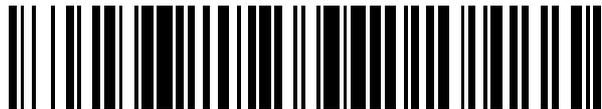


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 949**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

C12P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2009 PCT/US2009/002440**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09134327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2009 E 09739130 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2269065**

54 Título: **Métodos y reactivos para aumentar la sensibilidad de detección metalográfica enzimática**

30 Prioridad:

28.04.2008 US 150379

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

13.03.2018

73 Titular/es:

NANOPROBES, INC. (100.0%)

95 Horseblock Road

Yaphank, NY 11980

72 Inventor/es:

POWELL, RICHARD D.;

JOSHI, VISHWAS y

HAINFELD, JAMES F.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 658 949 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

Métodos y reactivos para aumentar la sensibilidad de detección metalográfica enzimática

5 Esta divulgación se refiere en general a materiales y métodos para la detección y tinción de dianas. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a materiales y métodos para la detección y tinción de componentes biológicos, marcadores de enfermedad y marcadores para procesos biológicos en células o tejidos, y cualquier otra entidad química específica que pueda seleccionarse como diana usando una sonda con una afinidad química o biológicamente específica o localizada microscópicamente.

10 La comprensión total de la estructura y función de un sistema biológico requiere una variedad de información estructural en una variedad de niveles de resolución. La comprensión racional de los sistemas biológicos y los procesos patológicos requiere la detección de la distribución, abundancia, localización y función de las moléculas y los procesos biológicos a nivel celular, subcelular y macromolecular.

15 Hay disponible una amplia variedad de métodos de marcaje y tinción biológicos para detectar y localizar dianas biológicas, cada uno con ventajas y limitaciones que se adecúan a diferentes aplicaciones. Además, la práctica de la medicina molecular depende de métodos precisos y fiables para la evaluación de laboratorio de la presencia, cantidad, distribución, densidad y forma de analitos diana, tanto a simple vista usando métodos como
 20 inmunotransferencia de tipo Western, transferencia de tipo Southern y Northern, tinción en gel e inmunotransferencia, como microscópicamente usando microscopía óptica y electrónica para evaluar la distribución celular de dianas tales como genes mediante hibridación *in situ*, proteínas mediante inmunohistoquímica y otras moléculas incluyendo pero no sin limitarse a hormonas, hidratos de carbono, enzimas y péptidos. Esto se logra mediante una variedad de procesos que usan una sonda, dirigida a la entidad considerada, unida a una etiqueta que
 25 luego genera, o bien a través de sus propiedades intrínsecas o bien por interacción específica con otros componentes aplicados posteriormente, una señal que se detecta, cuantifica o mapea para identificar la presencia, las ubicaciones y las cantidades de la diana.

30 Los ejemplos de sondas incluyen anticuerpos que reaccionan con una proteína específica, oligonucleótidos que son complementarios a una diana genética, péptidos que se unen a subunidades proteicas específicas, o sustratos que reaccionan con una enzima diana. Se usa una amplia variedad de métodos para la visualización de dianas: estos incluyen etiquetas fluorescentes; etiquetas particuladas tales como oro coloidal u otros metales, que pueden visualizarse directamente mediante microscopía electrónica, o ampliarse o hacerse visibles por microscopía óptica mediante otros métodos ópticos, o directamente a simple vista a través de la deposición de metal adicional a partir
 35 de disolución mediante autometalografía; otras partículas intensamente coloreadas tales como selenio o látex coloreado; o radionúclidos que se usan para exponer la película colocada cerca de la muestra. Se usan ampliamente enzimas dirigidas al sitio de interés para visualizar la diana mediante tratamiento y reacción con un sustrato cromogénico que desarrolla color tras la reacción con la enzima. También pueden usarse para generar una señal indirectamente, mediante la generación *in situ* de múltiples copias de una diana (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa), la generación o deposición de múltiples copias de una entidad que genera señales tal como un sustrato marcado fluorescentemente, o la deposición de múltiples copias de una diana secundaria, tal como tiramida biotilina que se visualiza entonces usando una sonda de unión a biotina. Estas pueden unirse o bien a la sonda
 40 dirigida contra la diana, o bien conjugarse con una sonda secundaria, terciaria u otra, que se une a la diana en una etapa posterior, o bien mediante reacción con la sonda primaria, o bien a través de una etapa intermedia de puente o unión.

Aunque el marcaje y la detección metalográficos, tanto usando partículas de oro intensificadas autometalográficamente como usando metalografía enzimática, proporciona mayor sensibilidad y especificidad que
 50 muchos otros métodos de detección para la obtención de imágenes ópticas y microscópicas de dianas, la naturaleza del metal depositado significa que la señal siempre aparece como una señal negra, completamente opaca. Si se requiere la visualización de una segunda diana solapante, la visualización de esta segunda diana quedará ocultada por la señal metalográfica. Por ejemplo, la metalografía enzimática (EnzMet™) ha logrado tanto detección y ubicación ultrasensibles, de alta resolución de copias de genes individuales mediante hibridación *in situ* de microscopía de campo claro convencional, como tinción histoquímica altamente sensible y específica de proteínas
 55 diana en secciones tisulares incrustadas en parafina. Sin embargo, su aplicación a la obtención de imágenes espectrales y otros métodos de obtención de imágenes automatizados ha sido limitada porque la señal negra no proporciona un espectro identificable y, por tanto, puede ser difícil de resolver de tinciones solapantes.

60 El desarrollo actual y la práctica futura de la investigación biomédica y medicina molecular requerirán cada vez más la detección y evaluación espacial de múltiples dianas simultáneamente con el fin de estudiar y evaluar relaciones entre componentes de un sistema, o de evaluar una serie de diferentes marcadores cuyo patrón de expresión combinado indica el comportamiento biológico del sistema en estudio o proporciona un pronóstico para un proceso patológico. Con el fin de hacer esto, se requieren métodos para separar y resolver las señales usadas para
 65 visualizar combinaciones de dianas con el fin de evaluar con exactitud cada diana. Esto se logra habitualmente mediante el uso de diferentes colores; un ejemplo es el uso de diferentes etiquetas fluorescentes coloreadas para evaluar tanto un gen diana como un gen de control, o para combinar la evaluación de gen y proteína. Aunque el ojo

humano puede resolver un pequeño número de colores, un avance importante es el uso de análisis de imágenes espectroscópico (“obtención de imágenes espectrales”) y método relacionados, en el que se resuelve la firma espectral de cada punto dentro de una imagen para diferenciar los espectro de los tintes presentes, y por tanto permitir la cuantificación de múltiples señales solapantes. De esta manera, incluso colores que parecen similares o idénticos para el ojo humano pueden resolverse espectroscópicamente.

La combinación de sensibilidad y resolución aumentadas de la detección metalográfica, con la capacidad de detectar múltiples colores que se confiere mediante el uso de sustratos coloreados, proporcionaría una exactitud enormemente mejorada en la evaluación de dianas biológicas y otras. En la fotografía en color, se hace reaccionar plata con precursores de colorantes aromáticos, conocidos como acopladores de colorantes, para producir colorantes orgánicos intensamente coloreados. Este procedimiento se conoce como acoplamiento de colorante. Este proceso se ha aplicado al desarrollo de colores a partir de depósitos metalográficos usados para la detección de dianas biológicas o químicas en sólo dos ocasiones: por Haase, junto con marcaje con radioisótopos en células cultivadas, y por Fritz, en la detección de partículas de oro coloidal intensificadas con plata.

La correlación de información a diferentes niveles de resolución requiere habitualmente experimentos de marcaje y detección múltiples. Estos necesitan procedimientos largos, imponen dificultades para correlacionar los diferentes conjuntos de datos, y pueden permitir que se comprometa la integridad estructural de la muestra.

Etiquetas de oro más grandes suponen un problema particular para marcaje correlativo. Su uso en sondas de oro fluorescentes combinadas está limitado porque extinguen la fluorescencia a través de transferencia de energía por resonancia; con el fin de conservar una fluorescencia útil, incluso etiquetas fluorescentes y de oro de 6 nm deben conjugarse con anticuerpos diferenciados. Además, la microscopía de fluorescencia es un método de campo oscuro. La tinción no puede visualizarse fácilmente en el contexto de la morfología tisular: esto puede ser una desventaja crítica para usuarios tales como patólogos, que prefieren evaluar la tinción en el contexto de la morfología tisular mediante microscopía óptica de campo claro convencional.

En este contexto, Powell *et al.* (Powell, R. D. *et al.*; Human Pathology, 38; 2007; págs. 1145-1159) describen métodos metalográficos para la visualización de dianas en hibridación *in situ* de campo claro. Además, Tubbs *et al.* (Tubbs, R. *et al.*; Journal of Molecular Histology, 35; 2004; págs. 589-594) describen métodos de morfología molecular de campo claro para la detección del gen Her2.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Una sonda compuesta, que comprende:

al menos un agente de direccionamiento para unir la sonda compuesta a una diana en una muestra de prueba,

al menos una nanopartícula conjugada con el al menos un agente de direccionamiento, comprendiendo la al menos una nanopartícula una pluralidad de átomos de oro, y

una enzima activa redox químicamente unida al al menos un agente de direccionamiento, para reaccionar con un sustrato enzimático después de que la sonda compuesta se una a la diana;

en la que el agente de direccionamiento comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

2. La sonda compuesta del punto 1, que comprende además un elemento polimérico, teniendo el elemento polimérico una pluralidad de nanopartículas unidas al mismo.

3. La sonda compuesta del punto 1, en la que el sustrato enzimático es un material fluorescente o fluorogénico, preferiblemente una tiramida fluorescente, o un material cromogénico, o un material metalográfico.

4. La sonda compuesta del punto 3, en la que el material metalográfico es un agente oxidante, un agente reductor y una fuente de iones de metal, y al menos algunos de los iones de metal de la fuente de iones de metal se reducen a un estado de oxidación cero.

5. La sonda compuesta del punto 1, en la que la al menos una nanopartícula tiene un diámetro de 0,8 nm a 40 nm.

6. Un método de detección de una diana en una muestra que comprende:

exponer la muestra a la sonda compuesta del punto 1 o el punto 2;

tratar la muestra con una disolución de intensificación o desarrollo para depositar al menos uno de un fluoróforo, un cromógeno o un metal; y

realizar al menos una prueba para detectar la fluorescencia producida por el fluoróforo depositado, el color producido por el cromógeno depositado, los átomos de metal de la nanopartícula o el metal depositado.

- 5 7. El método del punto 6, en el que el fluoróforo es un sustrato fluorescente o fluorogénico y la prueba comprende examinar la muestra con microscopía de fluorescencia u otro dispositivo o método de detección fluorescente.
8. El método del punto 7, que comprende además examinar la muestra mediante microscopía electrónica u otro método de visualización o detección de depósito o partícula de agrupación metálica.
- 10 9. El método del punto 6, en el que el metal es un sustrato metalográfico y la prueba comprende examinar la muestra con microscopía óptica, microscopía electrónica u otro método microscópico para detectar o visualizar el metal depositado.
- 15 10. El método del punto 6, en el que el metal es un reactivo autometalográfico o un sustrato metalográfico enzimático y la prueba comprende examinar la muestra con microscopía óptica de campo claro.
11. El método del punto 6, en el que la prueba es microscopía electrónica, microscopía de campo claro, microscopía fluorescente, señal directamente visible sin microscopía o detección eléctrica.
- 20 12. El método del punto 6, en el que la prueba es un examen mediante detección óptica directa o mediante un dispositivo de grabación óptico, o en el que la prueba es un examen de las propiedades eléctricas del metal depositado.
- 25 13. El método del punto 6, que comprende además inmovilizar la diana sobre una membrana u otra superficie.

Las figuras muestran:

30 La figura 1 ilustra los resultados de una prueba que usa peroxidasa del rábano (HRP) e IgG marcada con Nanogold con tiramidas fluorescentes. Las muestras de prueba de tubo polar se incubaron durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:200 de la IgG marcada con Nanogold y HRP combinados anti-IgG de conejo, preparada mediante la conjugación de Mono-Sulfo-NHS-Nanogold con la correspondiente HRP-IgG adquirida comercialmente, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Entonces se aplicó tiramida marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) durante 10 minutos. Se aclararon los portaobjetos tres veces en PBS, y se cubrieron con vidrio (con Dabco). El examen mediante microscopía de fluorescencia mostró numerosos tubos polares bien teñidos.

35 Las figuras 2a y 2b ilustran los resultados de una prueba que usa peroxidasa del rábano e IgG marcada con Nanogold con un sustrato metalográfico. Las muestras de prueba de tubo polar se incubaron durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:200 de la IgG marcada con Nanogold y HRP combinados, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Se aclararon las cámaras tres veces con agua desionizada y una vez con tampón citrato de sodio 0,02 M a pH 3,8, se decantaron, luego se desarrollaron con sustrato metalográfico similar a un reactivo de intensificación de plata. En la figura 2a, se sometió a prueba un sustrato de desarrollo de plata que no tiene modificador, proporcionando tubos polares claramente teñidos. En la figura 2b, se sometió a prueba un sustrato de desarrollo de plata que tiene un modificador que contiene el 15% de goma arábiga, proporcionando tubos polares claramente teñidos y fondo casi no observable.

45 Las figuras 3a, 3b, 3c y 3d ilustran los resultados de una prueba que usa peroxidasa del rábano e IgG marcada con Nanogold con intensificación de plata. Después del desarrollo con tiramida fluorescente, se retiraron los cubreobjetos, se aclararon los portaobjetos dos veces en TPBS y tres veces en agua ultrapura, luego se desarrollaron con reactivo de intensificación de plata HQ Silver (Nanoprobes; 2 x 4 minutos). Tal como se muestra en la figura 3a, esto es suficiente para producir una ligera tinción mediante microscopía óptica. Además, la microscopía de fluorescencia muestra una clara señal fluorescente, figura 3b. Entonces se procesaron las muestras para microscopía electrónica. Se retiraron los cubreobjetos y se aclararon los portaobjetos en agua destilada, se deshidrataron a través de una serie de disoluciones de etanol (50% - 100%) y se infiltraron con resina Araldite 502 (EMS, PA) durante la noche. Se cubrieron las zonas marcadas con cápsulas de BEEM cargadas con resina, se incrustaron a 60°C durante 24 horas. Se cortaron secciones delgadas, se colocaron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se examinaron las muestras usando un microscópico electrónico de transmisión FEI Tecnai 12. Los tubos polares eran claramente visibles y mostraron tinción específica con Nanogold intensificado con plata, figuras 3c y 3d.

60 Las figuras 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g ilustran los resultados de experimentos de tinción para células RK-12 cultivadas e infectadas por microsporidios de *Encephalitozoon hellem*. Se llevó a cabo la tinción usando anticuerpos primarios contra o PTP-80 (figuras 4a, 4b, 4d, 4e) o PTP-55 (figuras 4c, 4f y 4g). Tras el examen de microscopio óptico, se marcaron zonas de interés en la parte trasera de los portaobjetos. Se retiraron los cubreobjetos, y se aclararon los portaobjetos en agua destilada, se deshidrataron a través de una serie de disoluciones de etanol (50% -100%) y se infiltraron con resina Araldite 502 (EMS, PA) durante la noche. Se cubrieron las zonas marcadas con cápsulas de BEEM cargadas con resina, se incrustaron a 60°C durante 24 horas. Se tiñeron secciones delgadas con acetato de

uranilo y citrato de plomo, luego se examinaron usando un microscópico electrónico de transmisión FEI Tecnai 12 a 80 kV. Se encontró tinción de tubos polares fuerte y específica tras el examen mediante los cuatro métodos microscópicos: microscopía de fluorescencia tras el desarrollo con tiramidas Alexa Fluor 488 (figuras 4a y 4b), microscopía electrónica de transmisión ambas con desarrollo con sustrato de plata metalográfico (figuras 4d y 4e) y sin desarrollo con sustrato de plata metalográfico (figura 4c), y mediante microscopía óptica de campo claro tras desarrollo con el sustrato metalográfico de plata (figura 4g). Se observó fluorescencia fuerte incluso en presencia de oro de 5 nm.

La figura 5 ilustra los resultados de una prueba que usa peroxidasa del rábano e IgG marcada con oro de 10 nm con tiramidas fluorescentes. Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:50 del anticuerpo secundario marcado con HRP y oro de 10 nm combinados, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Entonces se aplicó tiramida marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) durante 15 minutos. Se aclararon los portaobjetos tres veces en PBS, y se cubrieron con vidrio (con Dabco). La microscopía de fluorescencia muestra claramente numerosos tubos polares bien teñidos.

La figura 6 ilustra los resultados de una prueba que usa peroxidasa del rábano e IgG marcada con oro de 10 nm con sustrato metalográfico. Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:50 de la IgG marcada con Nanogold y HRP combinados, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Se aclararon las cámaras tres veces con agua desionizada y una vez con tampón citrato de sodio 0,02 M a pH 3,8, se decantaron, luego se desarrollaron con el sustrato metalográfico. Se visualizaron fácilmente numerosos tubos polares claramente teñidos con alta resolución.

El método objeto facilita el rendimiento de múltiples pruebas sin requerir operaciones de marcaje y detección múltiples. Por ejemplo, tanto una partícula de oro como una etiqueta enzimática pueden conjugarse con una única sonda de anticuerpo, permitiendo así el marcaje enzimático y con oro en un único procedimiento. Las dos etiquetas pueden detectarse luego mediante pruebas diferenciadas.

El método objeto también proporciona sensibilidad aumentada para la detección de dianas. En un primer ejemplo, una muestra de prueba tratada con sondas enzimáticas y de oro combinadas se somete entonces a procedimientos de intensificación metalográfica, tales como metalografía enzimática, para visualizar dianas en inmunotransferencias y tejidos. Tal como se describe a continuación, la sonda marcada con oro y enzimáticamente combinada logra mayores sensibilidades de detección que sondas o bien marcadas con oro o bien enzimáticamente. En un segundo ejemplo, la sonda marcada con oro y enzimáticamente combinada puede polimerizarse, o pueden conjugarse múltiples sondas marcadas con oro y enzimáticamente con un elemento polimérico mayor, o "estructura principal", para aumentar adicionalmente la sensibilidad de detección.

El método objeto puede tanto facilitar la correlación de información a diferentes niveles de resolución sin requerir operaciones de marcaje y detección múltiples como proporcionar sensibilidad aumentada para la detección de dianas. Por ejemplo, una muestra de prueba a la que se han unido sondas enzimáticas y de oro combinadas puede tratarse entonces con un sustrato fluorescente o fluorogénico tal como una tiramida fluorescente. Tal como se describe a continuación, esto da como resultado la deposición de un producto de reacción fluorescente a distancias de 10 nm a 100 nm desde la sonda. Esta distancia es suficiente para garantizar que no se extingue la fluorescencia, pero no es tan grande como para disminuir la resolución microscópica óptica. La tinción fluorescente puede correlacionarse entonces con la localización microscópica electrónica de las partículas de oro. En una alternativa, la muestra de prueba/sonda enzimática y de oro combinada se trata con un cromógeno enzimático orgánico convencional. Esto da como resultado la deposición de un producto de reacción coloreado. La tinción cromática de campo claro puede entonces correlacionarse con la localización microscópica electrónica de las partículas de oro, proporcionando un método correlativo que indica la distribución de dianas en el contexto de la morfología tisular subyacente al nivel tanto microscópico electrónico como óptico.

Se dan a conocer reactivos y métodos para fluorescencia dirigida, correlativa o tinción óptica de campo claro y marcaje microscópico electrónico con nanopartículas de oro de 0,8 a 100 nm o más de diámetro. Estos nuevos reactivos comprenden un anticuerpo, proteína, u otro conjugado de biomolécula dirigido con tanto una nanopartícula de oro de 1,4, 3, 5, 10 nm o más de diámetro, como una enzima activa redox tal como peroxidasa del rábano. Cuando se unen a dianas en muestras de células y tejido, estos reactivos pueden depositar catalíticamente sustratos enzimáticos fluorescentes para desarrollar una señal de fluorescencia específica que se visualiza y localiza mediante microscopía de fluorescencia. Alternativamente, pueden catalizar la deposición de un cromógeno orgánico para dar un tinte coloreado que se visualiza mediante microscopía óptica de campo claro. Alternativamente, las sondas unidas pueden desarrollarse con o bien reactivos autometalográficos, que depositan selectivamente oro, plata u otro metal adicionales a partir de la disolución sobre las nanopartículas de oro; o bien con sustratos metalográficos enzimáticos, que reaccionan con la enzima redox para formar un depósito metálico localizado que se visualiza mediante microscopía óptica de campo claro.

La nanopartícula de oro se visualiza mediante microscopía electrónica, permitiendo así la correlación de la distribución de fluorescencia o tinción microscópica óptica con la localización macromolecular de las nanopartículas de oro mediante microscopía electrónica.

Además, se dan a conocer reactivos que incorporan tanto una enzima redox tal como peroxidasa del rábano, como una nanopartícula de oro conjugada con un anticuerpo, proteína u otra biomolécula dirigida, en la que la proximidad de la nanopartícula de oro y la enzima proporcionan mayor reactividad con iones de metal en disolución que cualquiera sola. Cuando se usan con desarrollo autometalográfico o desarrollo metalográfico enzimático, estas sondas enzimáticas y de oro combinadas proporcionan mayor sensibilidad para la detección de dianas biológicas en inmunotransferencias, en células y en tejidos que sondas que portan cualquier etiqueta sola. La sensibilidad puede aumentarse adicionalmente mediante la incorporación o conjugación de múltiples sondas marcadas con oro y enzimáticamente en polímeros, proporcionando la detección de dianas de menor número de copias y más pequeñas, y la visualización de sondas más pequeñas libres de repetición para hibridación *in situ*.

Se prepararon sondas marcadas con oro y enzimáticamente combinadas según los siguientes ejemplos. Estos incluyen combinaciones específicas de dianas, sondas y procedimientos de amplificación y desarrollo de señales. Sin embargo, el método general incluye otras combinaciones no citadas específicamente en el presente documento, incluyendo el uso de partículas de oro más grandes, partículas de otros metales, otros sustratos fluorescentes o fluorogénicos, el uso de polímeros con diferentes pesos moleculares, tamaños y composiciones a los facilitados, y la aplicación a otros sistemas y dianas incluyendo la localización de ácidos nucleicos, enzimas, hidratos de carbono, proteínas, hormonas, sustratos o análogos de sustrato, y otras especies biológicamente significativas.

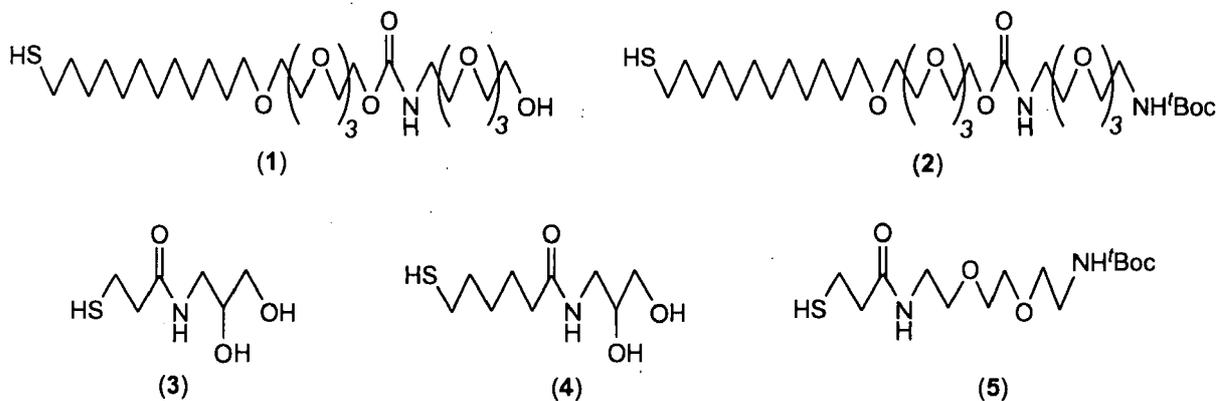
Aunque los siguientes ejemplos se centran en la detección usando microscopía óptica y electrónica de muestras biológicas, las sondas también pueden usarse para detectar muestras no biológicas, tales como pesticidas y otros productos químicos. Además, las señales producidas pueden detectarse mediante visualización humana directa o con equipo, tal como con una cámara, sin la necesidad de examen microscópico. Los depósitos metalográficos también pueden detectarse por otros medios, tales como reflectancia, dispersión y otros medios ópticos. Las señales desarrolladas también pueden detectarse por medios no ópticos, tales como medición de cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo, un cambio en capacitancia, inductancia, puente de dos o más electrodos para completar un circuito, conductancia, resistividad. También pueden usarse cambios de masa para la detección, tal como la alteración de la frecuencia de resonancia de un cristal de cuarzo que cambia con la masa, en donde la deposición del metal sobre el cristal cambia su masa.

Ejemplo 1

Se preparó un conjugado de Nanogold y peroxidasa del rábano de 1,4 nm combinados usando anticuerpos de IgG secundarios conjugados con peroxidasa del rábano (HRP) comercialmente disponibles. Estos se marcaron usando Mono-Sulfo-NHS-Nanogold, preparado mediante activación de un derivado de monoamino de Nanogold con suberato de bis(sulfosuccinimidilo), BS3. Se aislaron los conjugados mediante filtración en gel usando una columna Superose-12 eluida con solución salina 0,15 M tamponada con fosfato de sodio 0,02 M, pH 7,4.

Ejemplo 2

Pueden estabilizarse, solubilizarse y funcionalizarse químicamente partículas de oro coloidal para la conjugación con biomoléculas usando ligandos de tior, que tienen una fuerte afinidad por el oro. Se logra la estabilización usando ligandos con un dominio hidrófobo interno para "sellar" la superficie de oro y evitar que interaccione con especies en disolución, y un dominio hidrófilo externo para hacer que las partículas sean solubles en agua y biocompatibles. Se estabilizaron las sondas de 5 y 10 nm unidas de manera covalente descritas anteriormente y se funcionalizaron usando ligandos (1) y (2) (a continuación).



Alternativamente, se usaron los ligandos más cortos (3), (4) y (5) para preparar sondas con recubrimientos de ligando más delgados y proporcionar tamaños de conjugado más pequeños. Se encontró que una mezcla 9:1 de (4) y (2) era eficaz. Se preparó oro de 3 nm mediante reducción con citrato/ácido tánico de disolución de ácido

tetracloroáurico, o tratamiento con tiocianato de sodio. Entonces se agitaron las partículas con un exceso de una mezcla 9:1 de (4):(2), luego se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre un gradiente de glicerol del 10-30% seguido por filtración en gel sobre un gel desalante (GH25, Milliore) para eliminar el glicerol. Entonces se activaron mediante reacción con BS3 en exceso y se mezclaron en una razón 3:1 con anticuerpo de IgG conjugado con HRP. Entonces se separaron los productos mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre un gradiente de glicerol del 10-30% seguido por filtración en gel (Superose-12, Pharmacia).

Ejemplo 3

Se preparó un conjugado de HRP-anticuerpo de oro coloidal convencional usando partículas de oro coloidal de 5 nm preparadas por reducción con citrato/ácido tánico de tetracloroaurato. Se encontró la concentración de anticuerpo requerida para la estabilización mediante titulación seguida por exposición a cloruro de sodio usando una serie de concentraciones de anticuerpo crecientes, tomando la concentración a la que el conjugado ya no floculaba (es decir, no se producía cambio de color) tras la adición de sal. Entonces se aisló el conjugado de oro y peroxidasa combinados mediante centrifugación y granulación seguido por resuspensión.

Ejemplo 4

Se preparó un conjugado de HRP-anticuerpo de oro coloidal de 10 nm combinados de la misma manera que la sonda marcada con oro de 5 nm y HRP combinados descrita anteriormente, usando partículas de oro de 10 nm preparadas por reducción con citrato/ácido tánico de tetracloroaurato, usando titulación seguido por exposición a cloruro de sodio para encontrar las concentraciones óptimas de anticuerpo, entonces se aisló mediante centrifugación y granulación seguido por resuspensión.

Ejemplo 5

Se preparó un conjugado de anticuerpo-HRP y Nanogold combinados polimerizado a partir del conjugado descrito en el ejemplo 1. Esto se unió a un dextrano sustituido con amino de 500.000 de PM que se activó para su acoplamiento a aminos usando suberato de bis(sulfosuccinimidilo), BS3, se incubó durante la noche a 4°C con IgG marcada con HRP y Nanogold en exceso. Al día siguiente, se aisló el conjugado mediante filtración en gel sobre medios de filtración en gel Superose-12 eluidos con tampón fosfato de sodio 0,02 M con cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,4.

Ejemplo 6

Se preparó un conjugado de anticuerpo-HRP y Nanogold combinados polimerizado a partir del conjugado descrito en el ejemplo 1. Esto se unió a un dextrano de 500.000 ó 2.000.000 de PM que se activó para acoplarse a aminos mediante oxidación con peryodato de sodio, generando así grupos aldehído a partir de 1,2-dioles. Entonces se incubó el dextrano oxidado durante la noche a 4°C con IgG marcada con HRP y Nanogold en exceso. Al día siguiente, se aisló el conjugado mediante filtración en gel sobre medios de filtración en gel Superose-12 o Superose-6, se eluyó con tampón fosfato de sodio 0,02 M con cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,4.

Ejemplo 7 (anticuerpos marcados con HRP y Nanogold combinados)

Se llevaron a cabo experimentos de microscopía correlativa en células RK-13 cultivadas e infectadas por microsporidios de *Encephalitozoon hellem*. Se hicieron crecer cultivos de RK-13 y se infectaron en portaobjetos con cámara de cultivo celular de plástico NUNC, se inmunofijaron (para microscopía electrónica) y se almacenaron en tampón PBS. Se bloquearon las células (suero normal de cabra y albúmina sérica bovina (BSA) en Tween-20 al 0,01% - solución salina tamponada con fosfato (TPBS)) durante 30 minutos a 32°C, se aclararon tres veces (TPBS-BSA) y entonces se incubaron durante 30 minutos a 32°C en anticuerpo anti-PTP55 de *E. hellem* 1:100, 70 y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Entonces se tiñeron las muestras y se examinaron tal como sigue:

IgG marcada con HRP y Nanogold combinados con tiramidas fluorescentes: Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:200 de la IgG anti-IgG de conejo marcada con HRP y Nanogold combinados, preparada mediante la conjugación de Mono-Sulfo-NHS-Nanogold con la correspondiente HRP-IgG adquirida comercialmente, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Entonces se aplicó tiramida marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) durante 10 minutos. Se aclararon los portaobjetos tres veces en PBS, y se cubrieron con vidrio (con Dabco). El examen mediante microscopía de fluorescencia mostró numerosos tubos polares bien teñidos (figura 2(a)).

IgG marcada con HRP y Nanogold combinados con sustrato metalográfico: Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:200 de la IgG marcada con HRP y Nanogold combinados, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Se aclararon las cámaras tres veces con agua desionizada y una vez con tampón citrato de sodio 0,02 M a pH 3,8, se decantaron, luego se desarrollaron con sustrato metalográfico similar a un reactivo de intensificación de plata. Se sometieron a prueba dos sustratos de desarrollo de plata diferentes, uno sin modificador, y uno que contenía el 15% de goma arábica con el fin de controlar la velocidad de reacción y garantizar un

desarrollo uniforme. Ambos procedimientos dieron como resultado tubos polares claramente teñidos; con goma arábica, apenas pudo observarse fondo, y la tinción era muy clara (figura 2 (b) y (c)).

5 IgG marcada con HRP y Nanogold combinados con intensificación de plata: Tras el desarrollo con tiramida fluorescente, se retiraron los cubreobjetos. Se aclararon los portaobjetos dos veces en TPBS y tres veces en agua ultrapura, luego se desarrollaron con reactivo de intensificación de plata HQ Silver (Nanoprobes; 2 x 4 minutos). Esto era suficiente para producir una ligera tinción mediante microscopía óptica (figura 3 (d)). El reexamen mediante microscopía de fluorescencia todavía mostró una clara señal fluorescente (figura 2 (e)). Entonces se procesaron estas muestras para microscopía electrónica: se retiraron los cubreobjetos y se aclararon los portaobjetos en agua
10 destilada, se deshidrataron a través de una serie de disoluciones de etanol (50% - 100%) y se infiltraron con resina Araldite 502 (EMS, PA) durante la noche. Se cubrieron las zonas marcadas con cápsulas de BEEM cargadas con resina, se incrustaron a 60°C durante 24 horas. Se cortaron secciones delgadas, se colocaron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se examinaron las muestras usando un microscópico electrónico de transmisión FEI Tecnai 12. Los tubos polares eran claramente visibles y mostraron tinción específica
15 con Nanogold intensificado con plata (figura 2 (f) y (g)).

Ejemplo 8 (anticuerpos marcados con HRP y oro de 5 nm combinados)

20 Se llevaron a cabo experimentos de tinción en células RK-13 cultivadas e infectadas por microsporidios de *Encephalitozoon hellem*, preparadas tal como se describió en la solicitud original. Se llevó a cabo la tinción siguiendo protocolos similares, usando anticuerpos primarios contra PTP-55 o PTP-80, excepto porque se usó una dilución 1:50 de la sonda de oro de 5 nm - HPR combinados, y una incubación de 15 en vez de 10 minutos con tiramidas fluorescentes. Tras el examen de microscopio óptico, se marcaron zonas de interés en la parte trasera de los portaobjetos. Se retiraron los cubreobjetos, y se aclararon los portaobjetos en agua destilada, se deshidrataron a
25 través de una serie de disoluciones de etanol (50% - 100%) y se infiltraron con resina Araldite 502 (EMS, PA) durante la noche. Se cubrieron las zonas marcadas con cápsulas de BEEM cargadas con resina, se incrustaron a 60°C durante 24 horas. Se tiñeron secciones delgadas con acetato de uranilo y citrato de plomo, luego se examinaron usando un microscópico electrónico de transmisión FEI Tecnai 12 a 80 kV. En la figura 3 se muestran los resultados. Se encontró tinción de tubos polares fuerte y específica tras el examen mediante los cuatro métodos
30 microscópicos: microscopía de fluorescencia tras desarrollo con tiramidas Alexa Fluor 488, microscopía electrónica de transmisión tanto con como sin desarrollo con sustrato de plata metalográfico, y mediante microscopía óptica de campo claro tras desarrollo con el sustrato metalográfico de plata. Se observó fluorescencia fuerte incluso en presencia de oro de 5 nm, confirmando que este enfoque supera la extinción de fluorescencia encontrada con conjugados de oro-anticuerpo más grandes y fluorescentes combinados. La tinción fue coherente con la distribución
35 conocida para dos proteínas de tubos polares, PTP-55 y PTP-80.

Ejemplo 9 (anticuerpos marcados con HRP y oro de 10 nm combinados)

40 Se llevaron a cabo experimentos de tinción en células RK-13 cultivadas e infectadas con microsporidios de *Brachiola algerae*, preparadas y procesadas tal como se describió anteriormente para las sondas de oro de 5 nm y HRP combinadas. Se bloquearon las células (suero de cabra normal y albúmina sérica bovina (BSA) en Tween-20 al 0,01% - solución salina tamponada con fosfato (TPBS)) durante 30 minutos a 32°C, se aclararon tres veces (TPBS-BSA), luego se incubaron durante 30 minutos a 32°C en anticuerpo anti-PTP80 de *E. hellem* 1:100, se aclararon tres veces con TPBS-BSA, luego se tiñeron y se examinaron tal como sigue:

45 IgG marcada con HRP y oro de 10 nm combinados con tiramidas fluorescentes: Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:50 del anticuerpo secundario marcado con HRP y oro de 10 nm combinados, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Entonces se aplicó tiramida marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) durante 15 minutos. Se aclararon los portaobjetos tres veces en PBS, y se cubrieron con vidrio (con Dabco).
50 El examen mediante microscopía de fluorescencia mostró numerosos tubos polares bien teñidos (figura 4(a)). Esto confirma que el método puede extenderse incluso a sondas de oro de 10 nm.

55 IgG marcada con HRP y oro de 10 nm combinados con sustrato metalográfico: Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 32°C con una dilución 1:50 de la IgG marcada con Nanogold y HRP combinados, y se aclararon tres veces con TPBS-BSA. Se aclararon las cámaras tres veces con agua desionizada y una vez con tampón citrato de sodio 0,02 M a pH 3,8, se decantaron, luego se desarrollaron con el sustrato metalográfico. Se visualizaron fácilmente numerosos tubos polares claramente teñidos con alta resolución (figura 4(b)).

Ejemplo 10 - Sensibilidad aumentada en inmunotransferencias

60 La preparación y las pruebas de inmunotransferencia de estreptavidina conjugada con peroxidasa del rábano y Nanogold de 1,4 nm combinados confirmaron que incorporar ambas etiquetas puede proporcionar una sensibilidad significativamente mayor que cualquiera sola. Se marcó estreptavidina-HRP usando Mono-Sulfo-NHS-Nanogold, preparado por la activación de un derivado de monoamino de Nanogold con suberato de bis(sulfosuccinimidilo),
65 BS3. Se aislaron los conjugados mediante filtración en gel usando una columna Superose-12 eluida con solución salina 0,15 M tamponada con fosfato de sodio 0,02 M, pH 7,4.

- Se hirvió a fuego lento una membrana de nitrocelulosa en agua ligeramente en ebullición durante 15 minutos. Se aplicaron diluciones en serie de diez veces de un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón biotilado desde 100 ng/μl hasta 0,01 pg/μl a la superficie de la membrana usando un capilar de 1 microlitro. Se secó al aire la membrana durante 15 minutos, luego se boqueó con una disolución de albúmina sérica bovina al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS: tampón de fosfato de sodio 0,02 M con cloruro de sodio 0,15 M a pH 7,4) a 37°C durante 30 minutos, luego se incubó con el conjugado marcado con Nanogold y HRP combinados. Se ejecutaron dos experimentos de comparación:
- 5
- 10 Desarrollo con sustrato de metalografía enzimática, en paralelo con detección de estreptavidina-HRP.
- Desarrollo con sustrato de metalografía enzimática e intensificación de plata (LI Silver, Nanoprobes), en paralelo con detección de la misma diana usando Nanogold-estreptavidina desarrollado usando LI Silver.
- 15 La sonda marcada con Nanogold y HRP combinados muestra un aumento en la sensibilidad de detección de uno a dos órdenes de magnitud, en comparación con o bien una sonda enzimática detectada usando metalografía enzimática, o bien una sonda marcada con Nanogold detectada con intensificación de plata.
- 20 La sensibilidad de la sonda polimerizada se demostró adicionalmente en un experimento de inmunotransferencia de tipo Western. Se evaluó la sonda que comprende un dextrano de 500.000 de PM unido a tanto partículas de oro de 1,4 nm como a etiquetas enzimáticas en experimentos de inmunotransferencia de tipo Western para la detección de proteína HER2 en lisados de células Skbr3 usando anticuerpo primario 4B5 de Ventana, y anticuerpo primario OP15. Entonces se detectaron estos mediante incubación durante 60 minutos con dilución 1:250 y 1:25, respectivamente, del anticuerpo de Nanogold-HRP polimerizado, luego se desarrollaron con el sustrato metalográfico usado para
- 25 metalografía enzimática. En la figura 7 se muestran los resultados. A partir de la comparación de (c) y (d), puede observarse que la sonda enzimática y de oro polimeriza produjo una sensibilidad equivalente a la de la detección quimioluminiscente.

REIVINDICACIONES

1. Sonda compuesta, que comprende:
- 5 al menos un agente de direccionamiento para unir la sonda compuesta a una diana en una muestra de prueba, al menos una nanopartícula conjugada con el al menos un agente de direccionamiento, comprendiendo la al menos una nanopartícula una pluralidad de átomos de oro, y
- 10 una enzima activa redox químicamente unida al al menos un agente de direccionamiento, para reaccionar con un sustrato enzimático después de que la sonda compuesta se una a la diana;
- 15 en la que el agente de direccionamiento comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.
2. Sonda compuesta según la reivindicación 1, que comprende además un elemento polimérico, teniendo el elemento polimérico una pluralidad de nanopartículas unidas al mismo.
3. Sonda compuesta según la reivindicación 1, en la que el sustrato enzimático es un material fluorescente o fluorogénico, preferiblemente una tiramida fluorescente, o un material cromogénico, o un material metalográfico.
- 20 4. Sonda compuesta según la reivindicación 3, en la que el material metalográfico es un agente oxidante, un agente reductor y una fuente de iones de metal, y al menos algunos de los iones de metal de la fuente de iones de metal se reducen a un estado de oxidación cero.
- 25 5. Sonda compuesta según la reivindicación 1, en la que la al menos una nanopartícula tiene un diámetro de 0,8 nm a 40 nm.
6. Método de detección de una diana en una muestra que comprende:
- 30 exponer la muestra a la sonda compuesta según la reivindicación 1 o la reivindicación 2;
- 35 tratar la muestra con una disolución de intensificación o desarrollo para depositar al menos uno de un fluoróforo, un cromógeno o un metal; y
- 40 realizar al menos una prueba para detectar la fluorescencia producida por el fluoróforo depositado, el color producido por el cromógeno depositado, los átomos de metal de la nanopartícula o el metal depositado.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el fluoróforo es un sustrato fluorescente o fluorogénico y la prueba comprende examinar la muestra con microscopía de fluorescencia u otro dispositivo o método de detección fluorescente.
- 45 8. Método según la reivindicación 7, que comprende además examinar la muestra mediante microscopía electrónica u otro método de visualización o detección de depósito o partícula de agrupación metálica.
9. Método según la reivindicación 6, en el que el metal es un sustrato metalográfico y la prueba comprende examinar la muestra con microscopía óptica, microscopía electrónica u otro método microscópico para detectar o visualizar el metal depositado.
- 50 10. Método según la reivindicación 6, en el que el metal es un reactivo autometalográfico o un sustrato metalográfico enzimático y la prueba comprende examinar la muestra con microscopía óptica de campo claro.
- 55 11. Método según la reivindicación 6, en el que la prueba es microscopía electrónica, microscopía de campo claro, microscopía fluorescente, señal directamente visible sin microscopía o detección eléctrica.
12. Método según la reivindicación 6, en el que la prueba es un examen mediante detección óptica directa o mediante un dispositivo de grabación óptico, o en el que la prueba es un examen de las propiedades eléctricas del metal depositado.
- 60 13. Método según la reivindicación 6, que comprende además inmovilizar la diana sobre una membrana u otra superficie.

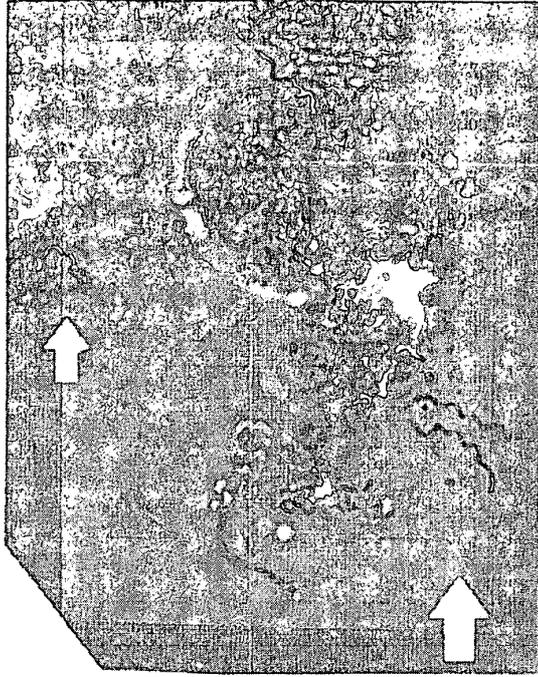


Fig. 2a



Fig. 2b

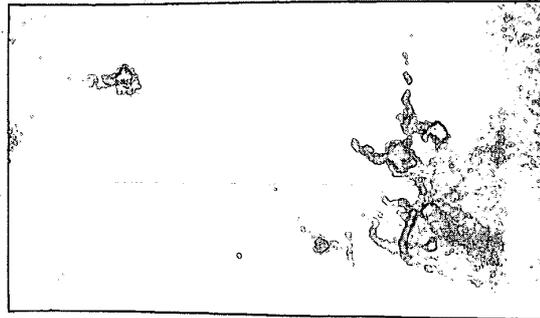


Fig. 1



Fig. 3a

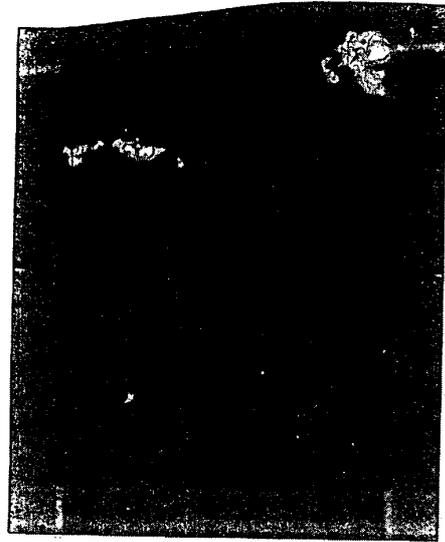


Fig. 3b

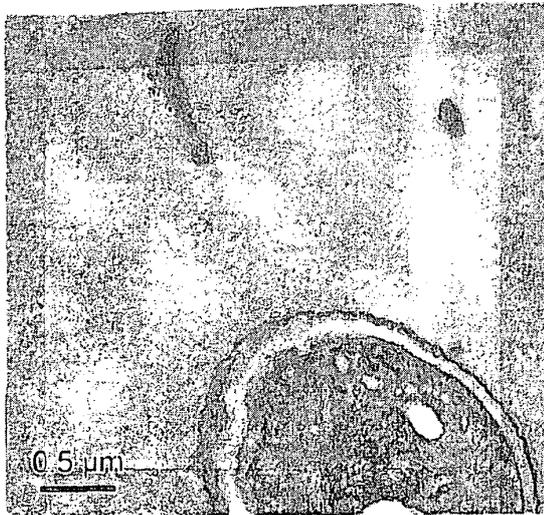


Fig. 3c

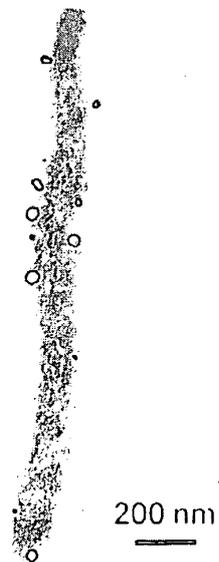


Fig. 3d

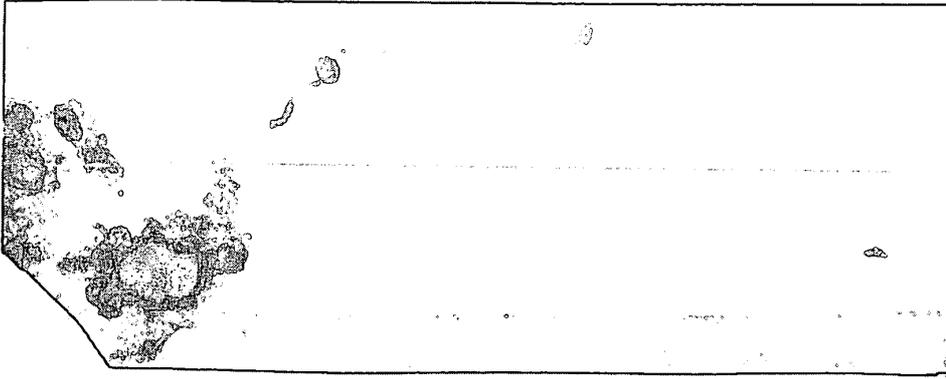


Fig. 4b

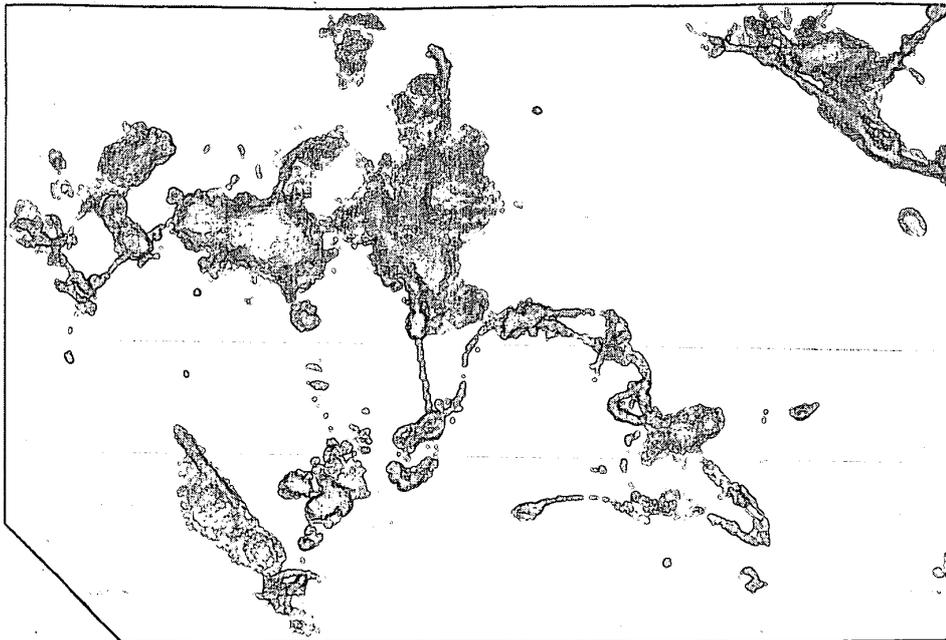


Fig. 4a

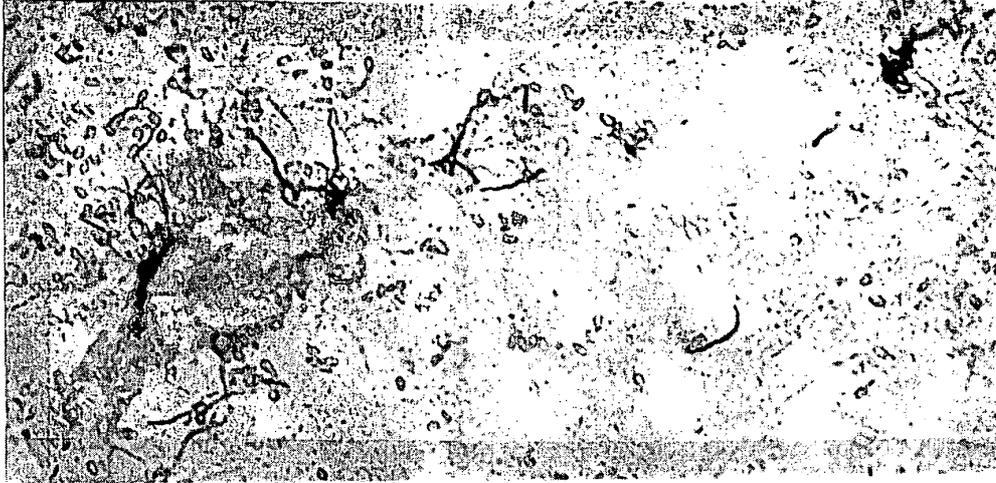


Fig. 4d

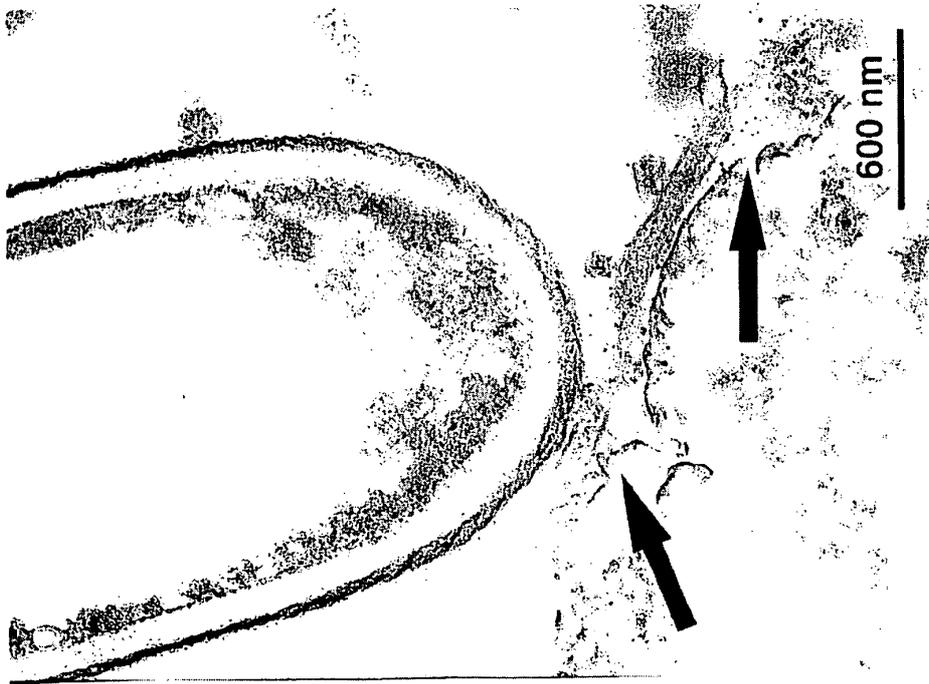


Fig. 4c



Fig. 4e

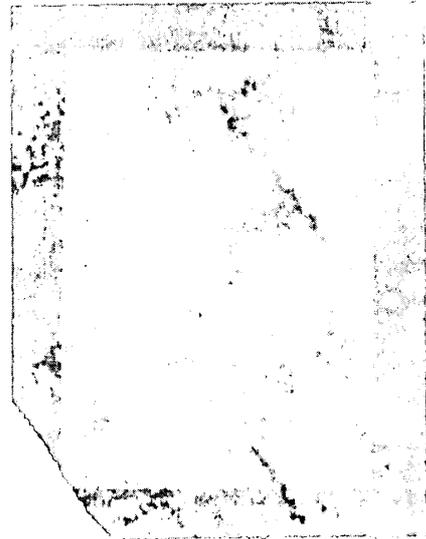


Fig. 4f



1.7 μ

Fig. 4g

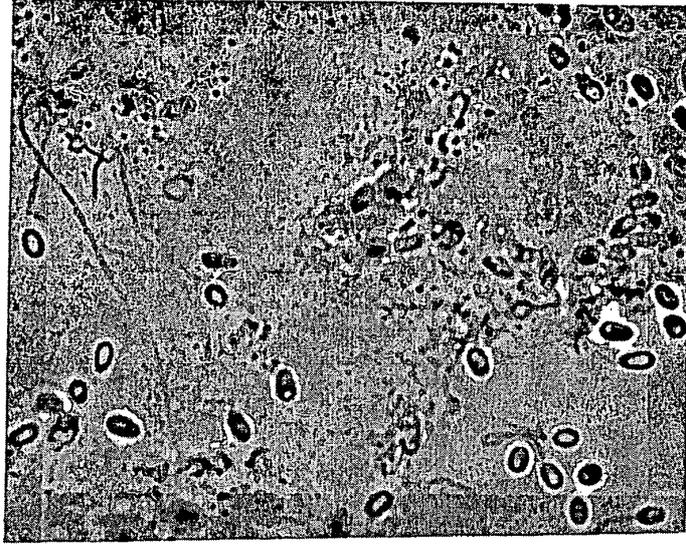


Fig. 6

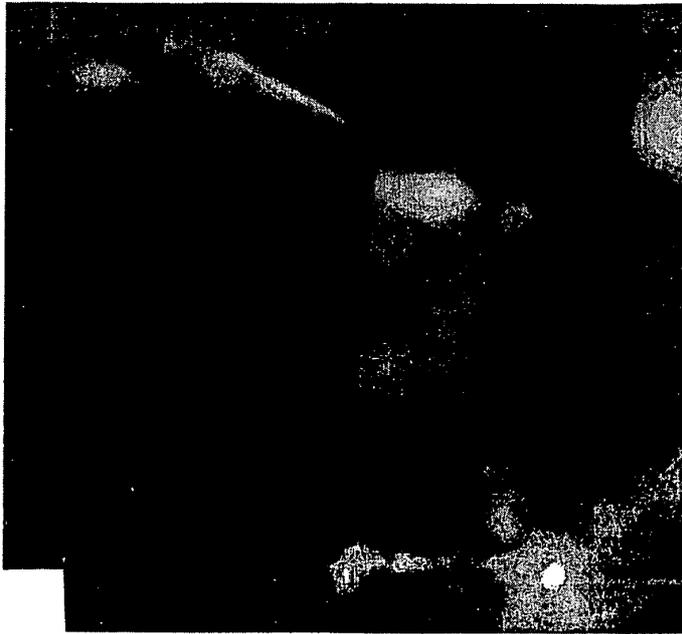


Fig. 5