquier sistema para amplificación de señales por ISH. Por ejemplo puede ser los tres sistemas para amplificación de señales por ISH descritos en la Sección 1.1 de la presente descripción. El kit se puede utilizar para la detección de cualesquier ácidos nucleicos descritos anteriormente en esta solicitud, incluyendo, pero sin limitarse a, DNA, cDNA, RNA y mRNA.

En realizaciones multiplex de kits, muchos componentes pueden ser representados por dos o más subconjuntos diferentes. Por ejemplo, las sondas de marcación pueden incluir dos subconjuntos que se hibridan, respectivamente, con los ácidos nucleicos diana primero y segundo. El multímero generador de señales puede incluir dos sondas de marcación diferentes, cada una de las cuales se hibrida directa o indirectamente con las sondas de captura primera y segunda. El kit puede incluir también dos sondas de amplificación de señales diferentes, cada una de las cuales se conjuga con las sondas de marcación primera y segunda. Las distintas sondas de amplificación de señales son distinguibles entre sí al unirse a diferentes sustratos cromáticos. En otro aspecto, el kit incluye un agente bloqueador que es capaz de bloquear los agentes de marcación residuales para el primer multímero generador de señales, asegurando de este modo la unión específica del segundo multímero generador de señales con el segundo ácido nucleico diana.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

El ejemplo siguiente muestra cómo una combinación del método RNAscope® y métodos generales para la amplificación de señales por ISH adicionalmente potenciados por una razón preamplificador/amplificador optimizada alcanza una especificidad y una sensibilidad significativamente mejoradas para la detección de RNA *in situ*.

Ejemplo 1. Ensayo RNAscope® + amplificación general de señales por ISH

El procedimiento de ensayo básico se puede realizar en un día e incluye generalmente las operaciones siguientes. Se proporciona una muestra que contiene una pluralidad de células de las que se sospecha que comprenden un ácido nucleico diana HPRT1. Una vez fijadas y permeabilizadas, las células, fijas sobre un soporte sólido o en suspensión, se hibridan con la serie siguiente de sondas oligonucleotídicas. En primer lugar, se hibrida un conjunto de sondas de captura con el RNA diana dentro de las células. A continuación, se hibridan moléculas de preamplificador con las sondas de captura, lo que proporciona un puente para la hibridación de moléculas de amplificador. Múltiples moléculas de amplificador se hibridan además con un preamplificador, por ejemplo, hasta 20 amplificadores por cada preamplificador. Luego se hibridan múltiples sondas de marcación con un amplificador, por ejemplo, hasta 20 sondas de marcación por cada amplificador.

La intensidad de las señales es adicionalmente potenciada mediante una amplificación de señales por ISH basada en TSA. Se conjuga una HRP con cada sonda de marcación. Luego se añade un reactivo que contiene moléculas de tiramida-biotina a la disolución de ensayo. La sonda de marcación conjugada con HRP cataliza que múltiples copias de tiramida-biotina se unan covalentemente a los componentes de proteínas ricos en electrones en las inmediaciones del sitio de unión de HRP-sonda de marcación. Luego se detecta la molécula de tiramida-biotina mediante avidina/estreptavidina-HRP, pudiéndose visualizar la avidina/estreptavidina-HRP mediante el sustrato de marcación DAB, que presenta un color marrón. Las señales se detectan, por ejemplo, bien con un microscopio regular de fluorescencia con filtros apropiados o bien con un citómetro de flujo multicolor. Se realizó una comparación de las detecciones de mRNA del gen HPRT1 de pocas copias en cortes FFPE de cáncer de mama humano, realizadas con RNAscope® solo o con RNAscope® + amplificación de señales por ISH basada en TSA. Como se muestra en la Figura 5, las señales obtenidas con el método RNAscope® + amplificación de señales por ISH basada en TSA eran significativamente más intensas que las obtenidas con el método RNAscope® solo.

Se evitó o minimizó la unión inespecífica diseñando conjuntos de sondas que se dirigían a una secuencia de mRNA específica usando un diseño de sonda en doble "Z". Las sondas de captura en doble "Z" se diseñaron basándose en la secuencia del gen HPRT1 y fueron previamente exploradas frente a la base de datos GenBank para asegurar la mínima hibridación cruzada con secuencias de ácido nucleico no pretendidas. En el diseño en doble "Z", cada una de dos sondas vecinas contiene una secuencia que se hibrida con la diana, por ejemplo, con una longitud de 20 a 30 bases y una T_m significativamente por encima de la temperatura de ensayo, y una secuencia que se hibrida con el preamplificador, por ejemplo, con una longitud de sólo 14 bases y una T_m bien por debajo de la temperatura de ensayo. Como resultado, una sola sonda de captura es capaz de unirse fuerte y establemente al RNA diana durante la hibridación, pero se unirá débil e inestablemente al preamplificador a causa de la región de homología de 14 pares de bases que tiene una T_m bien por debajo de la temperatura de ensayo. Sin embargo, cuando están presentes dos

sondas de captura en posiciones vecinas, la fuerza de hibridación combinada, por ejemplo, de 28 pares de bases complementarias, mantiene fuerte y establemente el preamplificador a la temperatura de ensayo permitiendo que tenga lugar la amplificación de señales. Dicho diseño en doble "Z" asegura una elevada especificidad de detección y simplifica el diseño de sondas para la detección simultánea de múltiples dianas.

5 A causa de la capacidad potenciadora de señales del método de amplificación de señales por ISH basada en TSA, la unión inespecífica del preamplificador en la matriz celular durante la hibridación *in situ* podría ser amplificada y, en consecuencia, producir una señal positiva falsa. Este problema llega a ser grave cuando se diseña el preamplificador para que se una a un gran número de amplificadores y, de esta manera, tenga un gran tamaño. La potencia de amplificación se alcanza a costa de la especificidad ligante perdida. Resolvimos este problema reduciendo
10 moderadamente el número de amplificadores a los que se va a unir un preamplificador a diseñar. El resultado final es una razón de señal a ruido aumentada. La capacidad de amplificación perdida se ve compensada por la capacidad potenciadora de señales de los métodos de amplificación de señales por ISH, particularmente el método de amplificación de señales por ISH basada en TSA.

15 En este ensayo se han diseñado y examinado varios amplificadores. Se diseña el preamplificador PREAMP1 para que se una a 20 amplificadores. Se diseña el preamplificador PREAMP2 para que se una a 16 amplificadores. Se diseña el preamplificador PREAMP3 para que se una a 10 amplificadores. Se diseña el preamplificador PREAMP4 para que se una a 5 amplificadores.

20 Los resultados experimentales muestran que PREAMP2 tiene una razón de señal a ruido mejorada con respecto a PREAMP1. PREAMP3 y PREAMP4 tienen la mejor razón de señal a ruido entre todos los PREAMPs examinados (datos no mostrados).

Ejemplo 2. Ensayo RNAscope® + amplificación general de señales por ISH multiplex

25 El siguiente ejemplo pronosticador de una amplificación multiplex muestra cómo el método descrito en la presente descripción permite detectar dos ácidos nucleicos diana con elevada sensibilidad. Para explorar el potencial de la descripción mostrada para la detección *in situ* de transcritos de RNA de pocas copias y su capacidad para detección multiplex, se emplean los genes 18S y Her-2 como genes modelo.

30 En la primera amplificación, el gen 18S es capturado por sondas de captura diseñadas para 18S. La sonda de captura para 18S se diseña del modo descrito en el Ejemplo 1. El gen 18S hibridado con sonda de captura es luego secuencialmente hibridado con preamplificadores, amplificadores y sondas de marcación. Luego se conjuga la sonda de marcación con HRP. Luego se detectan los complejos de LP-HRP conjugados con incubaciones sucesivas de tiramida-biotina, estreptavidina-HRP y DAB. El producto de la hibridación produce un color marrón en las posiciones donde se detectan genes diana 18S.

35 Antes de comenzar la segunda amplificación, se bloquean las HRPs residuales de la primera amplificación. En la segunda amplificación, el gen Her-2 es capturado por sondas de captura diseñadas para Her-2. La sonda de captura para Her-2 se diseña del modo descrito en el Ejemplo 1. El gen Her-2 hibridado con sonda de captura es luego secuencialmente hibridado con preamplificadores, amplificadores y sondas de marcación. Luego se conjuga la sonda de marcación con dinitrofenilo (DNP). Luego se detectan los LP-DNPs conjugados mediante incubación con anti-DNP-AP. Luego se detecta la molécula de fosfatasa alcalina (AP) en el complejo de anti-DNP-AP mediante el reactivo colorante Fast Red. El producto de la hibridación produce una señal roja para el gen diana Her-2.

40 En este ejemplo hemos demostrado que el método descrito en esta descripción puede ser empleado para detectar dos transcritos de RNA. La intensidad relativa de las señales puede ser utilizada para comparar los niveles de expresión génica de los dos genes.

REIVINDICACIONES

1. Una célula fijada y permeabilizada que comprende:

- (a) al menos un ácido nucleico diana;
- 5 (b) al menos un conjunto de dos o más sondas de captura capaces de hibridarse con dicho ácido nucleico diana;
- (c) un multímero generador de señales capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura, en donde dicho multímero generador de señales comprende una sonda de marcación; y
- (d) una sonda de amplificación de señales capaz de unirse con dicha sonda de marcación, en donde dicha sonda de amplificación de señales comprende:
 - 10 (i) una molécula de biotina que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, una molécula de avidina/estreptavidina que es capaz de unirse a dicha molécula de biotina, y moléculas de biotina adicionales que están conjugadas con peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP) o fluoróforos y son capaces de unirse a dicha molécula de avidina/estreptavidina;
 - 15 (ii) una molécula de HRP, AP, dinitrofenilo (DNP) o fluoróforo que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, uno o más anticuerpos primeros que son capaces de unirse a dicha molécula de HRP, AP, DNP o fluoróforo, y uno o más anticuerpos segundos que están conjugados con HRP, polímero-HRP, AP, polímero-AP o fluoróforo y son capaces de unirse a dichos uno o más anticuerpos primeros; o
 - 20 (iii) una molécula de HRP que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, una pluralidad de moléculas de tiramida-fluoróforo o una pluralidad de moléculas de tiramida-biotina o tiramida-hapteno que son capaces de reaccionar con dicha molécula de HRP, y
 - 25 marcadores de detección que permiten detectar visualmente dichas moléculas de tiramida-biotina o tiramida-hapteno;

en donde dicho conjunto de dos o más sondas de captura se hibridan con dicho ácido nucleico diana de la célula; dicho multímero generador de señales es capturado para dicho conjunto de dos o más sondas de captura y dicha sonda de amplificación de señales es capturada para dicha sonda de marcación de dicho multímero generador de señales.

30 2. Un corte tisular que comprende una célula, en donde la célula comprende:

- (a) al menos un ácido nucleico diana;
- (b) al menos un conjunto de dos o más sondas de captura capaces de hibridarse con dicho ácido nucleico diana;
- 35 (c) un multímero generador de señales capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura, en donde dicho multímero generador de señales comprende una sonda de marcación; y
- (d) una sonda de amplificación de señales capaz de unirse a dicha sonda de marcación, en donde dicha sonda de amplificación de señales comprende:
 - (i) una molécula de biotina que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación, una molécula de avidina/estreptavidina que es capaz de unirse a dicha molécula de biotina, y
 - 40 moléculas de biotina adicionales que están conjugadas con peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP) o fluoróforos y son capaces de unirse a dicha molécula de avidina/estreptavidina; o
 - (ii) una molécula de HRP, AP, dinitrofenilo (DNP) o fluoróforo que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación,
 - 45 uno o más anticuerpos primeros que son capaces de unirse a dicha molécula de HRP, AP, DNP o

- fluoróforo, y
- uno o más anticuerpos segundos que están conjugados con HRP, polímero-HRP, AP, polímero-AP o fluoróforo y son capaces de unirse a dichos uno o más anticuerpos primeros; o
- (iii) una molécula de HRP que es capaz de conjugarse con dicha sonda de marcación,
- 5 una pluralidad de moléculas de tiramida-fluoróforo o una pluralidad de moléculas de tiramida-biotina o tiramida-hapteno que son capaces de reaccionar con dicha molécula de HRP, y
- marcadores de detección que permiten detectar visualmente dichas moléculas de tiramida-biotina o tiramida-hapteno,
- 10 en donde dicho conjunto de dos o más sondas de captura se hibridan con dicho ácido nucleico diana de la célula; dicho múltiplo generador de señales es capturado para dicho conjunto de dos o más sondas de captura y dicha sonda de amplificación de señales es capturada para dicha sonda de marcación de dicho múltiplo generador de señales.
3. La célula de la reivindicación 1, donde la célula está:
- (i) en suspensión;
- 15 (ii) en una muestra de tejido sólido, preferiblemente en un corte tisular; o
- (iii) inmovilizada sobre un sustrato, donde preferiblemente el sustrato es un portaobjetos.
4. La célula de la reivindicación 1 ó 3, o el corte tisular de la reivindicación 2, en donde dicho hapteno se selecciona de entre dinitrofenilo (DNP), digoxigenina (DIG), trinitrofenilo (TNP) o un fluoróforo.
- 20 5. La célula de la reivindicación 1 ó 3, o el corte tisular de la reivindicación 2, en donde dichos marcadores de detección son una combinación de avidina/estreptavidina-HRP y un sustrato cromogénico, o una combinación de avidina/estreptavidina-AP y un sustrato cromogénico.
6. La célula, o el corte tisular de la reivindicación 5, en donde dicho sustrato cromogénico es seleccionado del grupo que consiste en: diaminobencidina (DAB) y Fast Red.
- 25 7. La célula, o el corte tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho múltiplo generador de señales comprende dicha sonda de marcación capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura.
8. La célula, o el corte tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho múltiplo generador de señales comprende dicha sonda de marcación y un amplificador hibridado con la sonda de marcación y capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura.
- 30 9. La célula, o el corte tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho múltiplo generador de señales comprende dicha sonda de marcación, un amplificador hibridado con la sonda de marcación, y un preamplificador hibridado con el amplificador y capaz de hibridarse con dicho conjunto de dos o más sondas de captura.
- 35 10. La célula, o el corte tisular de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la razón preamplificador:amplificador es entre 1:1-16, entre 1:2-10, o entre 1:2-5.
11. La célula, o el corte tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en: un DNA, un cDNA, un RNA, un mRNA, un rRNA, un miRNA y un siRNA.
12. La célula, o el corte tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un ácido nucleico diana comprende dos o más ácidos nucleicos diana diferentes.
- 40 13. La célula, o el corte tisular de la reivindicación 12, en donde dicha sonda de amplificación de señales es una sonda para hibridación *in situ* cromogénica (CISH) de color dual o una sonda para hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de color dual.
- 45 14. La célula, o el corte tisular de la reivindicación 13, en donde, en dicha sonda para CISH de color dual, la primera sonda de amplificación de señales comprende tiramida-biotina, estreptavidina-HRP y DAB, y la segunda sonda de amplificación de señales comprende anti-DNP-AP y Fast Red.

Figura 1. RNAScope

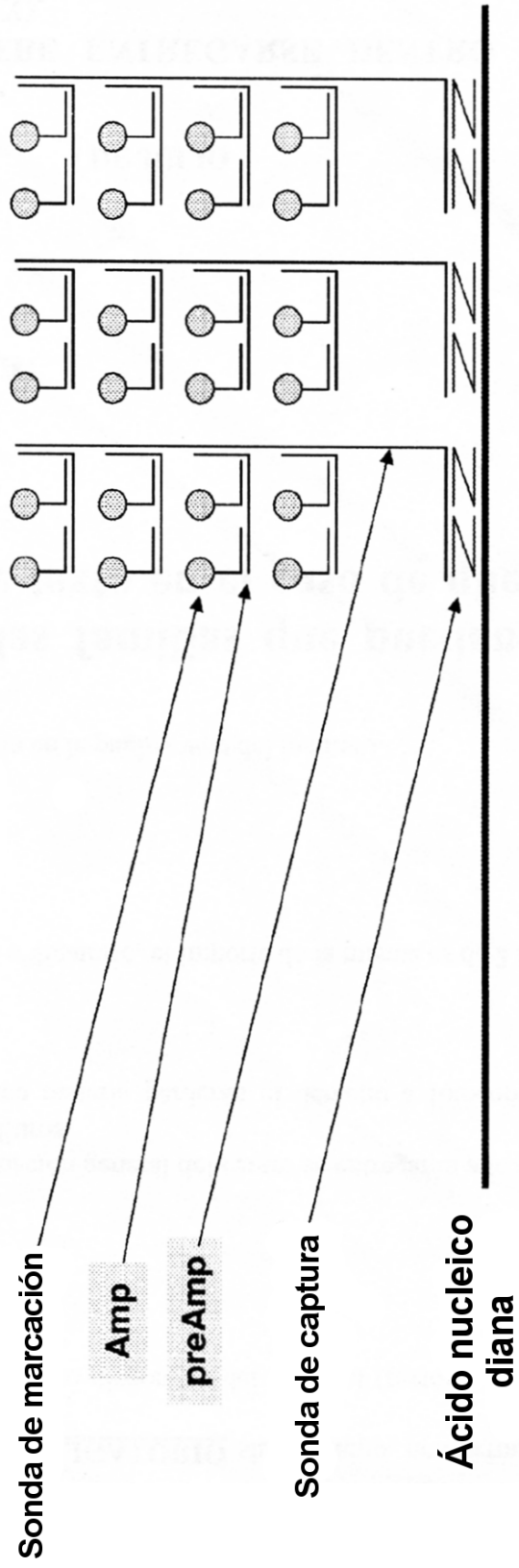


Figura 2. Amplificación RNAscope-biotina-avidina

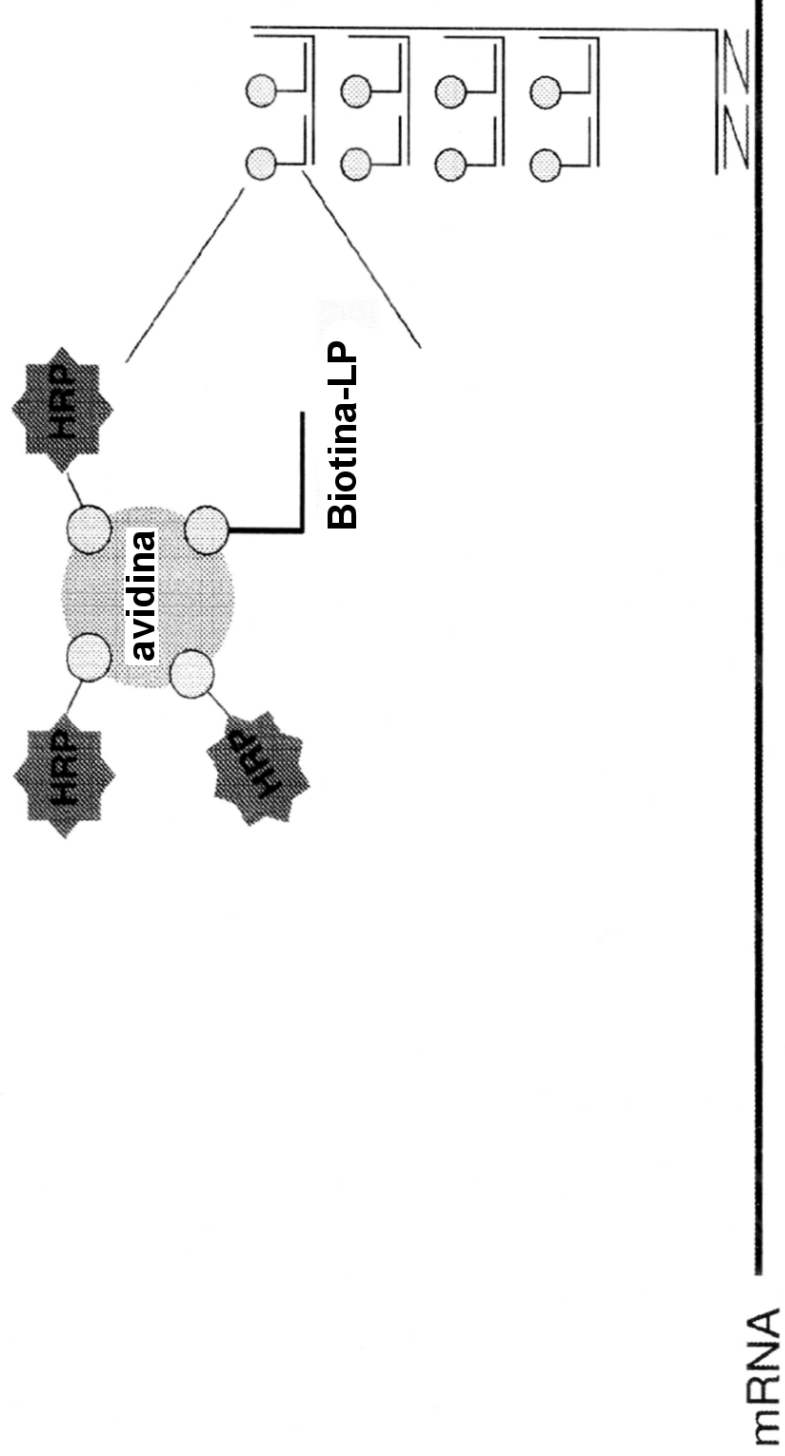


Figura 3. Amplificación RNAscope-anticuerpo

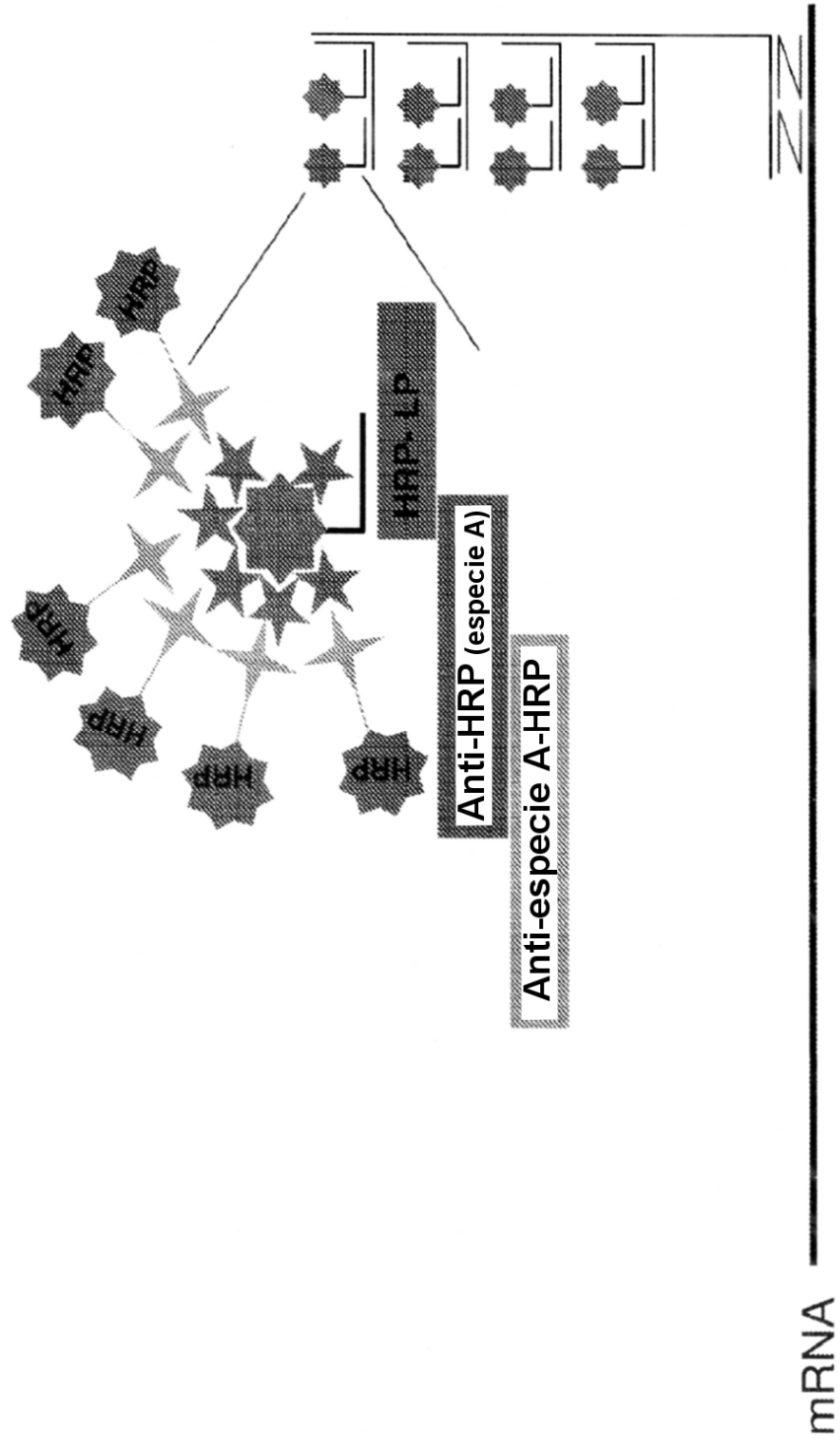


Figura 4. Amplificación RNAscope-TSA

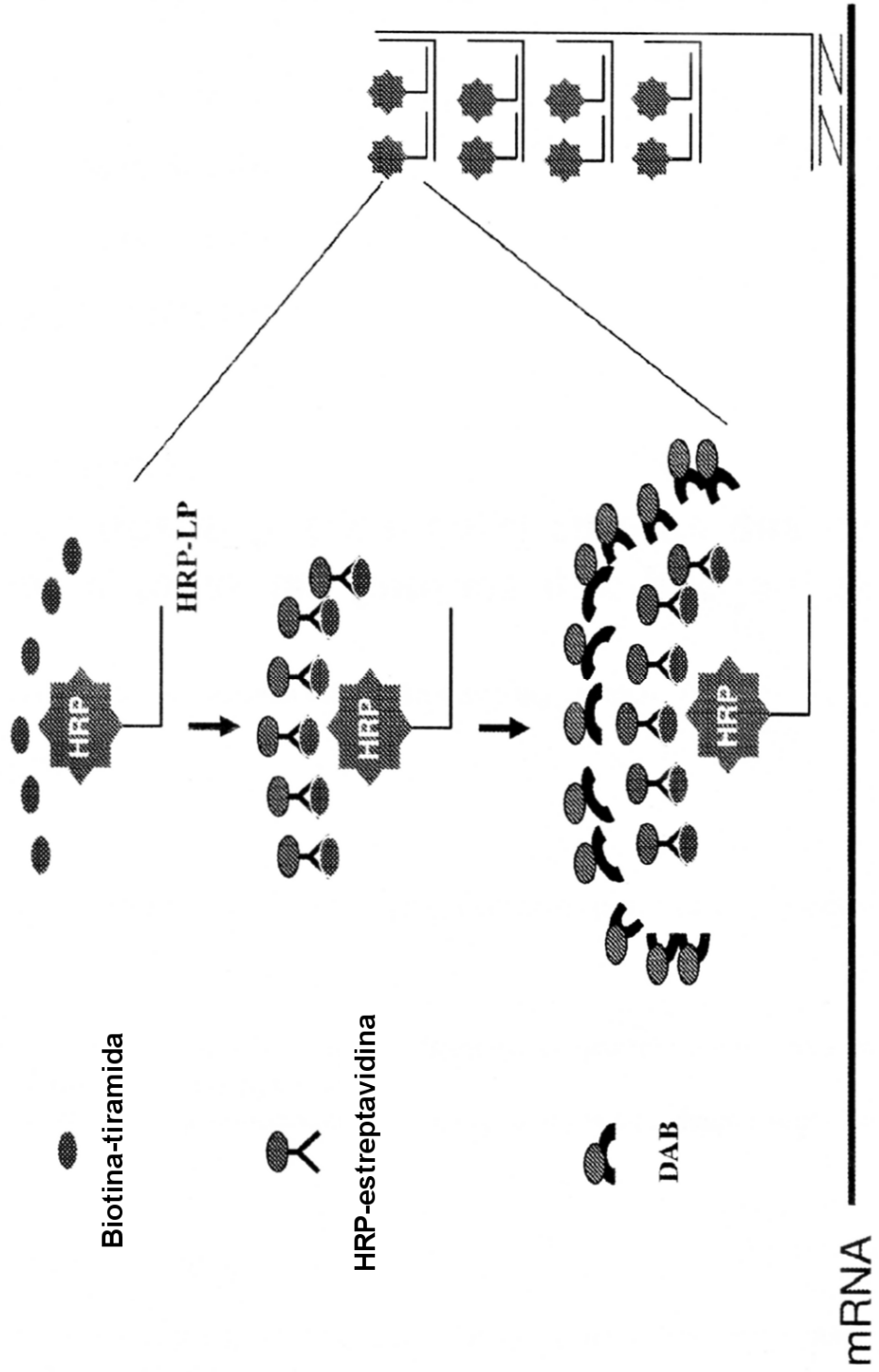
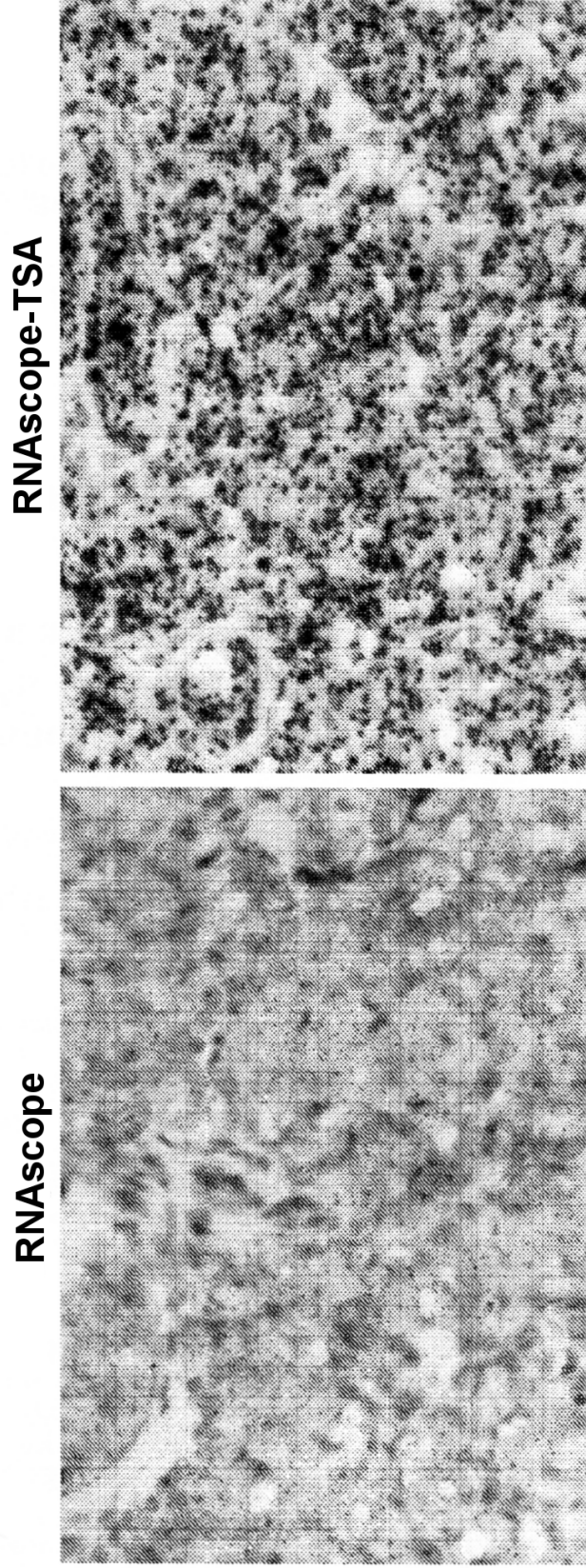


Figura 5. Comparación de RNAscope con RNAscope-TSA



Detección de mRNAs del gen HPRT1 de pocas copias en cortes FFPE de cáncer de mama humano con procedimientos RNAscope y RNAscope + TSA. La señal obtenida con RNAscope + TSA (a la derecha) fue significativamente más intensa que la obtenida con RNAscope solo (a la izquierda).