

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 211**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2013 PCT/US2013/033462**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013 E 13714818 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2831587**

54 Título: **Conjugados de señalización y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

27.03.2012 US 201261616330 P

05.10.2012 US 201261710607 P

12.03.2013 US 201361778093 P

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

09.08.2018

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)

1910 E. Innovation Park Drive

Tucson, Arizona 85755, US

72 Inventor/es:

ALEXANDER, NELSON;

DAY, WILLIAM;

KOSMEDER, JEROME, W.;

LEFEVER, MARK;

MORRISON, LARRY;

PEDATA, ANNE y

STANISLAW, STACEY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 678 211 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de señalización y procedimientos de uso

5 **CAMPO**

La presente divulgación se refiere a conjugados, composiciones, procedimientos y kits útiles en la realización de ensayos para detectar una o más dianas en una muestra biológica.

10 **ANTECEDENTES**

La inmunohistoquímica, o IHC, se refiere al proceso de detección, localización y cuantificación de antígenos, tales como una proteína, en una muestra biológica, tal como un tejido, y usando restos de unión específicos, tales como anticuerpos específicos para los antígenos particulares. Esta técnica de detección tiene la ventaja de poder mostrar exactamente dónde se encuentra una proteína dada dentro de la muestra de tejido. También es una forma eficaz de examinar los tejidos en sí mismos. La hibridación *in situ*, o ISH, se refiere al proceso de detección, localización y cuantificación de ácidos nucleicos. Tanto la IHC como la ISH se pueden realizar en diversas muestras biológicas, tales como tejido (por ejemplo, congelado en fresco, incluido en parafina y fijado con formol) y muestras citológicas. Tras el reconocimiento de las dianas, tanto si las dianas son ácidos nucleicos o antígenos, el evento de reconocimiento se puede detectar mediante el uso de varias etiquetas (por ejemplo, cromogénica, fluorescente, luminiscente, radiométrica).

La hibridación *in situ* (ISH) en tejido incluye la detección de un ácido nucleico mediante la aplicación de una cadena complementaria de ácido nucleico a la que está acoplada una molécula indicadora. La visualización de la molécula indicadora permite a un observador localizar secuencias específicas de ADN o ARN en una población de células heterogéneas, como una muestra histológica, citológica o ambiental. Las técnicas de ISH disponibles actualmente incluyen hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

El interrogatorio de la expresión génica en secciones de tejido mediante PCR o micromatrices se ha utilizado con éxito para clasificar la probabilidad de recidiva tumoral de los pacientes e identificar a aquellos que se pueden beneficiar de terapias específicas. Sin embargo, la especificidad tisular y el contexto celular, que mejoran el valor de los ensayos basados en tejidos, se pierden durante la extracción de ARNm para PCR o análisis de micromatrices. Además, se pueden generar resultados falsos positivos o negativos debido a la presencia de células no tumorales "contaminantes" en la sección. Como resultado, existe la necesidad de ensayos de hibridación *in situ* automatizados que se dirijan a ARNm (ISH-ARNm) que permitan una evaluación robusta y reproducible de la expresión de biomarcadores mientras se preserva el contexto y especificidad tisular, así como las relaciones entre células.

Los sustratos cromógenos se han utilizado ampliamente para inmunohistoquímica desde hace muchos años y para la hibridación *in situ* más recientemente. La detección cromogénica ofrece un procedimiento de detección sencillo y rentable. Tradicionalmente, los sustratos cromógenos precipitan cuando son activados por la enzima apropiada. Es decir, la sustancia cromógena tradicional se convierte de un reactivo soluble en un precipitado coloreado insoluble al entrar en contacto con la enzima. El precipitado coloreado resultante no requiere ningún equipo especial para su procesamiento o visualización. Hay varias cualidades que comparten los sustratos cromógenos exitosos para IHC o ISH. Primero, la sustancia debe precipitar como una sustancia coloreada, preferentemente con una absorptividad molar muy alta. El sustrato enzimático debería tener una alta solubilidad y estabilidad del reactivo, pero los productos cromógenos precipitados deberían ser muy insolubles, preferentemente en soluciones tanto acuosas como alcohólicas. Las tasas de renovación de la enzima deben ser muy altas para una gran amplificación de la señal de una sola enzima en un corto período de tiempo. Las limitaciones particulares de las técnicas cromogénicas actuales incluyen la capacidad de multiplexación, la incompatibilidad con el procesamiento posterior a la tinción (por ejemplo, lavados con disolvente, secado, tinción posterior) y las limitadas opciones de color.

Para ensayos *in situ*, tales como ensayos de ISH y ensayos de IHC, de muestras tisulares y citológicas, especialmente ensayos multiplexados de dichas muestras, es muy deseable identificar y desarrollar procedimientos que proporcionen resultados deseables sin interferencia de fondo. La amplificación de la señal de tiramida (TSA) es un procedimiento conocido basado en la deposición catalizada de indicadores (CARD). La patente de EE. UU. n.º 5.583.001 divulga un procedimiento para la detección o cuantificación de un analito usando un sistema de activación de enzima dependiente de analito que se basa en la deposición catalizada de indicadores para amplificar la señal indicadora potenciando la catálisis de una enzima en un procedimiento CARD o TSA haciendo reaccionar la molécula de fenol marcada con una enzima. Como resultado, la patente de EE. UU. n.º 5.583.001 A divulga el concepto de amplificación de la señal de tiramida "clásico", es decir, la activación de enzima dependiente de analito de un conjugado de tiramida a una forma activada que se deposita y enriquece cerca del analito, enriqueciendo o amplificando de este modo, respectivamente, una señal indicadora conjugada con esa tiramida.

El documento WO 2008/128352 A1 divulga la detección de analitos en muestras biológicas utilizando agentes de unión específicos de analito inmovilizados. El analito se detecta mediante difracción óptica después de la deposición

de derivados de tiramida marcados activados por enzimas en el sitio en el que el analito interactúa con el agente de unión. Además de la difracción óptica, el documento WO 2008/128352 A1 sugiere el uso de la absorbancia, la fluorescencia, la dispersión Raman, la fosforescencia, la luminiscencia, la radioactividad o la resonancia de plasmón superficial para detectar la señal específica del analito.

5 El documento WO 2010/094283 A1 divulga conjugados de marcadores detectables y sustratos de peroxidasa para detectar dianas moleculares en muestras biológicas, en particular para la detección de dianas que tienen actividad de peroxidasa. En presencia de una actividad de peroxidasa en la muestra, los conjugados se convierten de una forma soluble en agua a un precipitado insoluble que se deposita cerca del sitio diana. De acuerdo con el documento
10 WO 2010/094283 A1, se puede utilizar cualquier molécula fluorescente, luminiscente, bioluminiscente o radioactiva como marcador.

15 El documento WO 2008/133729 A2 divulga procedimientos para la detección secuencial de múltiples dianas en una muestra biológica usando una sonda de fluorescencia específica para cada diana. Después de la detección de una diana dada, la sonda se inactiva con un agente oxidante y la sonda de fluorescencia para la siguiente diana se une, y el proceso se repite hasta que se detectan todas las dianas. En un modo de realización, el documento sugiere una amplificación de la señal impulsada por enzimas para detectar las dianas, por ejemplo, mediante la deposición de tiramida usando peroxidasa de rábano picante.

20 El documento WO 2009/012140 A2 divulga procedimientos para detectar los estados de activación de componentes de rutas de transducción en células tumorales. En particular, los extractos celulares de células aisladas se incuban con anticuerpos de captura específicos de analito que se inmovilizan sobre un soporte sólido. El estado de activación de cualquiera de los analitos capturados se determina finalmente mediante la detección de la unión posterior de anticuerpos dependientes del estado de activación que son específicos para los analitos
25 correspondientes. De acuerdo con el documento WO 2009/012140 A2, los anticuerpos dependientes del estado de activación unidos se pueden detectar con un fluoróforo o un reactivo cromógeno después de un paso de amplificación de la señal de tiramida impulsada por peroxidasa de rábano picante.

30 El documento WO 2012/003476 A2 divulga conjugados de hapteno que incluyen un hapteno, un conector opcional y un resto arilo activable por peroxidasa. También se divulgan procedimientos en los que una peroxidasa que es capaz de reaccionar con el resto arilo activable por peroxidasa se une a una diana en una muestra y, en presencia de peróxido, el conjugado de hapteno forma un enlace covalente de forma directa o proximal a la peroxidasa inmovilizada, y la diana se detecta finalmente al detectar el hapteno con una etiqueta detectable.

35 Si bien se sabe que la amplificación de la señal de tiramida amplifica la visibilidad de las dianas, también se asocia con una tinción de fondo elevada (por ejemplo, amplificación de eventos de reconocimiento no específicos).

SUMARIO

40 En el presente documento se divulgan procedimientos para usar conjugados de cromógeno para detectar dianas en las muestras. En modos de realización preferentes, las dianas son de una muestra biológica. Dianas ilustrativas incluyen proteínas y ácidos nucleicos que se analizan en el contexto de citología o anatomía patológica. Un aspecto de la divulgación es que los conjugados de cromógeno son totalmente compatibles con los instrumentos y procedimientos de tinción automatizada de portaobjetos. Los conjugados de cromógeno permiten una detección
45 anteriormente inalcanzable de la sensibilidad y la capacidad de multiplexación, entre otras ventajas, lo que representa un avance significativo en el estado de la técnica.

50 En modos de realización ilustrativos, un procedimiento para detectar una diana en una muestra biológica incluye poner en contacto la muestra biológica con una sonda de detección, poner en contacto la muestra biológica con un conjugado de marcaje y poner en contacto la muestra biológica con un conjugado de señalización. El conjugado de marcaje incluye una enzima. El conjugado de señalización incluye un resto reactivo latente y un resto cromógeno. La enzima cataliza la conversión del resto reactivo latente en un resto reactivo que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la diana. El procedimiento incluye además iluminar la muestra biológica con luz y detectar la diana a través de la absorbancia de la luz por el resto cromógeno del conjugado de
55 señalización. En un modo de realización, el resto reactivo reacciona con un residuo de tirosina de la muestra biológica, el conjugado de enzima, la sonda de detección o combinaciones de los mismos.

60 En modos de realización ilustrativos, la sonda de detección es una sonda de oligonucleótido o una sonda de anticuerpo. En modos de realización ilustrativos adicionales, el conjugado de marcaje incluye un anticuerpo acoplado a la enzima. Las enzimas ilustrativas incluyen oxidorreductasas o peroxidasas. Un anticuerpo ejemplar para el conjugado de marcaje sería un anticuerpo antiespecie o antihapteno. La sonda de detección puede incluir un hapteno seleccionado del grupo que consiste en un hapteno de oxazol, hapteno de pirazol, hapteno de tiazol, hapteno de nitroarilo, hapteno de benzofurano, hapteno de triterpeno, hapteno de urea, hapteno de tiourea, hapteno de rotenoide, hapteno de cumarina, hapteno de cicloginano, hapteno de dinitrofenilo, hapteno de biotina, hapteno de digoxigenina, hapteno de fluoresceína y hapteno de rodamina. En otros ejemplos, la sonda de detección es un
65 anticuerpo monoclonal derivado de una segunda especie tal como cabra, conejo, ratón o similar. El conjugado de

marcaje se configura, mediante su inclusión de un anticuerpo antiespecie o antihapteno para unirse selectivamente a la sonda de detección.

Un aspecto de la presente divulgación es que los conjugados de cromógeno se pueden configurar para absorber luz de forma más selectiva que los cromógenos disponibles tradicionalmente. La detección se lleva a cabo mediante la absorción de la luz por el conjugado de señalización; por ejemplo, la absorción de al menos aproximadamente un 5 % de la luz incidente facilitaría la detección de la diana. En otras manchas más oscuras, se absorbería al menos aproximadamente un 20 % de la luz incidente. La absorción no uniforme de la luz dentro de los espectros visibles da como resultado que el resto cromóforo aparezca coloreado. Los conjugados de señalización divulgados en el presente documento pueden aparecer coloreados debido a su absorción; los conjugados de señalización pueden proporcionar cualquier color cuando se usan en el ensayo, con ciertos colores particulares que incluyen rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta dependiendo de la absorción espectral asociada con el resto de cromóforo. De acuerdo con otro aspecto, los restos cromóforos pueden tener absorciones espectrales más estrechas que las absorciones de cromógenos usados tradicionalmente (por ejemplo, DAB, Fast Red, Fast Blue). En modos de realización ilustrativos, la absorción espectral asociada con el primer resto cromóforo del primer conjugado de señalización tiene una anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm.

Las absorciones espectrales estrechas permiten que el resto cromóforo del conjugado de señalización se analice de forma diferente que los cromógenos tradicionales. Si bien tiene características mejoradas en comparación con los cromógenos tradicionales, la detección de los conjugados de señalización sigue siendo sencilla. En modos de realización ilustrativos, la detección comprende usar un microscopio de campo claro o un escáner digital equivalente. Las absorciones espectrales estrechas permiten la multiplexación cromogénica a un nivel que va más allá de la capacidad de los cromógenos tradicionales. Por ejemplo, los cromógenos tradicionales son en cierto modo aplicaciones dúplex de forma rutinaria (por ejemplo, Fast Red y Fast Blue, Fast Red y Black (plateado), Fast Red y DAB). Sin embargo, las aplicaciones tríplex o tricolores, o mayores, son atípicas, ya que es difícil distinguir un cromóforo de otro. En modos de realización ilustrativos de la tecnología divulgada en la actualidad, el procedimiento incluye detectar de dos a al menos aproximadamente seis dianas diferentes usando diferentes conjugados de señalización o combinaciones de los mismos. En un modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz comprende iluminar la muestra biológica con una fuente de luz espectralmente estrecha, teniendo la fuente de luz espectralmente estrecha una emisión espectral con una segunda anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm. En otro modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una fuente de luz LED. En otro modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una fuente de luz filtrada.

En un modo de realización, el conjugado de señalización se deposita covalentemente de forma proximal a la diana a una concentración superior a aproximadamente 1×10^{11} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ hasta aproximadamente 1×10^{16} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ de la muestra biológica. En un modo de realización, la primera diana y la segunda diana son ácidos nucleicos genéticos. La detección la primera diana a través de la absorción de la luz por el primer conjugado de señalización incluye la detección de una primera señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta, estando asociada la primera señal coloreada asociada con la absorción espectral con el primer resto cromógeno del primer conjugado de señalización. La detección la segunda diana a través de la absorción de la luz por el segundo conjugado de señalización incluye la detección de una segunda señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta, estando asociada la segunda señal coloreada asociada con la absorción espectral con el segundo resto cromógeno del segundo conjugado de señalización. Detectar una superposición en proximidad a través de la absorción de la luz por el primer conjugado de señalización que se superpone en proximidad con el segundo conjugado de señalización, de modo que una tercera señal coloreada se asocie con la absorción espectral superpuesta de la primera absorción espectral y la segunda absorción espectral. De acuerdo con un ejemplo, este tercer color indica una disposición genética normal y el primer y el segundo color indican una reordenación o translocación genética.

Los conjugados de señalización están configurados para unirse de forma proximal o directa a la una o más dianas en la muestra biológica y están configurados para proporcionar una señal de campo claro.

En modos de realización divulgados particulares, "configurado para proporcionar una señal de campo claro" comprende la absorción de un 5 % o más de luz incidente. En otro modo de realización de la composición, "configurado para proporcionar una señal de campo claro" comprende la absorción de un 20 % o más de luz incidente. En modos de realización divulgados particulares, "configurado para proporcionar una señal de campo claro" comprende tener un pico de absorción con una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 800 nm. En un modo de realización, "configurado para proporcionar una señal de campo claro" comprende tener un pico de absorción con una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 750 nm. En otro modo de realización, "configurado para proporcionar una señal de campo claro" comprende tener un pico de absorción con una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 700 nm. En otro modo de realización más,

“configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende tener un primer pico de absorbancia con una primera $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 500 nm y un segundo pico de absorbancia con una segunda $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 800 nm. En otro modo de realización, “configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende tener un primer pico de absorbancia con una primera $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 500 nm y un segundo pico de absorbancia con una segunda $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 750 nm. En otro modo de realización más, “configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende tener un primer pico de absorbancia con una primera $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 450 nm y un segundo pico de absorbancia con una segunda $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 450 nm y aproximadamente 600 nm. En otro modo de realización, “configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende tener un primer pico de absorbancia con una primera $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 450 nm y un segundo pico de absorbancia con una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 600 nm y aproximadamente 800 nm.

En modos de realización divulgados particulares, una pluralidad de conjugados de señalización están configurados para proporcionar un color ópticamente evidente bajo iluminación de campo claro. El color ópticamente evidente se selecciona entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil, violeta y mezclas de los mismos. En modos de realización divulgados particulares, “configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende impartir un primer color ópticamente diferenciado y un segundo color ópticamente diferenciado. En un modo de realización, “configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende impartir un tercer color ópticamente diferenciado del primer color ópticamente diferenciado y del segundo color ópticamente diferenciado. En otro modo de realización más, “configurado para proporcionar una señal de campo claro” comprende impartir un cuarto color ópticamente diferenciado del primer color ópticamente diferenciado, el segundo color ópticamente diferenciado y el tercer color ópticamente diferenciado.

En modos de realización divulgados particulares, la muestra biológica es una muestra de tejido o citología. La muestra de tejido o citología, tal como una muestra incluida en parafina y fijada en formol, se puede montar en un portaobjetos de vidrio de microscopio para su uso con un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos. En ciertos modos de realización, la muestra biológica comprende una primera diana y la pluralidad de conjugados de señalización están situados proximalmente a la primera diana. La muestra biológica también puede comprender además una segunda diana y una segunda población de la pluralidad de conjugados de señalización que están situados proximalmente a la segunda diana, en la que la primera diana y la segunda diana son diferentes. En un modo de realización se usa una primera sonda de detección para detectar una primera diana y se usa una segunda sonda de detección para detectar la segunda diana.

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El documento de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color serán proporcionadas por la Oficina previa petición y pago de la tasa necesaria.

La figura 1 es un diagrama de flujo que proporciona las etapas de un modo de realización del procedimiento.

Las figuras 2(A-B) son diagramas esquemáticos de modos de realización de dos conjugados de señalización. La figura 2(A) ilustra un conjugado de señalización que comprende un resto reactivo latente y un resto cromóforo. La figura 2(B) ilustra un conjugado de señalización alternativo que comprende además un conector.

Las figuras 3(A-F) son diagramas esquemáticos que ilustran una forma de detectar una diana en una muestra. La figura 3(A) muestra una sonda de detección que se une a la diana. La figura 3(B) muestra un conjugado de marcaje que se une a la sonda de detección. La figura 3(C) muestra un conjugado de señalización que se deposita enzimáticamente sobre la muestra. La figura 3(D) muestra un modo de realización alternativo en el que se usa una sonda de detección basada en anticuerpo para detectar una diana diferente. La figura 3(E) muestra un enfoque para detectar una diana usando un conjugado de amplificación. La figura 3(F) muestra que el conjugado de amplificación se unió a la muestra y se marcó con un conjugado de marcaje secundario.

Las figuras 4(A-B) son diagramas esquemáticos que ilustran (A) una representación de sección transversal de la distribución de conjugados de marcaje proximales a la diana (T) y (B), un gráfico que representa la relación entre potencia de radiación incidente (P_0) a través de la muestra mostrada en (A) y la potencia de radiación transmitida (P) a través de la muestra, en el que el eje y representa la potencia de radiación y el eje x representa la distancia lineal a través de la muestra.

Las figuras 5(A-B) son esquemas que muestran las diferencias entre las señales obtenidas con cromógenos y las señales obtenidas con fluoróforos. La figura 5(A) ilustra la detección de un cromógeno en la que se detecta la luz transmitida. La figura 5(B) ilustra la detección de un fluoróforo en la que se detecta la luz emitida.

Las figuras 6(A-B) son imágenes que ilustran las características de color analizadas en el presente documento. La figura 6(A) es una rueda de colores que representa la relación entre un color observado y la figura 6(B) es una imagen de la radiación absorbida para el conjugado de señalización.

5 Las figuras 7(A-B) son imágenes que ilustran los resultados de un modo de realización particular del procedimiento divulgado. La figura 7(A) es un gráfico que ilustra el espectro de absorción de un conjugado 5-TAMRA-tiramida, y la figura 7(B) es una microfotografía que ilustra una muestra biológica que tiene dianas detectadas por este conjugado de señalización particular.

10 Las figuras 8(A-B) son imágenes que ilustran los resultados obtenidos de un modo de realización particular del procedimiento divulgado. La figura 8(A) es una microfotografía de una tinción doble de dos sondas génicas en una sección de tejido pulmonar que analiza los reordenamientos de ALK asociados con cáncer de pulmón no microcítico y la figura 8(B) es un espectro de UV-Vis de Fast Red y Fast Blue en soluciones de acetato de etilo, así como de las trazas obtenidas de muestras de tejido.

15 Las figuras 9(A) y 9(B) son gráficos de absorbancia frente a longitud de onda e ilustran los dos conjuntos de trazas proporcionados en la figura 8(B). La figura 9(A) ilustra las trazas obtenidas de muestras de tejido, mientras que la figura 9(B) ilustra trazas obtenidas a partir de soluciones de acetato de etilo de Fast Red y Fast Blue.

20 Las figuras 10(A-B) son imágenes y un esquema que ilustra la diferencia entre una detección cromogénica doble de ISH, en la que la figura 10(A) muestra un protocolo de detección combinado SISH/Red y la figura 10(B) muestra un conjugado de señalización púrpura y amarillo como se describe en el presente documento. La señal producida al combinar estos dos cromógenos se detecta como un tercer color único.

25 Las figuras 11(A-B) son microfotografías que muestran dos ejemplos de deposición proximal de dos colores para crear un tercer color visualmente diferenciado.

30 Las figuras 12(A-C) son microfotografías que muestran el uso de iluminación LED para separar la señal de una doble tinción cromogénica en la que la figura 12(A) muestra la iluminación con luz blanca, la figura 12(B) muestra la iluminación con luz verde y la figura 12(C) muestra la iluminación con luz roja.

35 Las figuras 13(A-B) son microfotografías que muestran la figura 13(A) un portaobjetos de control al que no se añadió BSA-BF y la figura 13(B) un portaobjetos en el que BSA-BF se había unido a la muestra.

Las figuras 14(A-B) son microfotografías que muestran una muestra teñida con un conjugado de señalización, la figura 14(A) sin potenciación de tirosina y la figura 14(B) con potenciación de tirosina.

40 Las figuras 15(A-B) son microfotografías que muestran una IHC de HER2 (4B5) en xenoinjertos Calu-3 teñidos con dos conjugados de señalización diferentes que tienen los espectros de absorción mostrados en la figura 16.

La figura 16 ilustra los espectros de absorbancia de dos conjugados de señalización en solución y como se usan para teñir las muestras mostradas en las figuras 15(A-B).

45 Las figuras 17(A-E) muestran microfotografías (figuras 17(A-D)) de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes restos cromógenos. La figura 17(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada.

50 Las figuras 18(A-E) muestran microfotografías (figuras 18(A-D)) de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes restos cromógenos. La figura 18(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada.

55 Las figuras 19(A-E) muestran microfotografías (figuras 19(A-D)) de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes restos cromógenos. La figura 19(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada.

60 Las figuras 20(A-E) muestran microfotografías (figuras 20(A-D)) de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes restos cromógenos. La figura 20(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada.

65 Las figuras 21(A-B) son microfotografías de una muestra de tejido de amígdala que comprende linfocitos B normales no cancerosos, en las que la figura 21(A) es una vista ampliada 40x de una tinción positiva para ARNm KAPPA

(marrón) y LAMBDA (púrpura) y la figura 21(B) es una vista ampliada 20x de la misma.

La figura 22 es un esquema que muestra los números de copias de Kappa / Lambda esperados asociados con diferentes tipos de linfomas de linfocitos B no Hodgkins.

5 Las figuras 23(A-B) son microfotografías, en las que la figura 23(A) es una primera muestra de tejido de linfoma que muestra una tinción doble de ARNm KAPPA (marrón) y ARNm LAMBDA (púrpura, mínimamente observada) que muestra muy pocas células que expresan ARNm LAMBDA, y la figura 23(B) es una segunda muestra de tejido de linfoma que muestra una tinción doble de ARNm KAPPA (marrón, mínimamente observado) y ARNm LAMBDA (púrpura) que muestra muy pocas células que expresan ARNm KAPPA.

Las figuras 24(A-B) son microfotografías que demuestran la doble ISH cromogénica de ARNm para una muestra que resultaría confusa para los procedimientos moleculares de diagnóstico.

15 Las figuras 25(A-B) son microfotografías de muestras de tejido mamario, en las que la figura 25(A) es una tinción negativa para ARNm de ACTB y la figura 25(B) es una tinción positiva para ARNm de ACTB.

Las figuras 26(A-C) son microfotografías de muestras de tejido mamario que muestran tinción doble de ACTB, en las que la figura 26(A) es una tinción negativa (0+) para ARNm de HER2, la figura 26(B) es una tinción positiva (1/2+) para ARNm de HER2 y la figura 26(C) es una tinción positiva (3+) para ARNm de HER2.

La figura 27 son datos de varios bloques de tejido que comparan los resultados del análisis por ISH de HER2, el análisis por IHC de HER2 y la ISH bicolor de ARNm de HER2.

25 Las figuras 28(A-B) son microfotografías que ilustran la detección directa del gen PTEN usando un ensayo de ISH de ADN que incorpora la deposición directa de un conjugado Rod-tiramida. La figura 28(A) es una microfotografía con un aumento de 40x y la figura 28(B) es una microfotografía de un área separada con un aumento de 63x.

La figura 29 es una microfotografía que ilustra la detección directa de una diana de ERG5' en células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 usando un ensayo de ISH de ADN con un conjugado de señalización Rod-tiramida.

La figura 30 es una microfotografía que ilustra la detección directa de una diana de ERG3' en células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 usando un ensayo de ISH de ADN con un conjugado de señalización DABSYL-tiramida.

La figura 31 es una microfotografía que ilustra la detección amplificada de las dianas del gen ERG3' y ERG5' en células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 usando un ensayo de ISH de ADN con un conjugado de señalización Rod-tiramida y un conjugado de señalización DABSYL-tiramida.

La figura 32 es una microfotografía obtenida usando un ensayo de ISH de ADN multiplexado que muestra el reordenamiento del gen ERG en células epiteliales de cáncer de próstata VCaP.

La figura 33 es una microfotografía obtenida usando un ensayo de ISH de ADN multiplexado que ilustra la reordenación del gen que codifica la cinasa del linfoma anaplásico en un sedimento de células CARPUS.

La figura 34 es una microfotografía obtenida usando un ensayo de ISH de ADN multiplexado que ilustra el reordenamiento del gen que codifica la cinasa del linfoma anaplásico en una sección de adenocarcinoma de pulmón.

50 Las figuras 35(A-C) son microfotografías que ilustran la detección directa de dianas génicas en células Calu-3 usando un ensayo de ISH de ARNm. La figura 35(A) muestra la detección de la diana de ARN 18S usando un conjugado Rod-tiramida. La figura 35(B) muestra la detección de la diana de ARN 18S usando deposición directa de un conjugado DABSYL-tiramida. La figura 35(C) ilustra un doble ensayo usando el conjugado DABSYL-tiramida y el conjugado Rod-tiramida.

La figura 36 es una microfotografía que ilustra la detección directa de proteínas HER2 y P53 en células Calu-3 usando un ensayo de IHC multiplexado. HER2 se detecta por deposición directa del conjugado DABSYL-tiramida. P53 se detecta por deposición directa del conjugado Rodamina-tiramida.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones y abreviaturas

65 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of*

Molecular Biology, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

- 5 Tal como se usan en el presente documento, las formas del singular “un”, “uno” y “el/la” incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra “o” tiene por objeto incluir “y” a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término “incluye” se define de forma inclusiva, de modo que “incluye A o B” significa que incluye A, B o A y B. Además, también se entiende que todos los tamaños de nucleótidos o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los
- 10 ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados.
- 15 En caso de conflicto con la divulgación de publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.
- 20 En el presente documento se divulgan una o más fórmulas químicas genéricas. Para las fórmulas generales proporcionadas en el presente documento, si no se indica un sustituyente, un experto en la técnica apreciará que el sustituyente es hidrógeno. Un enlace que no está conectado a un átomo, pero se muestra, por ejemplo, extendiéndose hacia el interior de un sistema de anillo, indica que la posición de dicho sustituyente es variable. Una línea curva trazada a través de un enlace indica que alguna estructura adicional está unida a esa posición,
- 25 típicamente un conector o el grupo o resto funcional utilizado para unir dos restos (por ejemplo, un cromóforo y una tiramida o derivado de tiramida). Además, si no se indica una estereoquímica para los compuestos que tienen uno o más centros quirales, se incluyen todos los enantiómeros y diastereómeros. De forma similar, para una recitación de grupos alifáticos o alquilo, también se incluyen todos sus isómeros estructurales. A menos que se indique lo contrario, los grupos R (por ejemplo, R¹-R²⁴) en las fórmulas generales que figuran a continuación se seleccionan independientemente de: hidrógeno; acilo; aldehído; alcoxi; alifático, particularmente alifático inferior (por ejemplo, alquilo C₁₋₁₀, alquileo C₁₋₁₀, alquino C₁₋₁₀); alifático sustituido; heteroalifático (por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo); alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y
- 35 combinaciones de los mismos, ya sea en la cadena o unido al mismo); oxima; éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=); alcoholes (es decir, hidroxilo alifático o alquilo, particularmente hidroxilo de alquilo inferior); amido; amino; aminoácido; arilo; alquilarilo, tal como bencilo; carbohidratos; monosacáridos, tales como glucosa y fructosa; disacáridos, tales como sacarosa y lactosa; oligosacáridos; polisacáridos; carbonilo; carboxilo; carboxilato (incluyendo sus sales, tales como carboxilatos de metales del Grupo I o de iones de amonio); cíclico; ciano (-CN); éster, tal como éster alquílico; éter; exometileno; halógeno; heteroarilo; heterocíclico; hidroxilo; hidroxilamina; ceto, como cetonas alifáticas; nitro; sulfhidrilo; sulfonilo; sulfóxido; exometileno; y combinaciones de los mismos.

45 “Absorbancia” o “Absorción” se refiere a la relación logarítmica entre la radiación incidente sobre un material (P_0) y la radiación transmitida a través de un material (P). La absorbancia A de un material varía con la longitud del recorrido de la luz a través de él (z) de acuerdo con la ecuación 1.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -(\log T) = \epsilon c l$$

Ecuación 1

50 P_0 y P son las intensidades de luz incidente y transmitida, T es la transmisión óptica, y ϵ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l es la longitud o profundidad del área iluminada (cm), y c es la concentración de la molécula absorbente.

55 “Amplificación” se refiere al acto o resultado de hacer que una señal sea más fuerte.

“Conjugado de amplificación” se refiere a una molécula que comprende una especie reactiva latente acoplada a un hapteno, tal como, por ejemplo, un conjugado hapteno-tiramida. El conjugado de amplificación puede servir como un miembro de un par de unión específico, tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente al hapteno. El aspecto de amplificación se refiere a la especie reactiva latente que se convierte

60 enzimáticamente en una especie reactiva de modo que una sola enzima puede generar una multiplicidad de especies reactivas. Se hace referencia a la patente de EE. UU. n.º 7.695.929.

“Anticuerpo”, ocasionalmente abreviado “Ab”, se refiere a inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina

(incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado (por ejemplo, en mamíferos como humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una constante de unión por la molécula de interés que es al menos 10^3 M⁻¹ mayor, al menos 10^4 M⁻¹ mayor o al menos 10^5 M⁻¹ mayor que una constante de unión por otras moléculas en una muestra biológica. Un anticuerpo se refiere además a un ligando polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se pueden componer de una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas la región variable pesada (VH) y la región variable ligera (VL). En conjunto, la región VH y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo. El término anticuerpo también incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y partes de ellas bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos [tales como fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab como se conocen en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como se conocen en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.015.695, 6.005.079, 5.874.541, 5.840.526, 5.800.988 y 5.759.808).

El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo monoclonal que se caracteriza porque es producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de las cadenas ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

"Antígeno" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que se puede unir específicamente a los productos de inmunidad humoral o celular específica, tal como una molécula de anticuerpo o receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluidos, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, azúcares (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

"Cromóforo" se refiere a una molécula o una parte de una molécula responsable de su color. El color surge cuando una molécula absorbe ciertas longitudes de onda de la luz visible y transmite o refleja otras. Una molécula que tiene una diferencia de energía entre dos orbitales moleculares diferentes que están dentro del intervalo del espectro visible puede absorber la luz visible y, por lo tanto, caracterizarse adecuadamente como un cromóforo. La luz visible incidente en un cromóforo puede ser absorbida, excitando así un electrón desde un orbital molecular en el estado fundamental a un orbital molecular en estado excitado.

"Conjugar", "ensamblar", "unir", "acoplar" o "enlazar" se usan como sinónimos para referirse a unir un primer átomo o molécula con otro átomo o molécula para formar una molécula más grande directa o indirectamente.

"Conjugado" se refiere a dos o más moléculas que están unidas covalentemente en una construcción más grande. En algunos modos de realización, un conjugado incluye una o más biomoléculas (tales como péptidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, azúcares, polisacáridos, lípidos, glicoproteínas y lipoproteínas) unidas covalentemente a una o más moléculas diferentes, tales como una o más de otras biomoléculas. En otros modos de realización, un conjugado incluye una o más moléculas de unión específica (tales como anticuerpos y secuencias de ácido nucleico) unidas covalentemente a uno o más marcadores detectables (haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos). En otros modos de realización, un conjugado incluye uno o más restos reactivos latentes unidos covalentemente a marcadores detectables (haptenos, restos cromóforos, restos fluorescentes).

"DABSYL" se refiere a 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida, un cromóforo amarillo-naranja.

"Derivado" se refiere a un compuesto que se deriva de un compuesto similar al reemplazar un átomo o grupo de átomos por otro átomo o grupo de átomos.

"Epítipo" se refiere a un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular.

"Potenci(ar/ador/ación)". Un potenciador o reactivo potenciador es cualquier compuesto o cualquier combinación de compuestos suficiente para aumentar la actividad catalítica de una enzima, en comparación con la actividad enzimática sin dicho(s) compuesto(s). El(los) potenciador(es) o reactivo(s) potenciador(es) también se puede(n) definir como un compuesto o combinación de compuestos que aumentan o aceleran la velocidad de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. Potenci(ar/ación) es un proceso mediante el cual la actividad catalítica de una enzima se incrementa mediante un potenciador, en comparación con un proceso que no incluye dicho potenciador. Potenci(ar/ación) también se puede definir como el aumento o la aceleración de la velocidad de unión de un

conjugado activado a un sitio receptor. La potenciación se puede medir visualmente, por ejemplo, mediante puntuación de un anatomopatólogo. En modos de realización particulares, las puntuaciones varían de más de 0 a más de 4, y un número más alto indica una mejor detección visual. Más típicamente, las puntuaciones varían de más de 0 a aproximadamente 4++, como 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 3,75, 4, 4+ y 4++. Además, la potenciación se puede medir mediante la determinación de la $V_{máx}$ aparente de una enzima. En modos de realización particulares, el término abarca valores de $V_{máx}$ aparente (medidos como densidad óptica/minuto) que varían de más de 0 mOD/min a aproximadamente 400 mOD/min, tales como aproximadamente 15 mOD/min, 18 mOD/min, aproximadamente 20 mOD/min, aproximadamente 40 mOD/min, aproximadamente 60 mOD/min, aproximadamente 80 mOD/min, aproximadamente 100 mOD/min, aproximadamente 120 mOD/min, aproximadamente 140 mOD/min, aproximadamente 160 mOD/min, aproximadamente 200 mOD/min, aproximadamente 250 mOD/min, aproximadamente 300 mOD/min, aproximadamente 350 mOD/min y aproximadamente 400 mOD/min. Más típicamente, la $V_{máx}$ varía de más de 0 mOD/min a aproximadamente 160 mOD/min, tal como aproximadamente 20 mOD/min, aproximadamente 40 mOD/min, aproximadamente 60 mOD/min, aproximadamente 80 mOD/min, aproximadamente 100 mOD/min, aproximadamente 120 mOD/min, aproximadamente 140 mOD/min y aproximadamente 160 mOD/min. Además, se puede producir una potenciación usando cualquier concentración de un potenciador mayor que 0 mM. Se hace referencia a la publicación de patente de EE. UU. n.º 2012/0171668, que divulga potenciadores útiles dentro de la presente divulgación.

“**Grupo funcional**” se refiere a un grupo específico de átomos dentro de una molécula que es responsable de las reacciones químicas características de la molécula. Los grupos funcionales ilustrativos incluyen, sin limitación, alcano, alqueno, alquino, areno, halo (fluoro, cloro, bromo, yodo), epóxido, hidroxilo, carbonilo (cetona), aldehído, éster de carbonato, carboxilato, éter, éster, peroxi, hidropoxi, carboxamida, amina (primaria, secundaria, terciaria), amonio, imida, azida, cianato, isocianato, tiocianato, nitrato, nitrito, nitrilo, nitroalcano, nitroso, piridilo, fosfato, sulfonilo, sulfuro, tiol (sulfhidrilo) y disulfuro.

“**AMA**” se refiere a la anchura total de un pico de absorbancia a la mitad de la absorbancia máxima.

“**Hapteno**” se refiere a una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica por sí misma.

“**Conector**” se refiere a una molécula o grupo de átomos colocados entre dos restos. Por ejemplo, un conjugado de señalización puede incluir un conector químico entre el resto cromóforo y un resto reactivo latente. Típicamente, los conectores son bifuncionales, es decir, el conector incluye un grupo funcional en cada extremo, en el que los grupos funcionales se usan para acoplar el conector a los dos restos. Los dos grupos funcionales pueden ser iguales, es decir, un conector homobifuncional, o diferentes, es decir, un conector heterobifuncional.

“**MG**” se refiere al verde malaquita.

“**Resto**” se refiere a un fragmento de una molécula, o una parte de un conjugado.

“**Molécula de interés**” o “**diana**” se refiere a una molécula para la cual se debe determinar la presencia, ubicación y/o concentración. Los ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácidos nucleicos.

“**Multiplex(ación/ado/ar)**” se refiere a la detección de múltiples dianas en una muestra de forma simultánea, de forma sustancialmente simultánea o de forma secuencial. La multiplexación puede incluir identificar y/o cuantificar múltiples ácidos nucleicos distintos (por ejemplo, ADN, ARN, ARNm, miARN) y polipéptidos (por ejemplo, proteínas) tanto individualmente como en cualquiera y en todas las combinaciones.

“**Proximal**” se refiere a estar situado en o cerca del punto de referencia. Como se usa en el presente documento, proximal significa hasta una distancia de aproximadamente 5000 nm, hasta una distancia de aproximadamente 2500 nm, hasta una distancia de aproximadamente 1000 nm, hasta una distancia de aproximadamente 500 nm, hasta una distancia de aproximadamente 250 nm, hasta una distancia de aproximadamente 100 nm, hasta una distancia de aproximadamente 50 nm, hasta una distancia de aproximadamente 10 nm o hasta una distancia de aproximadamente 5 nm del punto de referencia.

“**Grupos reactivos**” se refiere a una variedad de grupos adecuados para acoplar una primera unidad a una segunda unidad como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el grupo reactivo podría ser un grupo reactivo de amina, tal como un isotiocianato, un isocianato, una azida de acilo, un éster de NHS, un cloruro de ácido, tal como cloruro de sulfonilo, aldehídos y glioxales, epóxidos y oxiranos, carbonatos, agentes de arilación, imidoésteres, carbodiimidas, anhídridos y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales reactivos de tiol adecuados incluyen haloacetilo y haluros de alquilo, maleimidas, aziridinas, derivados de acrililo, agentes de arilación, reactivos de intercambio tiol-disulfuro, tales como disulfuros de piridilo, TNB-tiol y reductores disulfuro, y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales reactivos de carboxilato adecuados incluyen diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, compuestos de carbonildiimidazol y carbodiimidas. Los grupos funcionales reactivos de hidroxilo adecuados incluyen epóxidos y oxiranos, carbonildiimidazol, N,N'-disuccinimidil carbonatos o N-hidroxisuccinimidil cloroformiatos, compuestos oxidantes de peryodato, oxidación enzimática, alquil halógenos e

isocianatos. Los grupos funcionales reactivos de aldehído y cetona incluyen hidrazinas, bases de Schiff, productos de aminación reductiva, productos de condensación de Mannich y combinaciones de los mismos. Los compuestos reactivos de hidrógeno activo incluyen derivados de diazonio, productos de condensación de Mannich, productos de reacción de yodación y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales químicos fotorreactivos incluyen aril azidas, aril azidas halogenadas, benzofononas, diazocompuestos, derivados de diazirina y combinaciones de los mismos.

“**Rod**” se refiere a rodamina, un cromóforo.

10 “**Muestra**” se refiere a una muestra biológica que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína o combinaciones de los mismos, obtenida de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, sangre periférica, orina, saliva, biopsia de tejido, pieza quirúrgica, muestras de amniocentesis y material de necropsia.

15 “**Resto de unión específica**” se refiere a un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan porque se unen entre sí para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es al menos $10^3 M^{-1}$ mayor, $10^4 M^{-1}$ mayor o $10^5 M^{-1}$ mayor que una constante de unión de cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas en una muestra biológica). Ejemplos particulares de restos de unión específica incluyen proteínas de unión específica (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, avidinas tales como estreptavidinas y proteína A), secuencias de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos de proteínas. Los restos de unión específica también pueden incluir las moléculas (o partes de las mismas) que están específicamente unidas por dichas proteínas de unión específica. Los restos de unión específica a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, nucleótidos, oligonucleótidos, proteínas, péptidos o aminoácidos.

25 “**TAMRA**” se refiere a carboxitetrametilrodamina, un cromóforo de rodamina rosado.

“**TMR**” se refiere a tetrametilrodamina, un cromóforo de rodamina rojo.

“**TSA**” se refiere a la amplificación de la señal de tiramida.

30 “**TYR**” se refiere a tiramina, tiramida, derivados de tiramina y/o tiramida.

II. Procedimientos para detectar una diana en una muestra

35 En este documento se divulgan modos de realización de un procedimiento para usar los conjugados divulgados para detectar una o más dianas en una muestra biológica. En modos de realización divulgados particulares, uno o más de los conjugados se usan en ensayos estándar, tales como esquemas de detección por hibridación *in situ* (ISH), inmunocitoquímica e inmunohistoquímica (IHC). En modos de realización divulgados particulares, cualquiera de estos ensayos se puede referir a multiplexación en la que se pueden detectar múltiples dianas diferentes. Los modos de realización del procedimiento también se pueden combinar. Por ejemplo, un procedimiento que usa un esquema de detección por IHC se puede combinar con un esquema de detección por ISH. Los modos de realización ejemplares del procedimiento divulgado se pueden usar para determinar la clonalidad celular (por ejemplo, una célula expresa cualquiera de dos biomarcadores, pero no ambos), predecir la respuesta de pacientes con cáncer al tratamiento del cáncer (por ejemplo, detectar biomarcadores predictivos para determinar si un paciente en particular responderá al tratamiento), análisis simultáneos de expresión de biomarcadores y expresión de genes de control interno para monitorizar el rendimiento del ensayo y la integridad de la muestra, y combinaciones de los mismos.

50 Los procedimientos se pueden usar en muestras biológicas que tienen una fase sólida, tales como componentes proteicos de células o estructuras celulares que se inmovilizan sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de microscopio). En modos de realización ilustrativos, la muestra es una muestra de tejido o de citología, tal como una muestra incluida en parafina y fijada en formol, montada en un portaobjetos de microscopio de vidrio. En un modo de realización, el procedimiento es particularmente para un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos.

55 Un experto en la técnica apreciará que se pueden detectar numerosos tipos de dianas usando el procedimiento divulgado. En ciertos modos de realización divulgados, la diana puede ser una secuencia particular de ácido nucleico, una proteína o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, la diana puede ser una secuencia particular de ARN (por ejemplo, ARNm, microARN y ARNip), ADN y combinaciones de los mismos. Se puede sospechar que la muestra incluye una o más moléculas diana de interés. Las moléculas diana pueden estar en la superficie de las células y las células pueden estar en una suspensión o en una sección de tejido. Las moléculas diana también pueden ser intracelulares y se detectan después de la lisis celular o la penetración de la célula por una sonda. Un experto en la técnica apreciará que el procedimiento de detección de moléculas diana en una muestra variará dependiendo del tipo de muestra y de la sonda utilizada. En la técnica se conocen procedimientos de preparación y recogida de muestras.

65 Las muestras para uso en los modos de realización del procedimiento y con la composición divulgada en el presente documento, tales como un tejido u otra muestra biológica, se pueden preparar usando cualquier procedimiento

conocido en la técnica por un experto en la materia. Las muestras se pueden obtener de un sujeto para el cribado de rutina o de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno, tales como una anomalía genética, una infección o una neoplasia. Los modos de realización descritos del procedimiento divulgado también se pueden aplicar a muestras que no tienen anomalías genéticas, enfermedades, trastornos, etc., que se conocen como muestras "normales".

5 Dichas muestras normales son útiles, entre otras cosas, como controles para la comparación con otras muestras. Las muestras se pueden analizar para muchas finalidades diferentes. Por ejemplo, las muestras se pueden usar en un estudio científico o para el diagnóstico de una enfermedad sospechosa, o como indicadores pronósticos de éxito del tratamiento, supervivencia, etc. Las muestras pueden incluir dianas múltiples que se pueden unir específicamente por una o más sondas de detección. A lo largo de la presente divulgación, cuando se hace referencia a una proteína diana, se entiende que las secuencias de ácido nucleico asociadas a dicha proteína también se pueden utilizar como dianas. En algunos ejemplos, la diana es una proteína o molécula de ácido nucleico de un patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito intracelular, por ejemplo, de un genoma vírico. Por ejemplo, una proteína diana se puede producir a partir de una secuencia de ácido nucleico diana asociada a (por ejemplo, correlacionada con, causalmente implicada en, etc.) una enfermedad.

15 En algunos modos de realización, el procedimiento divulgado se puede usar para detectar microARN (miARN o miR). Los microARN son ARN pequeños, no codificantes, que regulan negativamente la expresión génica, por ejemplo, mediante la represión de la traducción. Por ejemplo, miR-205 regula la transición epitelial a mesenquimal (EMT), un proceso que facilita la remodelación tisular durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la EMT también es una etapa temprana en la metástasis tumoral. La regulación negativa de microARN, tal como miR-205, puede ser una etapa importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión de miR-205 se regula negativamente o se pierde en algunos cánceres de mama. El miR-205 también se puede usar para estratificar carcinomas de células escamosas y carcinomas de pulmón no microcíticos (*J. Clin Oncol.*, 2009, 27(12):2030-7). Se ha encontrado que otros microARN modulan las cascadas de señalización angiogénicas. La regulación negativa de miR-126, por ejemplo, puede exacerbar la progresión del cáncer a través de la angiogénesis y el aumento de la inflamación. Por lo tanto, los niveles de expresión de microARN pueden ser indicativos de un estado de enfermedad. Para los microARN que están dentro del alcance de la presente divulgación, se hace referencia a la solicitud de PCT nº PCT/EP2012/073984.

30 En un modo de realización divulgado particular, el procedimiento divulgado se puede usar para analizar bloques clínicos de tejido incluido en parafina y fijado en formol (IPFF) de cáncer de mama que se han caracterizado por el número de copias del gen *HER2* y la expresión de proteína Her2 usando ensayos INFORM HER2 Dual ISH e IHC (Ventana Medical Systems, Inc., "VMSI"), respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm de *HER2* en relación con *ACTB* (β -actina) se pueden determinar usando qPCR de acuerdo con procedimientos conocidos. Los resultados de los análisis de copia de genes, expresión de proteínas y qPCR se pueden comparar con los resultados obtenidos a través de la detección por ISH-ARNm de *HER2* y *ACTB* usando el procedimiento divulgado en el presente documento para analizar muestras IPFF. Otros resultados de este procedimiento se analizan a continuación en el presente documento.

40 En otro modo de realización, el procedimiento divulgado se puede usar para identificar la proliferación monoclonal de ciertos tipos de células. El cáncer es el resultado del crecimiento incontrolado de una población celular; esta población puede surgir a partir de una única célula madre mutante y, por lo tanto, comprender una población clonal. Un ejemplo de cáncer derivado de una población clonal es el de los linfomas no Hodgkin de linfocitos B (LNH-B) que surgen de la proliferación monoclonal de linfocitos B. La expansión clonal de una población específica de linfocitos B se puede detectar mediante expresión única de proteína y ARNm de cadena ligera KAPPA o LAMBDA como parte de su anticuerpo contra receptores de linfocitos B. En consecuencia, un modo de realización del procedimiento divulgado en el presente documento se refiere a la identificación de la proliferación monoclonal de linfocitos B usando tinción doble cromogénica de ARNm de KAPPA y LAMBDA.

50 La expresión uniforme de cualquiera de las cadenas ligeras por los linfocitos B cancerosos permite la diferenciación de los linfomas de linfocitos B monoclonales de las poblaciones de linfocitos B que expresan cadenas ligeras KAPPA y LAMBDA que resultan durante la respuesta inmunitaria normal. La determinación de los patrones de expresión del ARNm de la cadena ligera se complica por el intervalo del número de copias del ARNm de la cadena ligera y la proteína del anticuerpo expresados por neoplasias de linfocitos B derivadas de una variedad de estadios de linfocitos B (células indiferenciadas y de memoria: 10-100 copias por célula; células plasmáticas: ~ 100 mil copias por célula).

Procedimientos

60 En modos de realización ilustrativos, un procedimiento para detectar una diana en una muestra biológica incluye poner en contacto la muestra biológica con una sonda de detección, poner en contacto la muestra biológica con un conjugado de marcaje y poner en contacto la muestra biológica con un conjugado de señalización. La figura 1 es un diagrama de flujo que proporciona las etapas de un modo de realización de un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación. En particular, el procedimiento incluye una etapa 1 de poner en contacto la muestra con una(s) sonda(s) de detección. Esta etapa puede incluir una sonda de detección única o una pluralidad de sondas de detección específicas para una pluralidad de dianas diferentes. Una etapa 2 posterior incluye poner en contacto la

muestra con un conjugado de marcaje. Una etapa 7 posterior adicional incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de señalización. Las líneas discontinuas a la etapa 3, que incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de amplificación, y a la etapa 5, que incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de marcaje secundario, representan que estas etapas son opcionales. Las líneas discontinuas a la etapa 10, que incluye poner en contacto la muestra con un inhibidor enzimático, indican que se puede usar un bucle opcional para detectar dianas múltiples de acuerdo con un enfoque multiplexado. En modos de realización divulgados particulares, se pueden usar una o más etapas en las que se añade un inhibidor enzimático a la muestra biológica. Por ejemplo, en modos de realización en los que se añaden dos o más conjugados de señalización a la muestra, se puede añadir un inhibidor enzimático (por ejemplo, un inhibidor de peroxidasa) para evitar cualquier actividad enzimática después de que se haya depositado covalentemente un conjugado de señalización y antes de que se añada un segundo conjugado de señalización diferente.

En modos de realización ilustrativos, la detección de dianas en la muestra incluye poner en contacto la muestra biológica con un primer conjugado de amplificación que se asocia con el primer conjugado de marcaje. Por ejemplo, el conjugado de amplificación se puede depositar covalentemente de forma proximal o directa sobre el primer conjugado de marcaje. El primer conjugado de amplificación se puede seguir poniendo en contacto con la muestra biológica con un conjugado de marcaje secundario. De manera ilustrativa, la amplificación de señal usando conjugados de amplificación potencia la deposición del conjugado de señalización. La deposición potenciada del conjugado de señalización permite una identificación visual más fácil de la señal cromogénica, es decir, la amplificación hace que el color sea más oscuro y más fácil de ver. Para dianas de baja expresión, esta amplificación puede hacer que la señal se vuelva lo suficientemente oscura para ser visible, mientras que, sin amplificación, la diana no sería apreciable. Se usan condiciones adecuadas para introducir los conjugados de señalización con la muestra biológica, e incluyen típicamente proporcionar un tampón o solución de reacción que comprende un peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), y tiene una concentración de sal y un pH adecuados para permitir o facilitar que la enzima lleve a cabo su función deseada. En modos de realización divulgados particulares, esta etapa del procedimiento se realiza a temperaturas que varían de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C. Estas condiciones permiten que la enzima y el peróxido reaccionen y promuevan la formación de radicales en el resto reactivo latente del conjugado de señalización. El resto reactivo latente y, por lo tanto, el conjugado de señalización como un todo, se depositarán covalentemente sobre la muestra biológica, particularmente en uno o más residuos de tirosina proximales al conjugado enzimático inmovilizado, residuos de tirosina de la parte de enzima del conjugado enzimático y/o residuos de tirosina de la parte de anticuerpo del conjugado enzimático. La muestra biológica se ilumina entonces con luz y la diana se puede detectar a través de la absorbancia de la luz producida por el resto cromógeno del conjugado de señalización.

Dependiendo del nivel de multiplexación, el bucle opcional se puede repetir una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más veces dependiendo del número de dianas que se vayan a detectar en la muestra. Durante las detecciones posteriores, el conjugado de marcaje puede ser el mismo o diferente dependiendo de los reactivos de bloqueo utilizados. Un ejemplo de diferentes conjugados de marcaje sería un primer conjugado de enzima-anticuerpo anti-hapteno y un segundo conjugado de enzima-anticuerpo anti-hapteno, en el que el primer anticuerpo anti-hapteno y el segundo anticuerpo anti-hapteno son específicos para diferentes haptenos. De acuerdo con otro ejemplo, la diferencia podría implicar diferentes anticuerpos antiespecie, en los que las dianas se detectaron usando anticuerpos primarios derivados de diferentes especies. Durante las detecciones posteriores, el conjugado de señalización utilizado para cada diana sería típicamente diferente. Por ejemplo, las diferentes dianas se podrían detectar como colores diferentes.

Aunque la etapa 1 de la figura 1 de poner en contacto la muestra con la(s) sonda(s) de detección busca la detección simultánea de dianas múltiples durante una etapa, la multiplexación también se puede realizar de forma secuencial. Un procedimiento secuencial incluiría la adición de una primera sonda de detección, seguida de llevar a cabo los diversas etapas posteriores del procedimiento (es decir, 2, 7, opcionalmente 3 y 5). A continuación, se puede añadir una segunda sonda de detección después de que el primer conjugado de señalización se haya depositado covalentemente en o proximalmente a la primera diana, proporcionando así la capacidad de detectar una segunda diana. Este proceso se puede entonces repetir iterativamente usando un conjugado de señalización diferente que comprende un resto cromóforo que difiere de los otros depositados.

El procedimiento también comprende una etapa 9 de iluminar la muestra con luz y una etapa 11 de detectar la(s) diana(s). La señal producida por el conjugado de señalización se detecta, proporcionando de ese modo la capacidad de detectar una diana particular. En modos de realización divulgados particulares, la señal producida por el conjugado de señalización puede ser fluorescente, cromogénica o combinaciones de las mismas. Los modos de realización a modo de ejemplo se refieren a la detección de una señal cromogénica. La señal se puede detectar usando procedimientos adecuados conocidos por los expertos en la técnica, tales como procedimientos de detección cromogénica, procedimientos de detección fluorogénica y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la señal se puede detectar usando técnicas de detección de campo claro o técnicas de detección de campo oscuro.

Las figuras 2(A-B) son diagramas esquemáticos de dos modos de realización de conjugados de señalización. La figura 2(A) ilustra un conjugado de señalización 12 que comprende un resto reactivo latente 4 y un resto cromóforo 6. La figura 2(B) ilustra un conjugado de señalización alternativo 14, que comprende un resto cromóforo 6, un resto

reactivo latente 4, y que comprende además un conector 8.

Las figuras 3(A-F) son diagramas esquemáticos que ilustran un modo de realización de un procedimiento para detectar una diana 17 en una muestra 16. La figura 3(A) muestra una sonda de detección 18, que se muestra ilustrativamente como una molécula de ácido nucleico con un hapteno 19, que se une a la diana 17, que, en este caso, sería una diana de ácido nucleico. La figura 3(B) muestra un conjugado de marcaje 20 que se une a una sonda de detección 18. El conjugado de marcaje se representa como un anticuerpo anti-hapteno específico para el conjugado de hapteno 19 para dos enzimas, representadas como los círculos que contienen una "E". Aunque se muestra como un conjugado de un anticuerpo y dos moléculas de enzima, el número de enzimas por anticuerpo puede ser alterado y optimizado para aplicaciones particulares por un experto en la técnica. En particular, el número de enzimas se podría modificar de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, dependiendo de diversos factores que incluyen el tamaño del anticuerpo y el tamaño de las enzimas. La figura 3(C) muestra el conjugado de señalización 12 que se deposita enzimáticamente sobre la muestra 16. En particular, las enzimas "E", parte del conjugado de marcaje 20, catalizan la conversión del primer resto reactivo latente del conjugado de señalización 12 en una primera especie reactiva 13. Esta catálisis se representa mediante una primera flecha grande 21 que dirige el conjugado de señalización 12 hacia las enzimas "E" y una segunda flecha grande 22 que sale de las enzimas "E" hacia la especie reactiva 13, que está hecha del resto cromóforo 6 y un resto reactivo, que se representa mediante el punto, reemplazando la flecha como se muestra en el conjugado de señalización 6. La especie reactiva 13 se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la primera diana, para formar un cromóforo 15 unido covalentemente. La figura 3(D) muestra un modo de realización alternativo en el que se usa una sonda de detección basada en anticuerpo 28 para detectar una diana de proteína 27. La figura 3(D) se incluye para mostrar que la detección de una diana de ácido nucleico 17 y/o una diana de proteína 27 es análoga, excepto que la sonda de detección 28 se representa como un anticuerpo en oposición a un ácido nucleico (por ejemplo, sonda de detección 18). La sonda de detección 28 se muestra como no haptenada, lo que implica que el conjugado de marcaje 30 es un anticuerpo antiespecie conjugado con las enzimas "E". Sin embargo, en modos de realización alternativos, la sonda de detección 28 podría estar haptenada y el conjugado de marcaje 30 podría incluir un anticuerpo anti-hapteno.

La figura 3(E) muestra un enfoque para detectar la diana que usa un conjugado de amplificación 42. En particular, el conjugado de amplificación 42 se deposita enzimáticamente sobre una muestra 36. En particular, las enzimas "E", parte del conjugado de marcaje 40, catalizan la conversión del primer resto reactivo latente del conjugado de amplificación 42 en una primera especie reactiva 43. Esta catálisis se representa mediante una primera flecha grande 31 que dirige el conjugado de amplificación 42 hacia las enzimas "E" y una segunda flecha grande 32 que sale de las enzimas "E" hacia la especie reactiva 43, que está hecha de un hapteno (mostrado como una cruz) y un resto reactivo, que se representa mediante el punto, reemplazando la flecha como se muestra en el conjugado de amplificación 42. La especie reactiva 43 se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la primera diana, para formar un hapteno 45 unido covalentemente. El esquema representado en la figura 3(E) se muestra en el presente documento para hacer evidentes las similitudes entre el esquema de la figura 3(E) y el esquema de la figura 3(C). En particular, los esquemas son casi idénticos, excepto por la sustitución del resto cromóforo del conjugado de señalización 12 por el hapteno del conjugado de amplificación 42. La figura 3(F) muestra que el conjugado de amplificación unido a la muestra (hapteno 45 unido covalentemente como se ve en la figura 3(E)) se puede marcar con un conjugado de marcaje secundario 41. Aunque no se muestra, el esquema mostrado en la figura 3(C) se puede usar entonces para formar un cromóforo unido covalentemente. La deposición del conjugado de amplificación 42 sobre la muestra proporciona un mayor número de moléculas de enzima (es decir, las enzimas del conjugado de marcaje 40 y el conjugado de marcaje secundario 41 se muestran proximalmente a la diana en la figura 3(F)).

En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización se detecta usando procedimientos de detección de campo claro. Una visión general de este proceso se ilustra en las figuras 4(A-B). La figura 4(A) es un esquema de una vista en sección transversal de la muestra 16 que incluye una superficie superior 48 y una superficie inferior 49 en la que una pluralidad de los conjugados de señalización 12 están situados proximalmente a una diana (T); la muestra se muestra con una primera flecha 46 que representa la radiación incidente dirigida hacia la superficie superior 48 y una segunda flecha 47 que representa la radiación transmitida que emana de la superficie inferior 49. La figura 4(B) es un gráfico que representa la relación entre la potencia de la radiación incidente (P_0) a través de la muestra 16 mostrada en la figura 4(A) y la potencia de la radiación transmitida (P) a través de la muestra, en el que el eje y es la potencia de radiación y el eje x es la distancia lineal a través de la muestra. Las figuras 4(A-B) representan cómo se podría visualizar una diana usando el conjugado de señalización 12. La ecuación 1 proporciona la relación matemática entre la potencia de la radiación incidente y transmitida.

Las etapas del procedimiento divulgado se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, y no están limitadas a las descritas en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el procedimiento puede comprender etapas en las que los conjugados de marcaje se añaden a la muestra biológica, seguido del conjugado de señalización. Los conjugados divulgados en el presente documento se pueden añadir simultáneamente o secuencialmente. Los conjugados se pueden añadir en soluciones separadas o como composiciones que comprenden dos o más conjugados. Además, cada clase de conjugados usados en el procedimiento divulgado puede comprender los mismos o diferentes componentes conjugados. Por ejemplo, cuando se añaden múltiples

conjugados de señalización a la muestra, los conjugados pueden comprender los mismos o diferentes restos cromógenos y/o restos reactivos latentes. Únicamente a modo de ejemplo, un conjugado de señalización puede comprender un cromóforo de cumarina acoplado a un resto de tiramina y otro conjugado de señalización puede comprender un cromóforo de rodamina acoplado a un resto de derivado de tiramina. El número de conjugados de señalización adecuado para su uso en el ensayo de multiplexación divulgado puede variar de uno a al menos seis o más típicamente de dos a cinco. En modos de realización divulgados particulares, el procedimiento se usa para detectar de tres a cinco dianas diferentes usando de tres a cinco conjugados de señalización diferentes. Se pueden detectar dianas múltiples en un único ensayo usando el procedimiento divulgado en el presente documento. En otro modo de realización, una o más de las etapas divulgadas en el presente documento para el procedimiento se realizan mediante un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos.

Cromogénesis frente a fluorescencia

Históricamente, el análisis de separación se ha realizado utilizando FISH; sin embargo, la presente divulgación proporciona un ensayo de separación de tres colores usando ISH cromogénica. Las diferencias entre detección cromogénica y detección de fluorescencia se ilustran gráficamente en las figuras 5(A) y 5(B). La figura 5(A) muestra un ejemplo de cromógeno rojo 51, un ejemplo de cromógeno azul 53 y un ejemplo de cromógeno multiplexado rojo y azul 52. Cuando los cromógenos se exponen a la luz (es decir, se exponen a luz que tiene una potencia incidente de P_0) que es típicamente luz blanca, los cromógenos absorben varias longitudes de onda. La luz transmitida tendrá una potencia particular (P_1 , P_2 y P_3 en la figura 5(A)) dependiendo de la absorbancia del cromógeno y de la cantidad de cromógeno presente. El mejor evento de detección da como resultado que se deposite más cromógeno, que absorbe más luz y hace que la señal observada sea más pequeña. Incluso para los cromógenos coloreados, una reducción de la luz transmitida eventualmente hará que el cromógeno aparezca negro, ya que no se transmite luz. La multiplexación agrava este efecto, como se muestra en el ejemplo de cromógeno multiplexado rojo y azul 52. Cuando un cromógeno rojo tradicional y un cromógeno azul se superponen en el espacio, la absorbancia es amplia y el evento de detección aparece negruzco y oscuro, como se ilustra con la señal P_3 , que es menor que P_1 y P_2 . Esencialmente, la detección cromogénica con señales superpuestas dará como resultado un efecto sustractivo. Esto está en contraste con la fluorescencia que se muestra en la figura 5(B). Con referencia a la figura 5(B), se muestra un ejemplo de flúor púrpura 61, un ejemplo de flúor verde 63, y un ejemplo de flúor multiplexado púrpura y verde 62. La luz de excitación (que se muestra como λ_{ex} en la figura) puede ser la misma en los tres ejemplos y 61 muestra λ_{f1} (fluorescencia púrpura), 63 muestra λ_{f2} (fluorescencia verde) y 62 muestra λ_{f1} (fluorescencia púrpura) y λ_{f2} (fluorescencia verde). Cuanto más flúor se deposita sobre la muestra, más fuerte es la señal de fluorescencia que se genera. De manera similar, en un escenario multiplexado, hay un efecto aditivo para los fluoróforos, mientras que se produce un efecto sustractivo con los cromóforos. Esta característica sustractiva frente a aditiva aumenta significativamente la dificultad de la multiplexación cuando se usan cromógenos. Por ello, la multiplexación con cromógenos tradicionales no se ha aceptado ampliamente. La presente divulgación proporciona conjugados de señalización con bandas de absorbancia de longitud de onda estrecha que permiten combinaciones de colores que hasta ahora no eran posibles. Como resultado, la presente divulgación proporciona una multiplexación cromogénica sin precedentes a pesar de las desventajas inherentes que tiene la multiplexación cromogénica en comparación con la multiplexación fluorescente.

Detección e iluminación

El conjugado de señalización se configura para proporcionar una variedad de características que facilitan la provisión de una señal detectable. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización comprende un resto cromóforo apropiado para proporcionar una señal de campo claro. Por ejemplo, el cromóforo divulgado en el presente documento se puede seleccionar para producir una señal óptica adecuada para detectar la diana divulgada en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el cromóforo tiene propiedades ópticas, tales como las analizadas a continuación, que permiten que el conjugado de señalización se configure para proporcionar la señal deseada.

Cuando la luz (es decir, la radiación electromagnética visible) atraviesa o es reflejada por una sustancia coloreada, se absorbe una parte característica de la distribución de la longitud de onda espectral. La absorción de esta parte característica imparte al objeto un color complementario correspondiente a la luz restante. Las figuras 6(A) y 6(B) muestran una rueda de colores (figura 6(A)) que ilustra la relación entre un color observado y la radiación absorbida. La rueda de colores incluye varias piezas de pastel que representan los colores rojo (R), naranja (O), amarillo (Y), verde (G), azul (B), añil (I) y violeta (V). Cada color se muestra como una pieza de pastel separada del siguiente color por una serie de líneas que terminan en números fuera de la rueda. Estos números designan la longitud de onda de la luz en nanómetros (nm) de aquellas longitudes de onda tradicionalmente consideradas los puntos de transición entre los colores. La figura 6(B) muestra la misma distribución de colores en un gráfico lineal que tiene la longitud de onda de la luz en el eje x. Es decir, la región de 620 a 800 nm se muestra de color rojo, ya que esas longitudes de onda son longitudes de onda de luz "roja". Típicamente, los colores se perciben preferentemente y algunos colores se perciben solo para un intervalo muy estrecho de longitudes de onda. Por ejemplo, un láser que tiene una emisión entre 490 nm y 560 nm se percibiría como verde (un intervalo de 70 nm). Para percibirse naranja, el láser debería emitir luz en el intervalo de 580 nm y 620 nm (40 nm). El gráfico se proporciona solo como representación, y un experto en la técnica aprecia que el espectro electromagnético es de naturaleza continua y no

discreto como se muestra. Sin embargo, las clasificaciones de colores delineadas en el presente documento facilitan la comprensión de la tecnología como se reivindica en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, cuando una sustancia absorbe a una longitud de onda particular, la sustancia parece ser del color complementario, correspondiendo ese color a la luz restante. La rueda de colores de la figura 6(A) muestra colores complementarios diametralmente opuestos entre sí. De acuerdo con la rueda de colores, la absorción de luz a 420-430 nm imparte un color amarillo a la sustancia (425 nm es opuesto a la parte de la rueda que es amarilla). De manera similar, la absorción de luz en el intervalo de 500-520 nm imparte un color rojo a la sustancia, ya que el área del pastel roja es opuesta al intervalo numérico de 500-520 nm. El verde es único en que la absorción cerca de 400 nm y la absorción cerca de 800 nm pueden impartir un color verde a la sustancia.

El concepto de que la absorción de luz a longitudes de onda entre 420-430 nm da como resultado que la sustancia parezca amarilla es una simplificación excesiva de muchos de los fenómenos de absorción descritos en el presente documento. En particular, el perfil espectral de absorción tiene una gran influencia sobre el color observado. Por ejemplo, una sustancia que es negra se absorbe fuertemente en todo el intervalo de 420-430 nm, pero la sustancia negra no aparece amarilla. En este caso, el absorbente negro absorberá luz en todo el espectro visible, incluidos 420-430 nm. Por lo tanto, aunque la absorción de la luz a una longitud de onda particular es importante, las características de absorción en todo el espectro visible (es decir, la absorción espectral) también son importantes.

La absorción espectral se puede caracterizar de acuerdo con varios parámetros medibles. La longitud de onda a la cual la fracción máxima de luz es absorbida por una sustancia se conoce como $\lambda_{\text{máx}}$. Debido a que esta longitud de onda es la que se absorbe en mayor medida, se denomina típicamente longitud de onda de absorbancia. La figura 7(A) es un espectro de absorción de un conjugado de señalización particular, y la figura 7(B) ilustra una microfotografía de una proteína teñida usando el conjugado de señalización que produce el espectro de absorción de la figura 7(A). La figura 7(A) incluye una primera flecha (70) que ilustra la magnitud de la absorbancia máxima. Una segunda flecha (71) muestra la magnitud de la mitad del máximo. Una tercera flecha (72) muestra la anchura del pico a la mitad de la absorbancia máxima. Para este conjugado de señalización a modo de ejemplo, $\lambda_{\text{máx}}$ es 552 nm y la anchura del pico a la mitad de la absorbancia máxima (por ejemplo, AMA) es de aproximadamente 40 nm. Mientras que $\lambda_{\text{máx}}$ designa la longitud de onda de absorción máxima, la AMA designa la amplitud de la absorbancia espectral. Ambos factores son importantes para describir el color del cromóforo porque los espectros de absorción amplios no parecen tener el color que se esperaría de su $\lambda_{\text{máx}}$. Por el contrario, parecen ser de color marrón, negro o gris. Con referencia a la figura 7(B), la deposición del conjugado de señalización es claramente evidente en aquellas ubicaciones en las que cabría esperar para la tinción positiva (IHC HER2 (4B5) en xenoinjertos Calu-3). Haciendo referencia de nuevo a la rueda de colores (figura 6(A)), una $\lambda_{\text{máx}}$ de 552 nm debería corresponder a un color complementario del rojo o rojo-violeta. Esto coincide con el color observado en la muestra de tejido mostrada en la figura 7(B) (obsérvese que la muestra incluye además contratinción nuclear con hematoxilina, que es azul). Debido a que la contratinción está confinada al núcleo, no parece interferir ni afectar sustancialmente la tinción de HER2 basada en la membrana celular.

Los cromóforos preferentes tienen fuertes características de absorbancia. En algunos modos de realización, los cromóforos son no fluorescentes o débilmente fluorescentes. En virtud de sus características de absorbancia, un cromóforo es una especie capaz de absorber la luz visible. Un cromóforo preferente es capaz de absorber una cantidad suficiente de luz visible con una especificidad de longitud de onda suficiente para que el cromóforo se pueda visualizar usando iluminación de campo claro. En otro modo de realización, el cromóforo tiene una absorptividad molar promedio superior de aproximadamente $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a aproximadamente $90\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por ejemplo, la absorptividad molar promedio puede ser superior a aproximadamente $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $10\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $20\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $40\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o superior a aproximadamente $80\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Son preferentes las características de absorbancia fuerte para aumentar la señal o el color proporcionado por el cromóforo.

La deposición de conjugados de señalización en las proximidades de la diana crea absorción de la luz incidente. Debido a que la absorción ocurre de manera no uniforme a través de la muestra, se puede identificar la ubicación de la diana dentro de la muestra.

Ciertos, o todos los, aspectos de los modos de realización divulgados se pueden automatizar y facilitar mediante un análisis informático y/o un sistema de análisis de imágenes. En algunas aplicaciones, se miden relaciones de color precisas. En algunos modos de realización, la microscopía óptica se utiliza para el análisis de imágenes. Ciertos modos de realización divulgados implican la adquisición de imágenes digitales. Esto se puede hacer acoplando una cámara digital a un microscopio. Las imágenes digitales obtenidas de muestras teñidas se analizan utilizando un software de análisis de imágenes. El color se puede medir de diferentes maneras. Por ejemplo, el color se puede medir como valores de rojo, azul y verde; valores de matiz, saturación e intensidad; y/o midiendo una longitud de onda específica o un intervalo de longitudes de onda usando una cámara de imagen espectral.

Los modos de realización ilustrativos implican usar imágenes de campo claro con los conjugados de señalización. La luz blanca en el espectro visible se transmite a través del resto cromóforo. El cromóforo absorbe la luz de ciertas longitudes de onda y transmite otras longitudes de onda. Esto cambia la luz del blanco al color dependiendo de las

longitudes de onda específicas de la luz transmitida.

Las absorbancias espectrales estrechas permiten la multiplexación cromogénica a un nivel que va más allá de la capacidad de los cromógenos tradicionales. Por ejemplo, los cromógenos tradicionales son en cierto modo aplicaciones dúplex de forma rutinaria (por ejemplo, Fast Red y Fast Blue, Fast Red y Black (plateado), Fast Red y DAB). Sin embargo, las aplicaciones tríplex o tricolor son atípicas. En modos de realización ilustrativos, el procedimiento incluye detectar de dos a aproximadamente seis dianas diferentes, tales como de tres a seis, o de tres a cinco, usando diferentes conjugados de señalización o combinaciones de los mismos. En un modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz comprende iluminar la muestra biológica con una fuente de luz espectralmente estrecha, teniendo la fuente de luz espectralmente estrecha una emisión espectral con una segunda anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm. En otro modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una fuente de luz LED. En otro modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una fuente de luz filtrada.

Las muestras también se pueden evaluar cualitativa y semicuantitativamente. La evaluación cualitativa incluye la evaluación de la intensidad de la tinción, la identificación de las células con tinción positiva y los compartimentos intracelulares implicados en la tinción, y la evaluación de la calidad global de la muestra o portaobjetos. Se realizan evaluaciones separadas de las muestras de prueba y este análisis puede incluir una comparación con valores promedio conocidos para determinar si las muestras representan un estado anormal.

En un modo de realización, el conjugado de señalización se deposita covalentemente de forma proximal a la diana a una concentración adecuada para producir una señal detectable, tal como a una concentración superior a aproximadamente 1×10^{11} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ hasta aproximadamente 1×10^{16} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ de la muestra biológica. Un experto en la técnica podría calcular el número de moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ de la muestra biológica usando la ecuación 1 y las mediciones de absorbancia en la muestra, teniendo cuidado de sustraer la absorbancia correspondiente a la muestra. En un modo de realización del procedimiento divulgado, tal como un procedimiento de multiplexación, detectar una señal incluye detectar una absorbancia de un 5 % o más de luz incidente en comparación con un fondo, y detectar una señal separada diferente incluye detectar una absorbancia de un 5 % o más de luz incidente en comparación con el fondo. En otro modo de realización, detectar una señal incluye detectar una absorbancia de un 20 % o más de luz incidente en comparación con un fondo, y detectar una señal separada diferente incluye detectar una absorbancia de un 20 % o más de luz incidente en comparación con el fondo.

En un modo de realización, la primera diana y la segunda diana son ácidos nucleicos genéticos. La detección de la primera diana a través de la absorbancia de la luz por el primer conjugado de señalización incluye la detección de una primera señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta. La primera señal coloreada se asocia con la absorbancia espectral asociada con el primer resto cromógeno del primer conjugado de señalización. La detección de la segunda diana a través de la absorbancia de la luz por el segundo conjugado de señalización incluye la detección de una segunda señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta. La segunda señal coloreada se asocia con la absorbancia espectral asociada con el segundo resto cromógeno del segundo conjugado de señalización. Una superposición en proximidad a través de la absorbancia de la luz por el primer conjugado de señalización que se superpone en proximidad con el segundo conjugado de señalización, de modo que se puede detectar una tercera señal coloreada que está asociada con la absorción espectral superpuesta de la primera absorbancia espectral y la segunda absorbancia espectral. De acuerdo con un ejemplo, este tercer color indica una disposición genética normal y el primer y el segundo color indican una reordenación o translocación genética.

50 *Sonda de separación de tres colores por ISH*

Aunque proporcionar una gama de nuevos colores para el reconocimiento de dianas en muestras biológicas es útil por sí solo, los conjugados de señalización divulgados en el presente documento son particularmente útiles en ensayos multiplexados, así como en ensayos que usan sondas de translocación. La figura 8(A) es una microfotografía de una tinción doble de dos sondas génicas en una sección de tejido pulmonar que analiza los reordenamientos de ALK asociados con cáncer de pulmón no microcítico y la figura 8(B) es un espectro de UV-Vis de Fast Red y Fast Blue en soluciones de acetato de etilo. La sonda 3' se detectó usando Fast Red y la sonda 5' se detectó usando Fast Blue. Las figuras 9(A) y 9(B) ilustran las trazas de la figura 8(B) por separado. La figura 8(B) muestra que el Fast Red y el Fast Blue tienen características de absorción espectral amplias y bien definidas. El Fast Red muestra una fuerte absorción entre aproximadamente 475 nm y aproximadamente 560 nm. Comparando este intervalo con la rueda de colores, el color esperado correspondiente a la característica de absorción espectral sería rojo o naranja. El intervalo de absorción es tan grande que cubre esencialmente todas las longitudes de onda que se esperaría obtener en un color rojo o naranja. El Fast Blue muestra una fuerte absorción entre aproximadamente 525 nm y aproximadamente 625 nm, un intervalo incluso más amplio que el Fast Red. Nuevamente, haciendo referencia a la rueda de colores de la figura 6(A), la absorción de 525-625 nm cubre casi la mitad de la rueda de colores, siendo el azul, añil y violeta complementarios.

Con referencia ahora a la figura 8(A), un punto de Fast Red se resalta con el círculo (R), un punto de Fast Blue se resalta con el círculo (B), un conjunto de puntos formado por un punto de Fast Red y un punto de Fast Blue se etiquetan como adyacentes con el círculo (A), y un punto de Fast Red y un punto de Fast Blue superpuestos entre sí se etiquetan con el círculo (O). Como se preveía, el punto de Fast Red (A) es rojo y el punto de Fast Blue (B) aparece de un color azulado oscuro que cabría esperar del punto de azul, añil y violeta. Los puntos adyacentes dentro del círculo (A) se pueden distinguir claramente entre sí como un punto rojo y un punto azul separados. Sin embargo, el punto que incluye una superposición de un punto rojo y un punto azul da como resultado un color ambiguo. Parece algo azulado y tiene una franja roja en un lado. El color del punto es difícil de distinguir y difícil de caracterizar. Para un punto de superposición, la absorción del Fast Red y el Fast Blue sería aditiva y el perfil de absorción espectral se extendería desde aproximadamente 475 nm hasta aproximadamente 625 nm y tendría una $\lambda_{\text{máx.}}$ de alrededor de 550 nm. Con referencia nuevamente a la rueda de colores (figura 6(A)), este intervalo de longitudes de onda cubre casi toda la rueda. La absorción de base amplia que cubre todo el espectro da típicamente un aspecto negro o marrón con un tinte de los colores menos absorbidos, en este caso añil y violeta. Un anatomopatólogo que evalúe la microfotografía de la figura 8(A) puede tener dificultad para distinguir entre un punto de azul a añil (B) y el punto de superposición (O).

Por consiguiente, ciertos modos de realización divulgados proporcionan la capacidad de elegir diferentes conjugados de señalización para resolver este problema. Por ejemplo, se pueden seleccionar deliberadamente diferentes conjugados de señalización y hacer que comprendan restos cromógenos que producen luz en los extremos opuestos del espectro UV-vis. Las figuras 10(A) y 10(B) ilustran cómo los conjugados de señalización y el procedimiento divulgados se pueden usar para resolver el problema asociado con las sondas que comprenden dos restos cromógenos diferentes. Con referencia a la figura 10(A), un resto cromógeno capaz de producir un color negro ("B") se usa en combinación con un resto cromógeno que produce un color rojo ("R"). Cuando los dos conjugados de señalización se superponen, no queda claro si el color negro observado ("B") es producido por el resto cromógeno negro o si se produce por la superposición entre los restos cromógenos rojo y negro. Sin embargo, con referencia a la figura 10(B), este problema se puede resolver usando dos restos cromógenos que, cuando se combinan, producen un tercer color único. Por ejemplo, se puede usar un resto cromógeno púrpura ("P") en combinación con un resto cromógeno amarillo ("Y"). La superposición entre los dos se observa fácilmente, ya que se produce una señal naranja ("O"). Las figuras 11(A-B) muestran además cómo se pueden depositar dos colores proximalmente para crear un tercer color visualmente distinto. En particular, la figura 11(A) muestra una señal amarilla, que se muestra con una letra "y", combinada con la señal magenta, que se muestra con una letra "m", para crear un color rojo cereza vibrante, que se muestra con una letra "r". La figura 11(B) muestra una señal magenta, indicada por la letra "m", y una señal turquesa, indicada por la letra "t", que se combinan para crear una señal azul oscuro, que se muestra con una letra "b".

Iluminación

En modos de realización divulgados particulares, se puede usar un sistema tradicional de fuente de luz blanca y filtro, tal como los usados típicamente por los expertos en la técnica. En otros modos de realización divulgados se puede usar una fuente de luz LED en la etapa de detección para generar una luz de iluminación más estrecha. Dichas fuentes de luz se pueden usar en modos de realización en los que se usan uno o más conjugados de señalización diferentes, particularmente cuando se usan tres o más conjugados diferentes.

El procedimiento divulgado en el presente documento proporciona una detección mejorada en términos de la señal producida, así como de los medios por los cuales se detecta la señal. Las técnicas de detección tradicionales típicamente comprenden el uso de colorantes absorbentes estrechos con filtrado espectral en los que el colorante absorbe solo a un estrecho intervalo de luz que tiene una cierta longitud de onda, y el filtro solo deja pasar un pequeño intervalo de longitudes de onda. Por consiguiente, combinar el filtro con dicha absorbancia produce un punto negro en un campo por lo demás claro, u otros cromógenos pueden tener absorbancias que están dentro de los intervalos de absorción espectral del filtro y, por lo tanto, ni siquiera son apreciables mediante detección de campo claro. Este tipo de técnica de detección típicamente se deconvulva en imágenes separadas o puede usar además una imagen superpuesta que tiene una coloración falsa. Usando modos de realización del procedimiento divulgado en el presente documento, la detección de campo claro se puede usar en el análisis de señales cromogénicas sin los problemas típicamente asociados con esta técnica particular. La variedad de conjugados de señalización contemplados por la presente divulgación proporciona la capacidad de analizar la muestra biológica en el campo claro y de detectar visualmente la(s) señal(es) de color emitida(s) sin manipulación adicional. Además, la capacidad de usar fuentes de luz LED con el procedimiento divulgado proporciona flexibilidad en el intervalo de longitudes de onda que puede ser absorbido por el conjugado de señalización divulgado. En modos de realización divulgados particulares, los conjugados de señalización se pueden visualizar independientemente iluminando la muestra con luz de una longitud de onda a la que el cromógeno absorbe, haciendo de este modo que el cromógeno se vea oscuro contra un fondo claro (la luz es absorbida por el cromógeno, reduciendo la intensidad de la luz en ese punto). En modos de realización divulgados particulares, iluminar la muestra con luz que no es absorbida por el cromógeno causa que el cromógeno "desaparezca" debido a que la intensidad de la luz no se altera (absorbe) cuando pasa a través del punto cromógeno. Únicamente a modo de ejemplo, al iluminar un portaobjetos con una muestra biológica con luz verde, los cromógenos de rodamina aparecen oscuros, mientras que el cromógeno Cy5

desaparece. Por el contrario, al iluminar el portaobjetos con luz roja, el cromógeno Cy5 aparece oscuro y los cromógenos de rodamina desaparecen.

Los portaobjetos teñidos usando ciertos conjugados de señalización divulgados se iluminaron usando un iluminador de múltiples LED que se adaptó al microscopio óptico BX-51 de Olympus. Se utilizaron dos iluminadores LED: 1) un iluminador de 3 LED incorporado que incluye un motor de luz Lamina RGB (EZ-43F0-0431) con 3 reguladores de corriente BuckPlus de LEDdynamics con potenciómetros e interruptores para permitir el control de activación/desactivación y la variación de las intensidades de LED rojo, verde y azul de forma independiente; y 2) un iluminador LED controlado por ordenador RGBA de TOFRA, Inc. para microscopios verticales modificado para la conmutación manual de los LED. Para visualizar solo los cromógenos de tiramida, iluminar la muestra con luz de una longitud de onda a la que el cromógeno absorbe hace que el cromógeno se vea oscuro contra un fondo claro (la luz es absorbida por el cromógeno, reduciendo la intensidad de la luz en ese punto). Iluminar la muestra con luz que no es absorbida por el cromógeno causa que el cromógeno “desaparezca” debido a que la intensidad de la luz no se altera (absorbe) cuando pasa a través del punto cromógeno.

Las figuras 12(A-B) son microfotografías de una muestra que ha sido teñida doblemente con un conjugado de señalización turquesa y magenta bajo (A) iluminación con luz blanca, (B) iluminación con luz verde y (C) iluminación con luz roja. Al iluminar el portaobjetos con luz verde, los conjugados de señalización turquesa aparecen oscuros, mientras que el conjugado de señalización magenta desaparece. Por el contrario, al iluminar el portaobjetos con luz roja, el conjugado de señalización magenta aparece oscuro y el conjugado de señalización turquesa desaparece. La superposición entre los conjugados de señalización magenta y turquesa es oscura bajo iluminación con luz blanca, iluminación con luz verde e iluminación con luz roja. Uno de los beneficios percibidos de la microscopía de fluorescencia es la capacidad de utilizar filtros para alternar entre las señales individuales de la sonda. Usando los conjugados de señalización descritos en el presente documento, es posible habilitar la conmutación usando compuestos cromógenos. Al hacer coincidir la longitud de onda de emisión del LED con la longitud de onda de absorbancia del colorante de tiramida, la señal del cromógeno coincidente “desaparece”. Las fuentes de alimentación LED se pueden añadir fácilmente a un microscopio óptico reemplazando el condensador. El usuario puede cambiar la longitud de onda de emisión del LED con solo presionar un botón.

30 *Potenciación de tirosina*

La amplificación de la señal de la tiramida y los conjugados de señalización descritos en el presente documento reaccionan con residuos de tirosina disponibles en la muestra y/o las moléculas/conjugados usados para detectar y marcar las dianas. La cantidad de proteína que rodea al biomarcador que se va a detectar es variable en función de la variación natural entre las muestras de tejido. Cuando se detectan biomarcadores presentes en niveles altos, o cuando se detecta la colocalización de múltiples biomarcadores, la cantidad de proteína a la que las moléculas de tiramida se pueden unir puede ser un reactivo limitante en el proceso de deposición. Una cantidad insuficiente de proteína en el tejido puede dar como resultado la detección basada en la difusión de tiramida, la posibilidad de infravalorar el nivel de expresión de los biomarcadores y la imposibilidad de detectar biomarcadores colocalizados. Una solución a estos problemas es proporcionar más sitios de unión a proteínas (es decir, tirosina) recubriendo el tejido con una solución proteínica y reticulando permanentemente la proteína al tejido usando formol u otros fijadores.

La mayoría del trabajo con TSA se ha realizado en el contexto de la detección fluorescente. La detección fluorescente de TSA se logra mediante una única deposición de tiramida de un fluoróforo, y los tiempos de deposición son en general bastante cortos porque la sensibilidad de la detección fluorescente es alta, mientras que el fondo asociado con la TSA tradicional se vuelve problemático con tiempos de deposición más largos. Por el contrario, la detección cromogénica de TSA puede incluir deposiciones múltiples de conjugados de tiramida con tiempos de deposición prolongados. Como resultado, la técnica de TSA fluorescente no sugiere soluciones a problemas de TSA cromogénica porque la naturaleza del problema es muy diferente. En particular, se cree que la saturación de los sitios de unión de tirosina de una muestra por especies reactivas a la tiramida es un problema único particular de las químicas de detección descritas en el presente documento. Las potenciaciones en TSA que se originan a partir de la investigación de fluorescencia de TSA típicamente abordaron la difusión de los restos de tiramida reactivos y la ausencia de señal de TSA. Las soluciones a estos problemas se han descrito en la técnica. Por ejemplo, se describió un aumento de la viscosidad de la solución de reacción mediante la adición de polímeros solubles para disminuir la difusión y se potenció la actividad de HRP mediante la adición de vainillina y/o yodofenol. Estas soluciones no fueron suficientes para resolver algunos de los problemas observados para las químicas de detección descritas en el presente documento.

A través de varios estudios, se descubrió que la gravedad del problema identificado varía según la muestra utilizada. Por ejemplo, se descubrió que los tejidos de cáncer de mama y los tejidos de cáncer de próstata incluían diferentes niveles de sitios de unión a tiramida disponibles. También se sabe que existen diferencias en el contenido de proteínas en los compartimentos celulares (núcleo, membrana celular, citoplasma, etc.) que son la diana de varias pruebas de IHC y/o ISH. Por lo tanto, además de ser necesaria para la colocalización de TSA, la invención propuesta normalizará el contenido de proteína (por ejemplo, sitios de unión a tiramida) y reducirá la variación entre muestras y a través de ellas. En modos de realización ilustrativos, la adición de un agente potenciador de la tirosina

puede aumentar la reproducibilidad inter e intramuestra de los ensayos descritos en el presente documento.

5 Cuando se usan conjugados de amplificación, como se describe en el presente documento, especialmente en combinación con los conjugados de señalización descritos en el presente documento, la cantidad de proteína que rodea la diana o las dianas puede ser insuficiente. Cuando se detectan biomarcadores presentes a altos niveles, o cuando se detecta la colocalización de múltiples biomarcadores, la cantidad de proteína en la muestra a la que se pueden acoplar los reactivos de detección basados en tiramina puede ser el reactivo limitante. Una insuficiencia en los sitios de unión a tiramina puede provocar una velocidad de reacción reducida, permitir que las moléculas reactivas de tiramina se difundan fuera de la diana y, en general, da como resultado una respuesta más débil debido a cantidades más bajas de los conjugados de señalización que reaccionan en las proximidades de la diana. Se descubrió que proporcionar más sitios de unión a la muestra potenciaba la detección como se describe en el presente documento. Un enfoque para potenciar los sitios de unión disponibles fue introducir una solución de proteína en la muestra. Para que la proteína permanezca tras varios lavados y para que la proteína no se difunda durante o después de las etapas de detección posteriores, la proteína se reticuló a la muestra usando un fijador (por ejemplo, formol).

20 En modos de realización ilustrativos, una cantidad adicional de un reactivo que contiene tirosina, tal como una proteína, se puede incubar y fijar a la muestra biológica para proporcionar sitios de unión adicionales para múltiples conjugados de señalización o amplificación, tales como en multiplexación o amplificación. Por ejemplo, cuando se usa una sonda de translocación, se puede obtener una tinción de tres colores más clara al añadir una cantidad adicional de proteína a la muestra biológica. Además, la unión a sonda no específica se puede disminuir usando esta etapa adicional. Los modos de realización a modo de ejemplo se refieren a la adición de BSA a la muestra biológica, seguida de la fijación de la proteína usando un agente de reticulación, tal como un fijador (por ejemplo, FTN al 10 %).

25 Para demostrar la eficacia de la solución, primero se estableció que las proteínas exógenas se pueden fijar a una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido incluida en parafina y preparada histológicamente). Para demostrar que la proteína adicional se puede unir covalentemente a secciones de tejido incluidas en parafina, se funcionalizó la albúmina de suero bovino (BSA) con un hapteno (2,1,3-benzoxadiaol-carbamida, "BF"). La BSA-BF se añadió al tejido después de una etapa de hibridación en la que no se añadió ninguna sonda, y todos los experimentos se completaron en un dispositivo de tinción automatizada de portaobjetos Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Se añadieron 10 µg del conjugado BSA-BF al portaobjetos y se incubaron durante 16 minutos. La proteína BSA marcada con BF se fijó covalentemente al tejido mediante la adición de 100 µl de paraformaldehído al 4 %, y se incubó durante 16 minutos. La presencia de BSA-BF unido covalentemente se detectó mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-BF que se funcionalizó con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Las figuras 13(A-B) muestran una microfotografía (figura 13(A)) de un portaobjetos de control al que no se añadió BSA-BF, y la figura 13(B) es una microfotografía del portaobjetos en el que se había usado BSA-BF. La enzima HRP catalizó la deposición de tiramida-TAMRA que tiñe el portaobjetos con un cromógeno rosa donde el BSA-BF estaba unido al tejido. Sin la presencia del BSA-BF, en las mismas condiciones experimentales, el cromógeno rosa no se deposita (figura 13(A)), lo que sugiere que la proteína BSA añadida exógenamente se puede fijar permanentemente en secciones de tejido incluidas en parafina.

45 Se descubrió que la aplicación de un conjugado de señalización, como se describe en el presente documento, para ciertos modos de realización es más eficaz usando un agente potenciador de tirosina después de ciclos de deposición de tiramida que no tiñen. Para confirmar esta hipótesis, las muestras de tejido se sometieron a múltiples pases de TSA con un conjugado tiramida-hapteno. Las figuras 14(A-B) son microfotografías de una primera muestra (figura 14(A)) en la que se depositó un conjugado de señalización, como se describe en el presente documento, y la figura 14(B) es una segunda muestra en la que se usó una solución de potenciación de tirosina antes de la detección con el conjugado de señalización. La diferencia entre la figura 14(A) y la figura 14(B) apoya la hipótesis de que la disponibilidad de proteína en la muestra se ve disminuida por las deposiciones de TSA y que la adición de potenciadores que contienen tirosina puede proporcionar una tinción más fuerte. En ausencia de fijación de proteína (figura 14(A)), la posterior deposición del conjugado de señalización produjo un bajo nivel de señal cromogénica. Cuando la proteína exógena se fijó a la sección de tejido usando paraformaldehído (figura 14(B)), el conjugado de señalización produjo señales significativamente más intensas y numerosas. Los datos sugieren que la fijación de la proteína exógena a las secciones de tejido potencia la amplificación de la señal de tiramida al proporcionar sitios de unión a proteínas adicionales para que los reactivos de tiramida se unan covalentemente.

60 Un modo de realización divulgado de un procedimiento para detectar una diana en una muestra comprende: poner en contacto la muestra con una sonda de detección específica para la diana; poner en contacto la muestra con un potenciador de tirosina; poner en contacto la muestra con un agente de reticulación; poner en contacto la muestra con un reactivo de detección basado en tiramina; y detectar la diana en la muestra; en el que el reactivo de reticulación une covalentemente el potenciador de tirosina a la muestra. En un modo de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con un conjugado de marcaje. En otro modo de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con un conjugado de amplificación. En un modo de realización, el procedimiento comprende además detectar una segunda diana, en el que la puesta en contacto de la muestra con el potenciador de tirosina se produce después de poner en contacto la muestra con los reactivos de

detección basados en tiramida para la primera diana y antes de poner en contacto la muestra con reactivos de detección basados en tiramida para la segunda diana. En un modo de realización, el potenciador de tirosina incluye una proteína. En otro modo de realización, el potenciador de tirosina es un polímero que contiene residuos de tirosina. En un modo de realización, el agente de reticulación es formol o formaldehído. En otro modo de realización, el agente de reticulación es formol tamponado neutro (FTN). En otro modo de realización, el agente de reticulación es un imidoéster, un suberimidato de dimetilo o un éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS). En otro modo de realización, el agente de reticulación es radiación de luz. En un modo de realización, el agente de reticulación es luz UV o radiación de rayos X. En un modo de realización, la detección de la diana en la muestra incluye la obtención de imágenes de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la obtención de imágenes fluorescentes de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la obtención de imágenes de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida, en la que los reactivos de detección basados en tiramida producen una señal cromogénica detectable usando microscopía de luz de campo claro. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la obtención de imágenes de un conjugado de señalización. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la obtención de imágenes de un cromógeno que se depositó en las proximidades de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida.

Contratinción

La contratinción es un procedimiento de tratamiento posterior de las muestras después de que ya se hayan teñido con agentes para detectar una o más dianas, de forma que sus estructuras se puedan visualizar más fácilmente bajo un microscopio. Por ejemplo, se usa opcionalmente un contratinte antes de colocar el cubreobjetos para que la tinción inmunohistoquímica sea más clara. Los contratintes difieren en el color de un tinte primario. Numerosos contratintes son bien conocidos, tales como hematoxilina, eosina, verde de metilo, azul de metileno, Giemsa, azul de Alcian y Fast Red nuclear. En algunos ejemplos, se puede mezclar más de un tinte para producir el contratinte. Esto proporciona flexibilidad y la capacidad de elegir tintes. Por ejemplo, se puede seleccionar un primer tinte para la mezcla que tiene un atributo particular, pero aún no tiene un atributo deseado diferente. Se puede añadir un segundo tinte a la mezcla que muestre el atributo deseado que falta. Por ejemplo, azul de toluidina, DAPI y Pontamine Sky Blue se pueden mezclar para formar un contratinte. Un aspecto de la presente divulgación es que los procedimientos de contratinción conocidos en la técnica son combinables con los procedimientos y composiciones divulgados, de modo que la muestra teñida es fácilmente interpretable por un lector.

III. Conjugados

En este documento se divulgan varios conjugados diferentes adecuados para su uso en el procedimiento divulgado. Las diversas clases de conjugados contemplados por la presente divulgación se describen a continuación.

A. Sondas de detección

La presente divulgación se refiere a sondas de detección particulares que se pueden usar para detectar una diana en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. Las sondas de detección incluyen un resto de unión específica que es capaz de unirse específicamente a la diana. Las sondas de detección incluyen una o más características que permiten la detección a través de un conjugado de marcaje. Las sondas de detección representativas incluyen sondas de ácidos nucleicos y sondas de anticuerpos primarios.

En modos de realización ilustrativos, la sonda de detección es una sonda de oligonucleótido o una sonda de anticuerpo. Como se describe en el presente documento, las sondas de detección pueden ser sondas de detección indirecta. Las sondas de detección indirecta no están configuradas para ser detectadas directamente. En particular, las sondas no están configuradas con el propósito de visualización directa. En cambio, las sondas de detección serán en general de dos tipos, aunque estos no son tipos mutuamente excluyentes. El primer tipo de sonda de detección está haptenada y el segundo tipo de sondas de detección se basa en una especie particular de anticuerpo. Se conocen otros tipos de sondas de detección en la técnica y dentro del alcance de la presente divulgación, pero estos se implementan con menos frecuencia, por ejemplo, sondas o anticuerpos marcados con aptámero, sondas o anticuerpos marcados con ácido nucleico, anticuerpos que están unidos covalentemente a otros anticuerpos a fin de proporcionar capacidades de doble unión (por ejemplo, a través de técnicas de acoplamiento o a través de proteínas de fusión). Si bien no están configuradas como tales, algunas de las sondas de detección pueden tener propiedades que permitan su detección directa. Por ejemplo, el uso de fluoróforos de hapteno está dentro del alcance de la presente divulgación. De acuerdo con un modo de realización, la sonda de detección incluye un marcador de hapteno. Los expertos en la técnica apreciarán que una sonda de detección se puede marcar con uno o más haptenos usando diversos enfoques. La sonda de detección puede incluir un hapteno seleccionado del grupo que consiste en un hapteno de oxazol, hapteno de pirazol, hapteno de tiazol, hapteno de nitroarilo, hapteno de benzofurano, hapteno de triterpeno, hapteno de urea, hapteno de tiourea, hapteno de rotenoide, hapteno de cumarina, hapteno de ciclogignano, hapteno de dinitrofenilo, hapteno de biotina, hapteno de digoxigenina, hapteno de fluoresceína y hapteno de rodamina. En otros ejemplos, la sonda de detección es un anticuerpo monoclonal derivado de una segunda especie tal como cabra, conejo, ratón o similar. Para marcar una sonda de detección marcada con hapteno, el conjugado de marcaje incluiría un anticuerpo anti-hapteno. Para

marcar una sonda de detección basada en especies, el conjugado de marcaje se puede configurar con un anticuerpo antiespecie.

En modos de realización ilustrativos, la presente divulgación describe sondas de ácido nucleico que se hibridan con una o más secuencias de ácido nucleico diana. La sonda de ácido nucleico se hibrida preferentemente con una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones adecuadas para la hibridación, tales como condiciones adecuadas para hibridación *in situ*, transferencia de Southern, o transferencia Northern. Preferentemente, la parte de sonda de detección comprende cualquier ácido nucleico adecuado, tal como ARN, ADN, LNA, PNA o combinaciones de los mismos, y puede comprender nucleótidos estándar tales como ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, así como análogos de nucleótidos. LNA y PNA son dos ejemplos de análogos de ácido nucleico que forman complejos de hibridación que son más estables (es decir, tienen una Tm aumentada) que los formados entre ADN y ADN o ADN y ARN. Los análogos LNA y PNA se pueden combinar con nucleósidos de ADN y ARN tradicionales durante la síntesis química para proporcionar moléculas de ácido nucleico híbridas que se pueden usar como sondas. El uso de los análogos LNA y PNA permite modificar parámetros de hibridación tales como la Tm del complejo de hibridación. Esto permite diseñar sondas de detección que se hibridan con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana en condiciones que son iguales o similares a las condiciones requeridas para la hibridación de la parte de sonda de la diana con la secuencia de ácido nucleico diana.

Se pueden seleccionar sondas de ácido nucleico adecuadas manualmente o con la ayuda de un algoritmo implementado por ordenador que optimiza la selección de la sonda en función de parámetros deseados, tales como temperatura, longitud, contenido de GC, etc. Están disponibles numerosos programas o algoritmos implementados por ordenador para su uso a través de Internet o en un ordenador personal. Por ejemplo, para generar múltiples regiones de unión a partir de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica), se identifican regiones de secuencia desprovistas de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras secuencias indeseables, por ejemplo, que producen fondo), por ejemplo, manualmente o usando un algoritmo informático, tal como RepeatMasker. Los procedimientos para crear sondas sin repeticiones y únicamente específicas se encuentran, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2012/0070862. Dentro de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) que abarca de varias a varios cientos de kilobases, típicamente se identifican numerosas regiones de unión que están sustancialmente o preferentemente completamente libres de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras secuencias indeseables, por ejemplo, que producen fondo).

En algunos modos de realización, se incorpora un hapteno en la sonda de ácido nucleico, por ejemplo, mediante el uso de un nucleósido haptencilado. Los procedimientos para conjugar haptenos y otros marcadores a dNTP (por ejemplo, para facilitar la incorporación en sondas marcadas) son bien conocidos en la técnica. De hecho, numerosos dNTP marcados están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Invitrogen Detection Technologies (Molecular Probes, Eugene, OR). Un marcador se puede unir directa o indirectamente a un dNTP en cualquier ubicación del dNTP, tal como un fosfato (por ejemplo, fosfato α , β o γ) o un azúcar. Las sondas se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos conocido adecuado. En algunos modos de realización, las sondas de detección se sintetizan químicamente usando nucleósidos de fosforamidita y/o análogos de nucleósidos de fosforamidita. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las sondas se sintetizan usando nucleósidos de fosforamidita de ARN o ADN estándar. En algunos modos de realización, las sondas se sintetizan utilizando fosforamiditas de FNA o fosforamiditas de PNA, solas o en combinación con nucleósidos de fosforamidita estándar. En algunos modos de realización, se introducen haptenos en fosforamiditas abásicas que contienen los restos detectables deseados. Otros procedimientos también se pueden usar para la síntesis de sondas de detección. Por ejemplo, se puede usar un cebador hecho de análogos de FNA o una combinación de análogos de FNA y nucleótidos estándar para la transcripción del resto de la sonda. Como otro ejemplo, se utiliza un cebador que comprende restos detectables para la transcripción del resto de la sonda. En otros modos de realización más, los segmentos de la sonda producidos, por ejemplo, mediante transcripción o síntesis química, se pueden unir mediante unión enzimática o química.

Se puede usar una variedad de haptenos en la parte del resto detectable de la sonda de detección. Dichos haptenos incluyen, pero no se limitan a, pirazoles, particularmente nitropirazoles; compuestos de nitrofenilo; benzofurazanos; triterpenos; ureas y tioureas, particularmente fenil ureas y, aún más particularmente, fenil tioureas; rotenona y derivados de rotenona, también denominados en el presente documento rotenoides; oxazol y tiazoles, particularmente oxazol y tiazol sulfonamidas; cumarina y derivados de cumarina; ciclolignanos, ejemplificados por podofilotoxina y derivados de podofilotoxina; y combinaciones de los mismos, derivados de fluoresceína (FITC, TAMRA, Texas Red, etc.), digoxigenina (DIG), 5-nitro-3-pirazolcarbamida (nitropirazol, NP), 4,5-dimetoxi-2-nitrocina (nitrocina, NCA), 2-(3,4-dimetoxifenil)-quinolina-4-carbamida (fenilquinolona, DPQ), 2,1,3-benzoxadiazol-5-carbamida (benzofurazano, BF), 3-hidroxi-2-quinoxalinacarbamida (hidroxiquinoxalina, HQ), 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (DABSYL), rotenona isoxazolina (Rot), (E)-2-(2-(2-oxo-2,3-dihidro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-4-il)fenozil)acetamida (benzodiazepina, BD), ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (cumarina 343, CDO), 2-acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida (tiazolsulfonamida, TS) y p-metoxifenilpirazopodofilamida (Podo). Estos haptenos y su uso en sondas se describen con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 7.695.929.

B. *Conjugados de marcaje y conjugados de marcaje secundario*

En modos de realización ilustrativos, el conjugado de marcaje se une específicamente a la sonda de detección y se configura para marcar la diana con una enzima. Como se describió anteriormente, las sondas de detección configuradas a partir de una segunda especie o para incluir un hapteno pueden ser detectadas por un anticuerpo antiespecie o un anticuerpo antihapteno. Un enfoque para configurar un conjugado de marcaje ha sido acoplar directamente una enzima al anticuerpo antiespecie o antihapteno. Los conjugados de este tipo, que pueden o no incluir diversos conectores, también se describen en la patente de EE. UU. n.º 7.695.929. El conjugado de marcaje incluye una o más enzimas. Las enzimas ilustrativas incluyen oxidorreductasas o peroxidasas. El conjugado de señalización incluye un resto reactivo latente y un resto cromógeno. La enzima cataliza la conversión del resto reactivo latente en un resto reactivo que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la diana.

El conjugado de marcaje secundario se usa en conexión con los conjugados de amplificación, como se describe en el presente documento. Los conjugados de marcaje secundario se configuran de la misma manera que los conjugados de marcaje, excepto que están configurados para marcar haptenos depositados a través de un proceso de amplificación en lugar de haptenos conjugados con conjugados de detección. En modos de realización ilustrativos, un conjugado de marcaje secundario comprende un anticuerpo antihapteno conjugado a una enzima. En un modo de realización, la enzima es una oxidorreductasa o una peroxidasa.

C. *Conjugados de señalización*

Otro tipo de conjugado divulgado en el presente documento es un conjugado de señalización. El conjugado de señalización proporciona la señal detectable que se usa para detectar la diana, de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización comprende un resto reactivo latente y un resto cromóforo.

Un aspecto de la presente divulgación es que los conjugados de señalización se pueden configurar para absorber luz de forma más selectiva que los cromógenos disponibles tradicionalmente. La detección se lleva a cabo mediante la absorbancia de la luz por el conjugado de señalización; por ejemplo, la absorbancia de al menos aproximadamente un 5 % de la luz incidente facilitaría la detección de la diana. En otras manchas más oscuras, se absorbería al menos aproximadamente un 20 % de la luz incidente. La absorbancia no uniforme de la luz dentro de los espectros visibles da como resultado que el resto cromóforo aparezca coloreado. Los conjugados de cromógeno divulgados en el presente documento pueden aparecer coloreados debido a su absorbancia; los conjugados de cromógeno pueden aparecer de color rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta dependiendo de la absorbancia espectral asociada con el resto cromóforo. De acuerdo con otro aspecto, los restos cromóforos pueden tener absorbancias espectrales más estrechas que las absorbancias de cromógenos usados tradicionalmente (por ejemplo, DAB, Fast Red, Fast Blue). En modos de realización ilustrativos, la absorbancia espectral asociada con el primer resto cromóforo del primer conjugado de señalización tiene una anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm.

Las absorbancias espectrales estrechas permiten que el resto cromóforo del conjugado de señalización se analice de forma diferente que los cromógenos tradicionales. Si bien tiene características mejoradas en comparación con los cromógenos tradicionales, la detección de los conjugados de señalización sigue siendo sencilla. En modos de realización ilustrativos, la detección comprende usar un microscopio de campo claro o un escáner digital equivalente.

Un modo de realización del conjugado de señalización divulgado se ilustra en las figuras 2(A) y 2(B). Con referencia a las figuras 2(A-B), el conjugado de señalización 12 comprende un resto reactivo latente 4 y un resto cromóforo 6; en otro modo de realización, un conjugado de señalización alternativo 14 puede incluir un conector 8 para conjugar el resto cromóforo 6 con el resto reactivo latente 4. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización tiene la siguiente fórmula 1 general:



Fórmula 1

El conjugado de señalización divulgado típicamente comprende un resto reactivo latente como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el resto reactivo latente puede ser el mismo o diferente del conjugado de amplificación divulgado; sin embargo, cada resto reactivo latente es capaz de formar una especie radical reactiva y tiene la fórmula general proporcionada en el presente documento. Como se muestra en la fórmula 1, el conjugado de señalización puede comprender un conector opcional. Si se utiliza un conector, se puede seleccionar de cualquiera de los conectores divulgados en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el

conector se selecciona para mejorar la solubilidad en una solución hidrófila del conjugado de señalización y/o para mejorar la funcionalidad del conjugado en la muestra biológica. En un modo de realización divulgado particular, el conector es un conector de óxido de alquileo, tal como un conector de polietilenglicol; sin embargo, cualquiera de los conectores divulgados en el presente documento se puede usar para el conjugado de señalización.

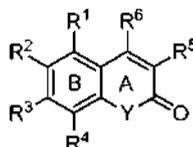
5

1. Resto cromóforo

En general, un resto cromóforo se describe como la parte de una molécula responsable de su color. Los colores surgen cuando una molécula absorbe ciertas longitudes de onda de la luz visible y transmite o refleja otras. El cromóforo es una región de la molécula en la que la diferencia de energía entre dos orbitales moleculares diferentes está dentro del intervalo del espectro visible, en el que la luz visible que interactúa con esa región puede ser absorbida. En general, la absorbancia se asocia con una transición de electrones desde su estado fundamental a un estado excitado. Las moléculas que tienen un estado fundamental para las diferencias de energía del estado excitado dentro del espectro visible a menudo son estructuras de carbono conjugadas. En estos compuestos, los electrones hacen la transición entre niveles de energía que son orbitales pi extendidos, creados por una serie de enlaces simples y dobles alternados, a menudo en sistemas aromáticos. Los ejemplos comunes incluyen varios colorantes alimentarios, tintes de tejidos (compuestos azoicos), indicadores de pH, licopeno, β -caroteno y antocianinas. La estructura de la molécula imparte la característica de los orbitales pi que dan como resultado el nivel de energía. Típicamente, alargar o extender un sistema conjugado con más enlaces insaturados (múltiples) en una molécula tenderá a desplazar la absorción a longitudes de onda mayores. Las reglas de Woodward-Fieser se pueden usar para aproximar la longitud de onda de absorción máxima en el ultravioleta visible en compuestos orgánicos con sistemas de enlaces pi conjugados.

En modos de realización ilustrativos, los complejos metálicos pueden ser cromóforos. Por ejemplo, un metal en un complejo de coordinación con ligandos a menudo absorberá la luz visible. Por ejemplo, la clorofila y la hemoglobina (el transportador de oxígeno de la sangre de los animales vertebrados) son cromóforos que incluyen complejos metálicos. En estos dos ejemplos, un metal está complejado en el centro de un anillo de porfirina: el metal es hierro en el grupo hemo de la hemoglobina, o magnesio en el caso de la clorofila. El sistema de enlace pi altamente conjugado del anillo de porfirina absorbe la luz visible. La naturaleza del metal central también puede influir en el espectro de absorción del complejo de metaloporfirina o en propiedades como la vida útil del estado excitado.

En modos de realización ilustrativos, el resto cromóforo es una cumarina o derivado de cumarina. A continuación se proporciona una fórmula general para la cumarina o los derivados de cumarina.

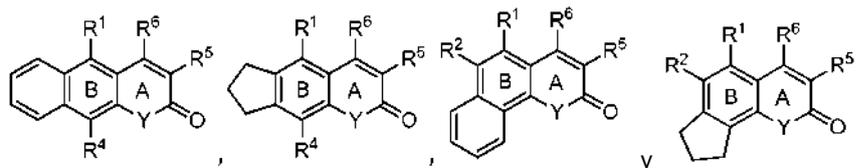


35

Fórmula 2

Con referencia a la fórmula 2, R^1 - R^6 se definen en el presente documento. Al menos uno de los sustituyentes R^1 - R^6 también se une típicamente a un conector o al resto reactivo latente (por ejemplo, una tiramida o un derivado de tiramida). Ciertos modos de realización de trabajo han utilizado la posición indicada como que tiene un sustituyente R^5 para el acoplamiento a un conector o resto reactivo latente (por ejemplo, una tiramida o un derivado de tiramida). Se cree que los sustituyentes distintos de hidrógeno en la posición 4 inactivan la fluorescencia, pero son útiles dentro del alcance de la presente divulgación. Y se selecciona entre oxígeno, nitrógeno o azufre. Dos o más de los sustituyentes R^1 - R^6 disponibles para la formación de dichos compuestos también pueden ser átomos, normalmente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Los modos de realización a modo de ejemplo de estos tipos de compuestos incluyen:

45

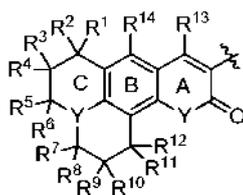


Un experto en la técnica apreciará que los anillos también podrían ser heterocíclicos y/o heteroarilos.

50

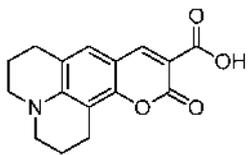
Los modos de realización de trabajo comprenden típicamente sistemas de anillo A-D fusionados que tienen al menos una posición de acoplamiento de conector, tiramida o derivado de tiramida, con una posición de acoplamiento posible que se indica a continuación:

55

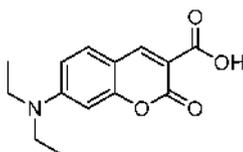


Fórmula 3

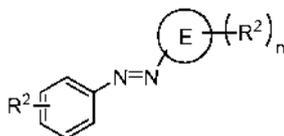
5 Con referencia a la fórmula 3, los grupos variables R e Y son como se indica en el presente documento. Más típicamente, R¹-R¹⁴ son, independientemente, hidrógeno o alquilo inferior. Los modos de realización particulares de cromóforos basados en cumarina incluyen ácido 2,3,6,7-tetrahidro-11-oxo-1H,5H,11H-[1]benzopirano[6,7,8-ij]quinolizina-10-carboxílico



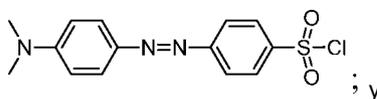
10 y ácido 7-(dietilamino)cumarin-3-carboxílico



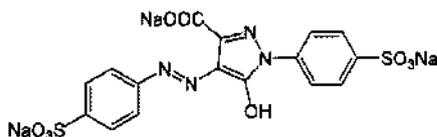
15 Otra clase de restos cromógenos adecuados para su uso en el presente documento incluye cromógenos que contienen diazo. Estos cromóforos particulares pueden tener una fórmula como se ilustra a continuación.



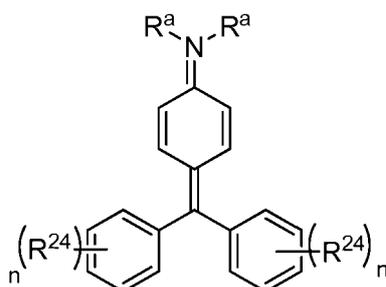
20 Con respecto a esta fórmula, el anillo E se puede seleccionar entre fenilo, imidazol, pirazol, oxazol y similares. Cada R² se puede seleccionar independientemente de los grupos enumerados en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, cada R² se selecciona independientemente entre amina, amina sustituida, fenilo, hidroxilo, cloruro de sulfonilo, sulfonato, carboxilato y combinaciones de los mismos; y n puede variar de cero a 5. Los modos de realización divulgados particulares se pueden seleccionar de los siguientes cromóforos diazoicos:
25 DABSYL, que tiene una λ_{máx.} de aproximadamente 436 nm y tiene la siguiente estructura química



30 tartrazina, que tiene una λ_{máx.} de aproximadamente 427 nm y tiene la siguiente estructura química

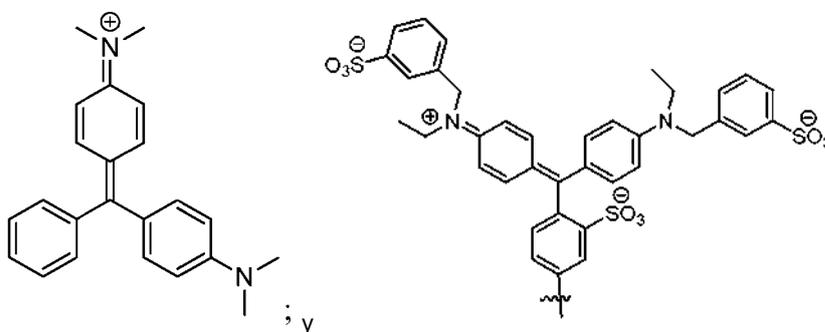


35 En otros modos de realización más, el cromóforo puede ser un compuesto de triarilmetano. Los compuestos de triarilmetano dentro del alcance de la presente divulgación pueden tener la siguiente fórmula.



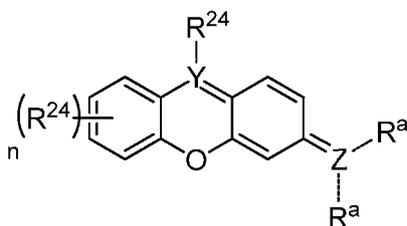
Fórmula 4

- 5 Con respecto a la fórmula 4, cada R^a se puede seleccionar independientemente entre hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo; y cada R^{24} se puede seleccionar entre amina, amina sustituida, hidroxilo, alcoxi y combinaciones de los mismos; cada n puede variar independientemente de cero a 5. Los cromóforos ejemplares se proporcionan a continuación:

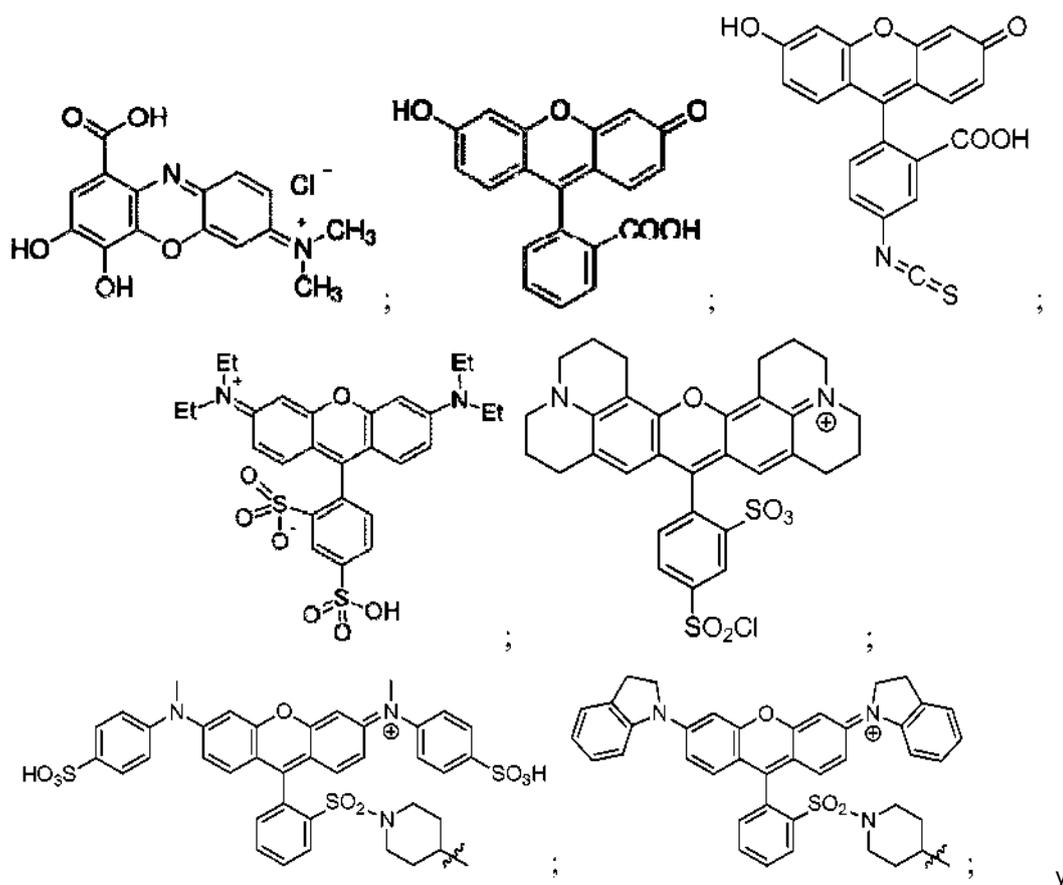


10

En otros modos de realización divulgados, el resto cromóforo puede tener la siguiente fórmula



- 15 en la que cada R^a se puede seleccionar independientemente entre hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo; cada R^{24} se puede seleccionar independientemente entre los grupos proporcionados en el presente documento, incluyendo arilo sustituido, que comprende un grupo arilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre uno cualquiera de R^1 - R^{23} , que se divulgan en el presente documento; Y puede ser nitrógeno o carbono; Z puede ser nitrógeno u oxígeno; y n puede variar de cero a 4. En modos de realización divulgados particulares, Z es nitrógeno y cada R^a puede estar fusionado a un átomo de carbono del anillo al que se une la amina que comprende R^a , o cada uno de R^a se puede unir para formar un anillo alifático o aromático de 4 o 6 miembros, que puede estar sustituido adicionalmente. A continuación se proporcionan modos de realización a modo de ejemplo:
- 20



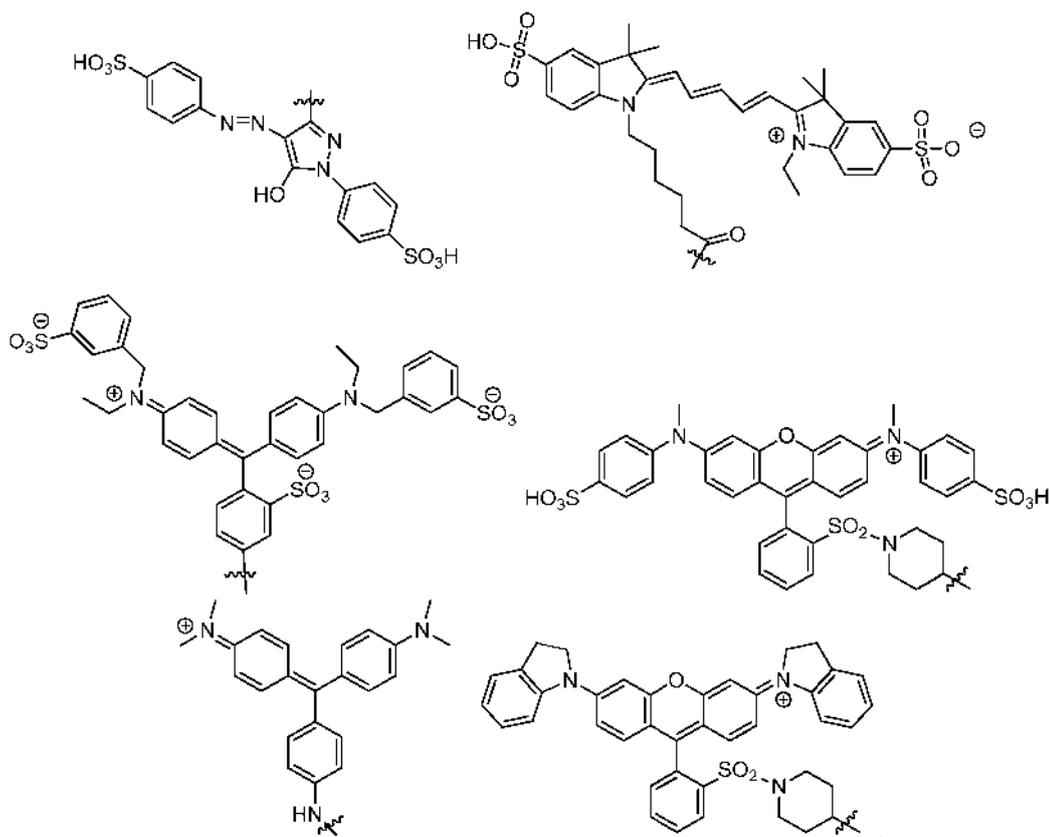
otros derivados de rodamina, tales como tetrametilrodaminas (incluyendo TMR, TAMRA y derivados de isotiocianato reactivos) y derivados de diarilrodamina, tales como los colorantes QSY 7, QSY 9 y QSY 21.

5 Los cromóforos ejemplares se seleccionan del grupo que consiste en DAB; AEC; CN; BCIP/NBT; Fast Red; Fast Blue; fucsina; NBT; ALK GOLD; acetilazida Cascade Blue; éster succinimidílico del ácido carboxílico/ácido dapoxilsulfónico; DY-405; éster succinimidílico de Alexa Fluor 405; éster succinimidílico de Cascade Yellow; éster succinimidílico de piridiloxazol (PyMPO); éster succinimidílico de Pacific Blue; DY-415; éster succinimidílico del ácido 7-hidroxicumarin-3-carboxílico; DYQ-425; fosforamida 6-FAM; Lucifer Yellow; yodoacetamida; éster succinimidílico de Alexa Fluor 430; éster succinimidílico de Dabcilo; cloruro/fluoruro de NBD; éster succinimidílico de QSY 35; DY-485XL; éster succinimidílico de Cy2; DY-490; éster succinimidílico del ácido carboxílico Oregon Green 488; éster succinimidílico de Alexa Fluor 488; éster succinimidílico de BODIPY 493/503 C3; DY-480XL; éster succinimidílico de BODIPY FL C3; éster succinimidílico de BODIPY FL C5; éster succinimidílico de BODIPY FL-X; DYQ-505; éster succinimidílico del ácido carboxílico Oregon Green 514; DY-510XL; DY-481XL; éster succinimidílico de 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); DY-520XL; DY-521XL; éster succinimidílico de BODIPY R6G C3; isotiocianato de eritrosina; éster succinimidílico de 5-carboxi-2',4',5',7'-tetrabromosulfonafluoresceína; éster succinimidílico de Alexa Fluor 532; éster succinimidílico de 6-carboxi-2',4',4',5',7',7'-hexaclorofluoresceína (HEX); éster succinimidílico de BODIPY 530/550 C3; DY-530; éster succinimidílico de BODIPY TMR-X; DY-555; DYQ-1; DY-556; éster succinimidílico de Cy3; DY-547; DY-549; DY-550; éster succinimidílico de Alexa Fluor 555; éster succinimidílico de Alexa Fluor 546; DY-548; éster succinimidílico de BODIPY 558/568 C3; éster succinimidílico de Rodamina Red-X; éster succinimidílico de QSY 7; éster succinimidílico de BODIPY 564/570 C3; éster succinimidílico de BODIPY 576/589 C3; éster succinimidílico de carboxi-X-rodamina (ROX); éster succinimidílico de Alexa Fluor 568; DY-590; éster succinimidílico de BODIPY 581/591 C3; DY-591; éster succinimidílico de BODIPY TR-X; éster succinimidílico de Alexa Fluor 594; DY-594; éster succinimidílico de carboxinaftofluoresceína; DY-605; DY-610; éster succinimidílico de Alexa Fluor 610; DY-615; éster succinimidílico de BODIPY 630/650-X; erio glucina; éster succinimidílico de Alexa Fluor 633; éster succinimidílico de Alexa Fluor 635; DY-634; DY-630; DY-631; DY-632; DY-633; DYQ-2; DY-636; éster succinimidílico de BODIPY 650/665-X; DY-635; éster succinimidílico de Cy5; éster succinimidílico de Alexa Fluor 647; DY-647; DY-648; DY-650; DY-654; DY-652; DY-649; DY-651; DYQ-660; DYQ-661; éster succinimidílico de Alexa Fluor 660; éster succinimidílico de Cy5.5; DY-677; DY-675; DY-676; DY-678; éster succinimidílico de Alexa Fluor 680; DY-679; DY-680; DY-682; DY-681; DYQ-3; DYQ-700; éster succinimidílico de Alexa Fluor 700; DY-703; DY-701; DY-704; DY-700; DY-730; DY-731; DY-732; DY-734; DY-750; éster succinimidílico de Cy7; DY-749; DYQ-4; y éster succinimidílico de Cy7.5.

35 En modos de realización divulgados particulares, el resto cromóforo se puede seleccionar entre tartrazina, éster

5 succinimidílico de ácido 7-dietilaminocumarina-3-carboxílico, cloruro de sulfonilo de Dabsyl, éster carboxi
 succinimidílico de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DY-495), éster succinimidílico del ácido carboxílico de
 Rhodamine Green (DY-505), isotiocianato de eosina (EITC), éster succinimidílico de 6-carboxi-2',4,7,7'-
 10 tetraclorofluoresceína (TET), éster succinimidílico de carboxirrodamina 6G, éster succinimidílico de
 carboxitetrametilrodamina (TMR, TAMRA) (DY-554), éster succinimidílico de QSY 9, cloruro de sulfonilo de
 sulforrodamina B (DY-560), Texas Red (sulforrodamina 101), galocianina, Fast Green FCF, verde malaquita,
 isotiocianato y éster succinimidílico de QSY 21. En ciertos modos de realización divulgados, el resto cromóforo del
 conjugado de señalización es distinto del cloruro de sulfonilo de Dabsyl, FITC, éster succinimidílico del ácido 7-
 dietilaminocumarin-3-carboxílico, éster succinimidílico de ácido carboxílico Rhodamine Green (DY-505), isotiocianato
 de eosina (EITC), éster succinimidílico de 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET), éster succinimidílico de
 carboxitetrametilrodamina (TMR, TAMRA) (DY-554), cloruro de sulfonilo de sulforrodamina B (DY-560), Texas Red
 (sulforrodamina 101) y galocianina.

15 Otros restos cromógenos ejemplares que se usan para el conjugado de señalización se proporcionan a
 continuación:



20 En modos de realización ilustrativos de la presente divulgación, el conjugado de señalización tiene máximos de
 absorción y amplitudes de absorción particularmente adecuadas para la obtención de imágenes de campo claro de
 dianas en muestras biológicas. En un modo de realización, un conjugado de señalización está configurado para
 proporcionar un pico de absorbancia que tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente
 800 nm, entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 750 nm, o entre aproximadamente 400 nm y
 25 aproximadamente 700 nm. Estos intervalos de longitud de onda son de particular interés porque se traducen en
 colores visibles para los humanos. Sin embargo, los enfoques descritos en el presente documento también se
 podrían aplicar a restos cromóforos útiles para metodologías de diagnóstico en el infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo
 (IR) o ultravioleta (UV).

30 En un modo de realización, el conjugado de señalización está configurado para producir una señal coloreada
 seleccionada del grupo que consiste en rojo, naranja, amarillo, verde, añil, violeta o mezclas de los mismos. En un
 modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 400 nm y 430 nm. En
 otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal amarilla. En un modo de realización, un
 conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 430 nm y 490 nm. En otro modo de realización,
 el conjugado de señalización produce una señal naranja. En un modo de realización, un conjugado de señalización
 35 tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 490 nm y 560 nm. En otro modo de realización, el conjugado de
 señalización produce una señal roja. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de

entre aproximadamente 560 nm y 570 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal violeta. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 570 nm y 580 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal añil. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 580 nm y 620 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal azul. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 620 nm y aproximadamente 800 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal verde.

En un modo de realización, el conjugado de señalización está configurado para tener una anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, o entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm. En modos de realización divulgados particulares, la AMA es inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 250 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 50 nm. En modos de realización ilustrativos, se describe un conjugado de señalización que tiene una AMA inferior a aproximadamente 150 nm. En un modo de realización, la AMA es inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 120 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 80 nm, inferior a aproximadamente 60 nm, inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 40 nm, inferior a aproximadamente 30 nm, entre aproximadamente 10 nm y 150 nm, entre aproximadamente 10 nm y 120 nm, entre aproximadamente 10 nm y 100 nm, entre aproximadamente 10 nm y 80 nm, entre aproximadamente 10 nm y 60 nm, entre aproximadamente 10 nm y 50 nm o entre aproximadamente 10 nm y 40 nm.

En otro modo de realización, el conjugado de señalización tiene una absorptividad molar promedio superior a de aproximadamente $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a aproximadamente $90\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por ejemplo, una absorptividad molar promedio superior a aproximadamente $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $10\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $20\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $40\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o superior a aproximadamente $80\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En otro modo de realización más, el conjugado de señalización tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 M. Por ejemplo, el conjugado de señalización tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,1 mM, al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 100 mM, o al menos aproximadamente 1 M. En un modo de realización, el conjugado de señalización es estable frente a la precipitación en una solución acuosa tamponada durante más de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 30 meses. Por ejemplo, el conjugado de señalización es estable frente a la precipitación en una solución acuosa tamponada durante más de aproximadamente 1 mes, más de aproximadamente 3 meses, más de aproximadamente 6 meses, más de aproximadamente 12 meses, más de aproximadamente 18 meses o más de aproximadamente 24 meses.

Como se describe en el presente documento, la AMA del pico de absorción contribuye significativamente al color observado del conjugado de señalización. Con referencia a la figura 6(A-B), se observan varios colores para la luz observada en un intervalo relativamente pequeño de longitudes de onda. En particular, la luz amarilla solo es aparente en un intervalo relativamente estrecho de 20 nm. Para impartir un color amarillo a una sustancia, se debe absorber a un intervalo relativamente estrecho de longitudes de onda visibles (400-430 nm). Con referencia a las figuras 7(A) y 7(B), el conjugado de señalización mostrado en las mismas tiene una AMA de aproximadamente 40 nm. La figura 15(A) es una primera microfotografía y la figura 15(B) es una segunda microfotografía de una proteína teñida (IHC de HER2 (4B5) en xenoinjertos Calu-3) usando el conjugado de señalización que tiene los espectros de absorción mostrados en la figura 16. La línea A corresponde al conjugado de señalización utilizado para la figura 15(A) y la línea B corresponde al conjugado de señalización utilizado para la figura 15(B); obsérvese que cada conjugado de señalización se analizó con espectrometría en solución antes de la tinción y en el portaobjetos después de haber detectado el HER2 (las líneas discontinuas que representan los espectros obtenidos en el tejido). El conjugado de señalización usado para teñir el tejido mostrado en la figura 15(A) tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 456 nm y una AMA de aproximadamente 111 nm. El conjugado de señalización usado para teñir el tejido mostrado en la figura 15(B) tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 628 nm y una AMA de aproximadamente 70 nm.

La tabla 3 muestra un sistema de clasificación para las propiedades espectrales de diversos conjugados de señalización de acuerdo con modos de realización ilustrativos de la presente divulgación. De acuerdo con el sistema de clasificación, hay seis colores diferentes en los que un cromógeno particular se podría clasificar como series numeradas mediante números romanos del uno al seis (es decir, I a VI). Para cada clasificación de color, hay cinco clasificaciones de ancho de banda, realizándose esas clasificaciones de ancho de banda de acuerdo con mediciones de AMA más amplias. En consecuencia, la clasificación de anchura de banda (a) es la más estrecha e incluye aquellos conjugados de señalización que tienen anchuras AMA de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 nm. La clasificación de anchura de banda (e) es la más amplia e incluye aquellos conjugados de señalización que tienen anchuras AMA de entre aproximadamente 130 y 160 nm. Un conjugado de señalización de color rojo que tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 530 nm y una AMA de aproximadamente 115 nm podría clasificarse como un conjugado de señalización de serie III(d).

Tabla 3: Sistema de clasificación de las propiedades espectrales de conjugados de señalización

	color	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	AMA (nm)				
			10-40	40-70	70-100	100-130	130-160
I.	amarillo	350-430	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
II.	naranja	430-490	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
III.	rojo	490-560	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
IV.	añil / violeta	560-580	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
V.	azul	580-620	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
VI.	verde	620-800	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)

5 Las figuras 17(A-D) son microfotografías de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes
restos cromógenos. La figura 17(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia
de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada. Como consecuencia, la
línea (A) de la figura 17(E) corresponde al conjugado de señalización mostrado en la figura 17(A). Las otras líneas
están asociadas de manera similar con las microfotografías correspondientes. El color azul aparente en el
10 portaobjetos es una solución de azulado comercialmente disponible. La figura 17(A) y la línea "A" de la figura 17(E)
muestran un conjugado de señalización de verde malaquita. Es clasificable como un conjugado de señalización I(b)
de acuerdo con la tabla 3. La figura 17(B) y la línea "B" de la figura 17(E) muestran un conjugado de señalización de
tartrazina. Es clasificable como un conjugado de señalización I(c) de acuerdo con la tabla 3. La figura 17(C) y la
línea "C" de la figura 17(E) muestran un conjugado de señalización de sulforrodamina B. Es clasificable como un
15 conjugado de señalización IV(b) de acuerdo con la tabla 3. La figura 17(D) y la línea "D" de la figura 17(E) muestran
un conjugado de señalización de Victoria Blue. Es clasificable como un conjugado de señalización VI(c) de acuerdo
con la tabla 3.

20 Las figuras 18(A-D) son microfotografías de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes
restos cromógenos. La figura 18(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia
de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada. La figura 18(A) y la
línea "A" de la figura 18(E) muestran un conjugado de señalización de cumarina (ácido 4-(dietilamino)-2-oxo-2H-
cromeno-3-carboxílico). Es clasificable como un conjugado de señalización I(b) de acuerdo con la tabla 3. La figura
18(B) y la línea "B" de la figura 18(E) muestran un conjugado de señalización de Dabsyl (ácido
25 dimetilaminoazobencenosulfónico). Es clasificable como un conjugado de señalización II(b) de acuerdo con la tabla
3. La figura 18(C) y la línea "C" de la figura 18(E) muestran un conjugado de señalización de TAMRA. Es clasificable
como un conjugado de señalización III(b) de acuerdo con la tabla 3. La figura 18(D) y la línea "D" de la figura 18(E)
muestran un conjugado de señalización de 5-(y-6)-carboxirrodamina 110. Es clasificable como un conjugado de
señalización V(a) de acuerdo con la tabla 3.

30 Las figuras 19(A-D) son microfotografías de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes
restos cromógenos. La figura 19(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia
de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada. La figura 19(A) y la
línea "A" de la figura 19(E) muestran un conjugado de señalización de FITC (1-(3',6'-dihidroxi-3-
oxospiro(isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanten-5-ilo)). Es clasificable como un conjugado de señalización III(b) de
35 acuerdo con la tabla 3. La figura 19(B) y la línea "B" de la figura 19(E) muestran un conjugado de señalización de
Rodamina 6G. Es clasificable como un conjugado de señalización III(c) de acuerdo con la tabla 3. La figura 19(C) y
la línea "C" de la figura 19(E) muestran un conjugado de señalización de Texas Red (sulforrodamina 101). Es
clasificable como un conjugado de señalización IV(c) de acuerdo con la tabla 3. La figura 19(D) y la línea "D" de la
40 figura 19(E) muestran un conjugado de señalización de Cy5. Es clasificable como un conjugado de señalización
VI(c) de acuerdo con la tabla 3.

45 Las figuras 20(A-D) son microfotografías de tejidos teñidos con conjugados de señalización que tienen diferentes
restos cromógenos. La figura 20(E) muestra los espectros de UV-Vis con trazas correspondientes a la absorbancia
de los conjugados de señalización, correspondiendo las trazas a la microfotografía asociada. La figura 20(A) y la
línea "A" de la figura 20(E) muestran un conjugado de señalización de Rodamina 110. Es clasificable como un
conjugado de señalización III(b) de acuerdo con la tabla 3. La figura 20(B) y la línea "B" de la figura 20(E) muestran
un conjugado de señalización de JOE (éster succinimidílico de 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína). Es
clasificable como un conjugado de señalización III(c) de acuerdo con la tabla 3. La figura 20(C) y la línea "C" de la
figura 20(E) muestran un conjugado de señalización de galioianina. Es clasificable como un conjugado de

señalización III(c) de acuerdo con la tabla 3. La figura 19(D) y la línea "D" de la figura 19(E) muestran un conjugado de señalización de carboxirrodamina B. También es clasificable como un conjugado de señalización III(c) de acuerdo con la tabla 3.

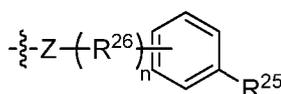
5 En modos de realización ilustrativos, se divulga un procedimiento para detectar dianas múltiples en una muestra usando conjugados de señalización espectralmente distintos. En un modo de realización, el procedimiento incluye usar dos o más conjugados de señalización seleccionados entre aquellas clasificaciones mostradas en la tabla 3. En otro modo de realización, el procedimiento incluye usar tres o más conjugados de señalización seleccionados entre aquellas clasificaciones mostradas en la tabla 3. En otro modo de realización, el procedimiento incluye usar un primer conjugado de señalización de una primera clasificación I-VI y un segundo conjugado de señalización seleccionado de una segunda clasificación I-VI, en el que la primera y la segunda clasificación no son la misma. En otro modo de realización, el procedimiento incluye usar un primer conjugado de señalización de una primera clasificación I-VI, un segundo conjugado de señalización de una segunda clasificación I-VI y un tercer conjugado de señalización de una tercera clasificación I-VI, en el que la primera, la segunda y la tercera clasificación no son la misma. En otros modos de realización, al menos uno de los conjugados de señalización tiene una clasificación de AMA de (e) o más estrecha. En otro modo de realización, al menos uno de los conjugados de señalización tiene una clasificación de AMA de (d) o más estrecha. En otro modo de realización, al menos uno de los conjugados de señalización tiene una clasificación de AMA de (c) o más estrecha. En otro modo de realización, al menos uno de los conjugados de señalización tiene una clasificación de AMA de (b) o más estrecha. En otro modo de realización, al menos dos conjugados de señalización tienen una clasificación de AMA de (e) o más estrecha. En otro modo de realización, al menos tres conjugados de señalización tienen una clasificación de AMA de (e) o más estrecha.

2. Resto reactivo latente

25 El resto reactivo latente está configurado para experimentar una activación catalítica para formar una especie reactiva que se puede unir covalentemente a la muestra o a otros componentes de detección. La activación catalítica es impulsada por una o más enzimas (por ejemplo, enzimas oxidoreductasas y enzimas peroxidadas, como la peroxidasa de rábano picante). En presencia de peróxido, estas enzimas pueden catalizar la formación de especies reactivas. Estas especies reactivas, por ejemplo, radicales libres, son capaces de reaccionar con compuestos fenólicos proximales a su generación, es decir, cerca de la enzima. Los compuestos fenólicos disponibles en la muestra son con mayor frecuencia residuos de tirosilo de las proteínas. Como resultado, el resto reactivo latente se puede añadir a una muestra que contiene proteína en presencia de una enzima peroxidasa y un peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), que puede catalizar la formación de radicales y posteriormente hacer que el resto reactivo forme un enlace covalente con la muestra biológica.

35 En modos de realización divulgados particulares, el resto reactivo latente comprende al menos un resto aromático. En modos de realización ejemplares, el resto reactivo latente comprende un resto fenólico y se une a un grupo fenol de un aminoácido tirosina. Sin embargo, es deseable unir específicamente el conjugado de marcaje a través del resto reactivo latente en, o en estrecha proximidad con, una diana deseada a la muestra. Este objetivo se puede lograr inmovilizando la enzima en la región diana, como se describe en el presente documento. Solo los restos reactivos latentes que se encuentren muy próximos a la enzima inmovilizada reaccionarán y formarán enlaces con los residuos de tirosina en los alrededores de, o proximales a, la enzima inmovilizada, incluidos los residuos de tirosina en la enzima misma, los residuos de tirosina en el anticuerpo al que se conjuga la enzima y/o los residuos de tirosina en la muestra que son proximales a la enzima inmovilizada. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de marcaje se puede unir proximalmente, tal como hasta una distancia de aproximadamente 100 nm, hasta una distancia de aproximadamente 50 nm, hasta una distancia de aproximadamente 10 nm, o hasta una distancia de aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Por ejemplo, el residuo de tirosina puede estar a una distancia de aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 100 nm, aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 50 nm, aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 10 nm o aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Dicha unión proximal permite que la diana se detecte con al menos el mismo grado de especificidad que los procedimientos de tinción convencionales usados con los procedimientos de detección divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los modos de realización del procedimiento divulgado permiten distinguir estructuras subcelulares, por ejemplo, la membrana nuclear frente a la región nuclear, la membrana celular frente a la región citoplásmica, etc.

55 En modos de realización divulgados particulares, el resto reactivo latente tiene la fórmula general ilustrada a continuación.



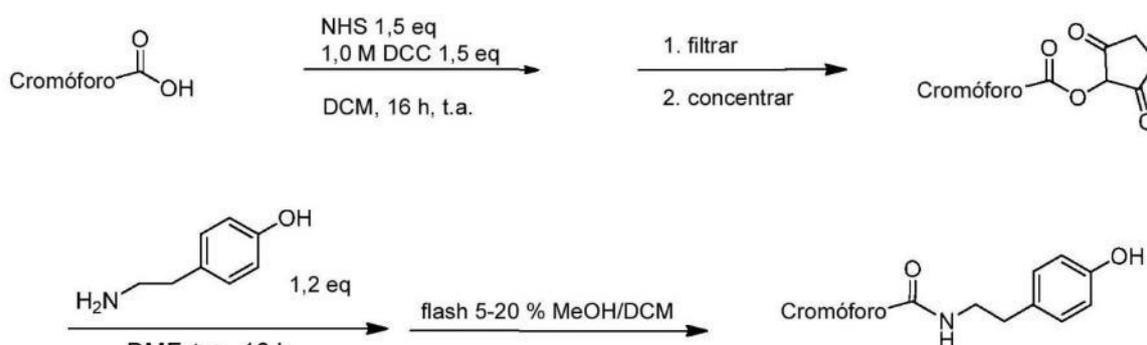
Fórmula 5

60 Con referencia a la fórmula 5, R²⁵ se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, éter, amina y amina sustituida; R²⁶ se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, -OR_m, -NR_m y -SR_m, en la

que m es 1-20; n es 1-20; Z se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y NR^a en la que R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo. Un modo de realización ejemplar del resto reactivo latente es tiramina (o tiramida, que es el nombre dado a una molécula de tiramina conjugada con el marcador detectable y/o el conector opcional) o un derivado de la misma.

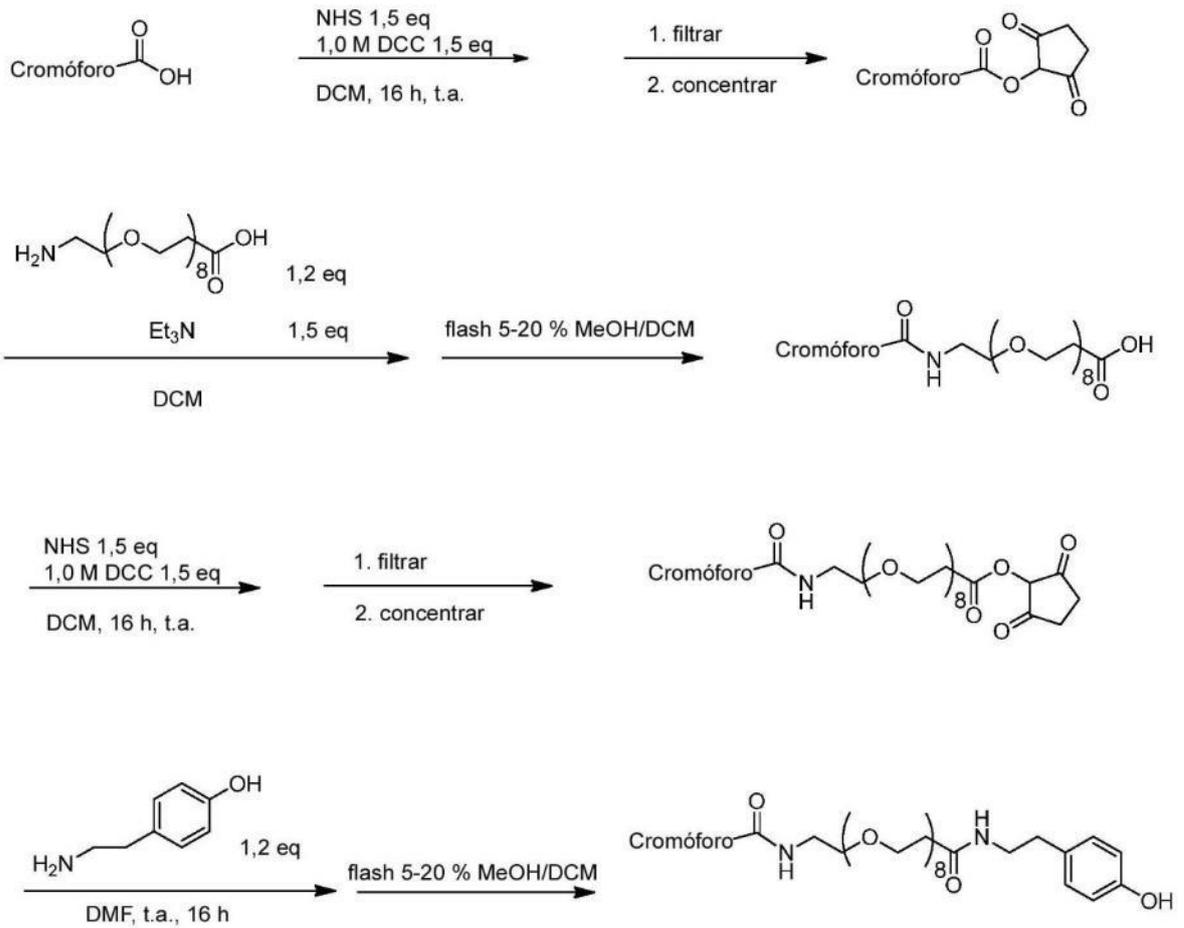
5 En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización tiene una concentración mínima, cuando se deposita covalentemente sobre la muestra, de más de aproximadamente 1×10^{11} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ o de más de aproximadamente 1×10^{13} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ dentro de la muestra biológica. En modos de realización divulgados particulares, la concentración de conjugado de señalización depositado varía de aproximadamente 1×10^{11} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ a aproximadamente 1×10^{13} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$.

15 Los modos de realización del conjugado de señalización divulgado se pueden realizar usando el procedimiento general ilustrado en el esquema 1. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado se forma sin un conector opcional. Por ejemplo, un resto de ácido carboxílico del cromóforo se puede acoplar con una molécula de tiramina o derivado de tiramina convirtiendo primero el ácido carboxílico en un éster activado y luego formando un enlace amida entre el cromóforo y la molécula de tiramina o derivado de tiramina. Un procedimiento ejemplar para preparar un conjugado de señalización sin un conector se ilustra a continuación en el esquema 2.



Esquema 1

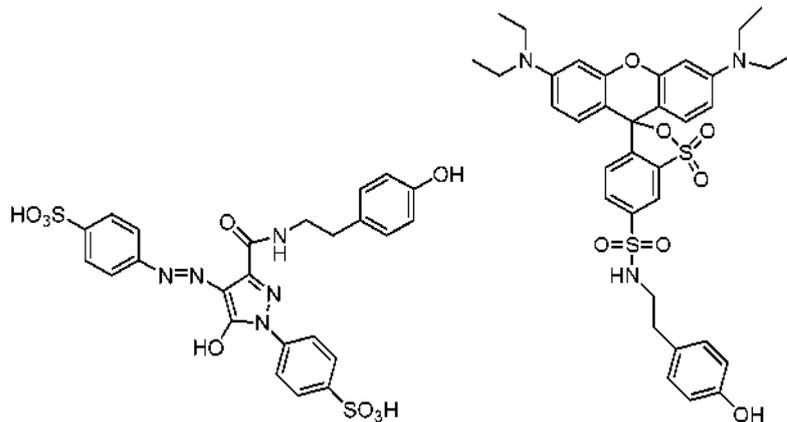
20 En modos de realización en los que el conector está presente, el resto de ácido carboxílico del cromóforo se puede acoplar con un conector terminado en amina (por ejemplo, un óxido de alquileo) convirtiendo primero el ácido carboxílico en un éster activado y luego formando un enlace amida entre el cromóforo y el conector terminado en amina. El extremo restante del conector se puede activar y posteriormente acoplar con una molécula de tiramina o derivado de tiramina. Un procedimiento ejemplar para preparar el conjugado de señalización se proporciona a continuación en el esquema 2.

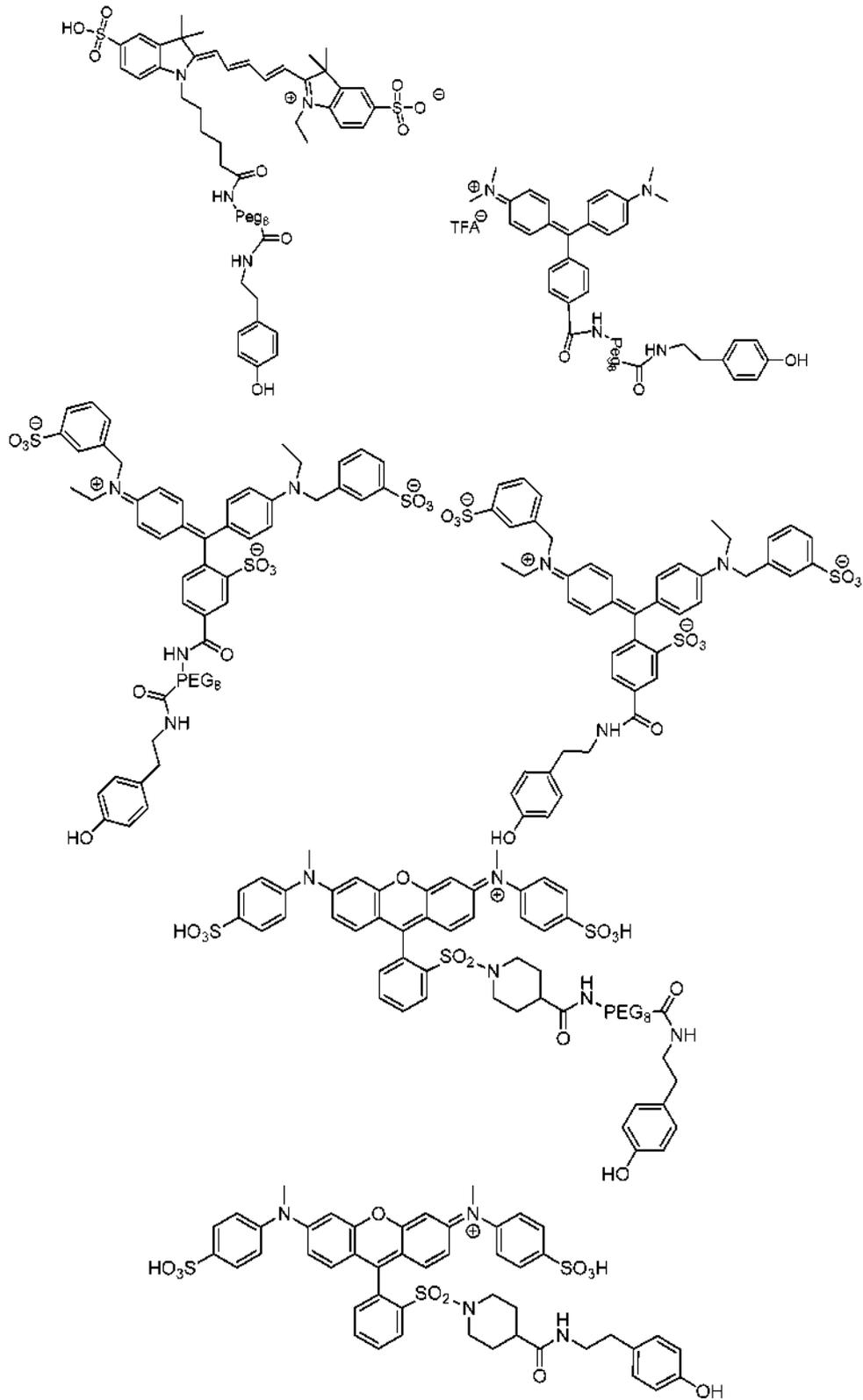


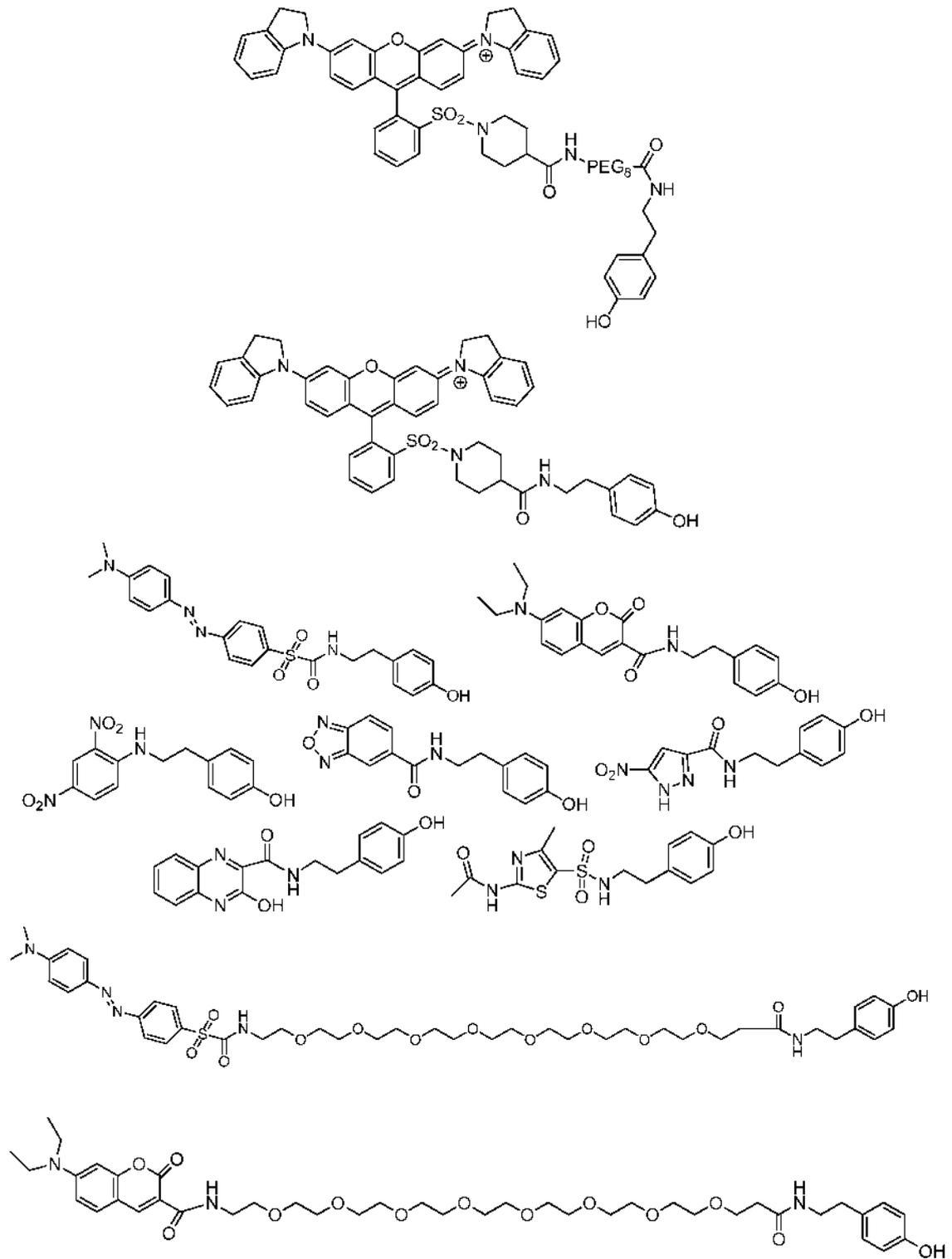
Esquema 2

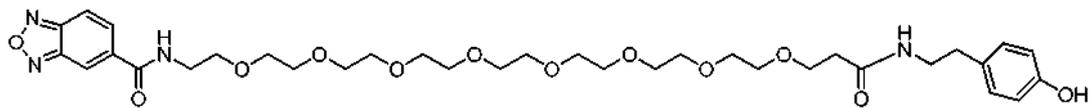
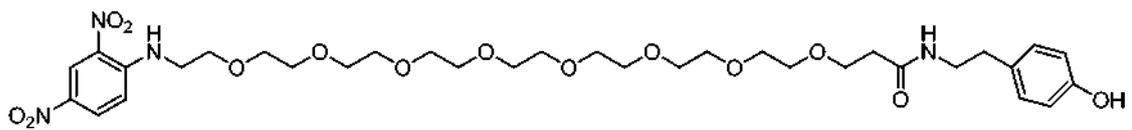
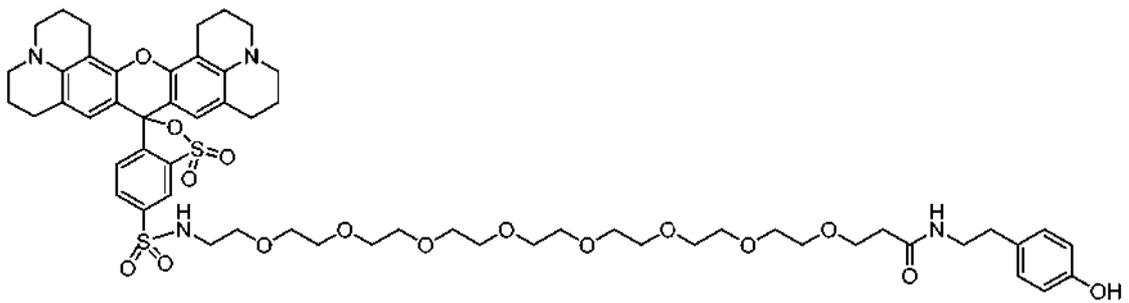
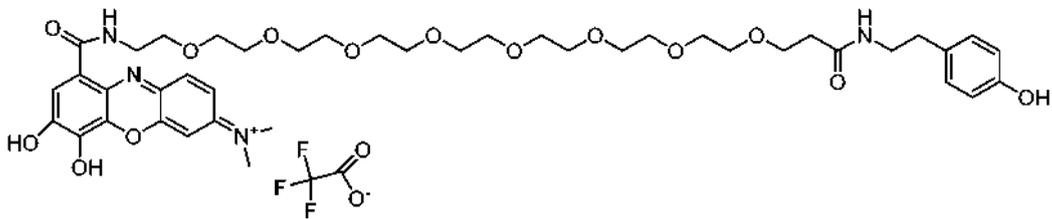
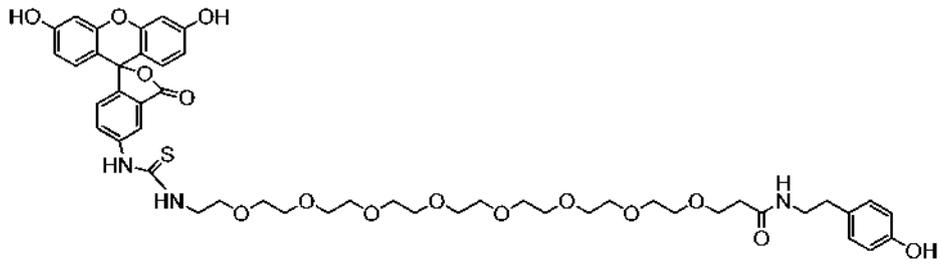
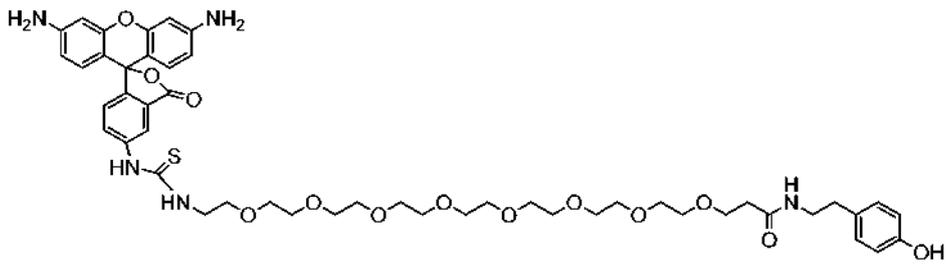
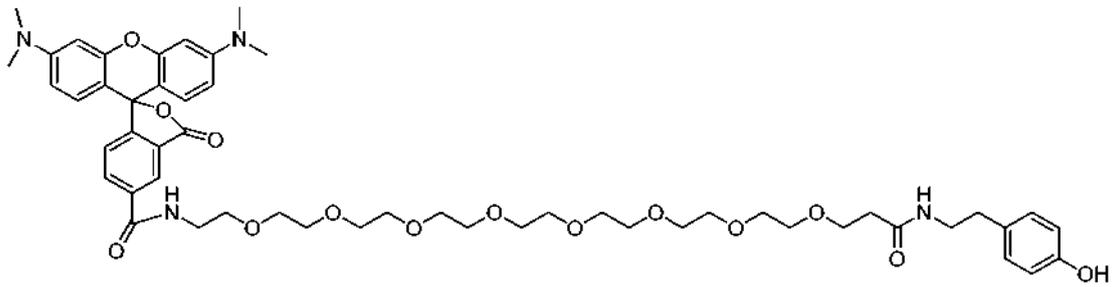
A continuación se proporcionan conjugados de señalización a modo de ejemplo.

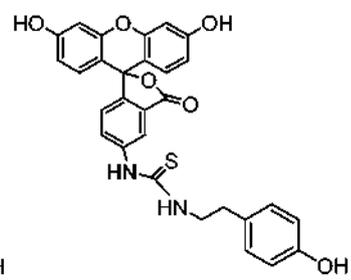
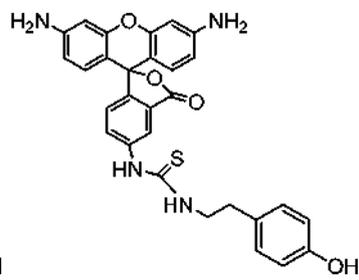
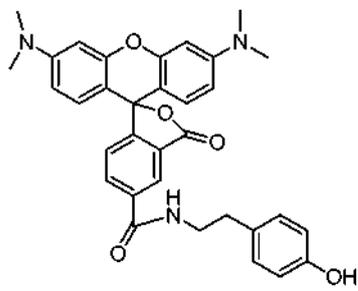
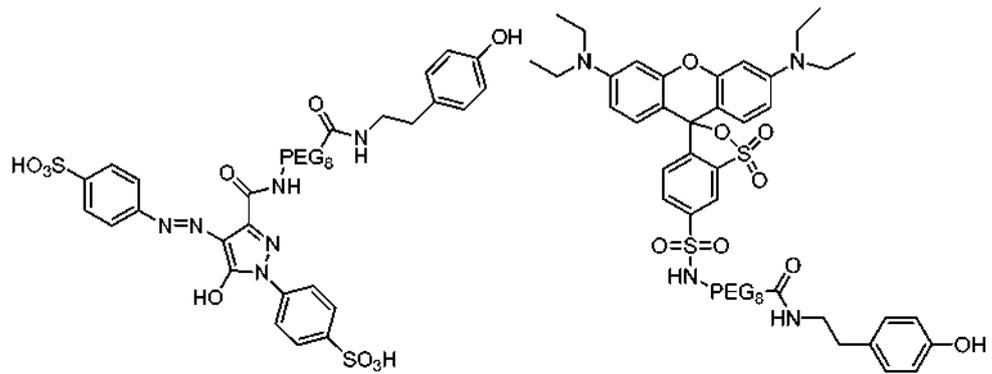
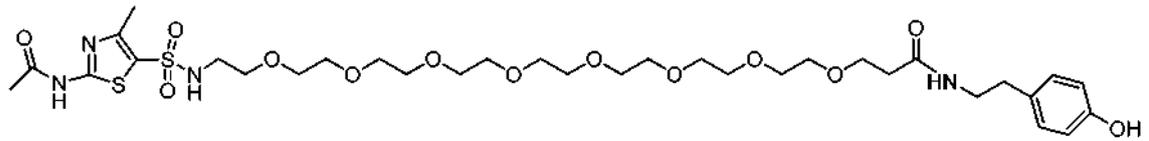
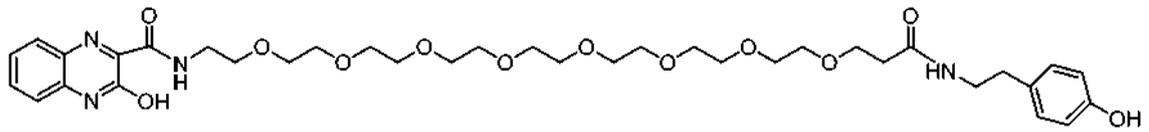
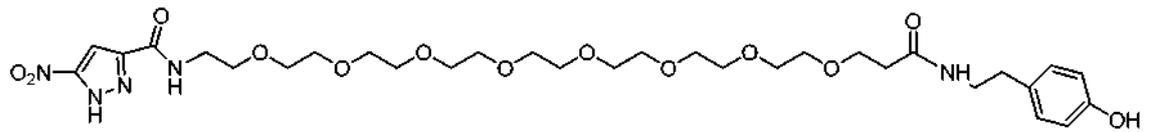
5

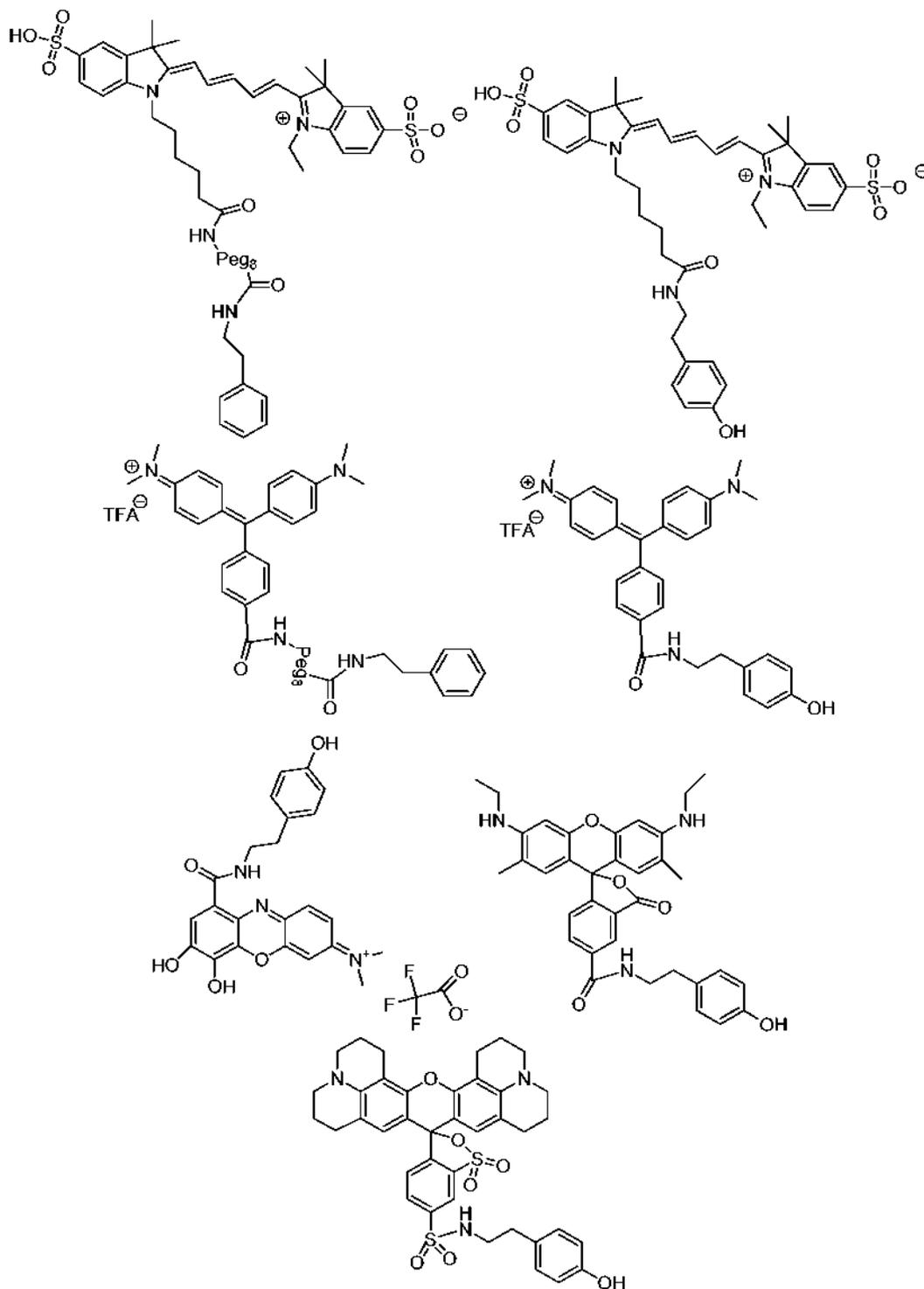












D. Conjugados de amplificación

- 5 También se divulgan en el presente documento conjugados adecuados para amplificar una señal obtenida tras llevar a cabo el procedimiento divulgado en el presente documento. Los conjugados de amplificación comprenden típicamente un resto reactivo latente, un marcador detectable y un conector opcional.
- 10 El marcador detectable del conjugado de amplificación puede ser cualquier marcador detectable proporcionado en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el marcador detectable es un hapteno, tal como cualquiera de los haptenos divulgados en el presente documento. Se hace referencia a la patente de EE. UU. n.º 7.695.929, que divulga estructuras y enfoques sintéticos para preparar conjugados de amplificación y sus

correspondientes anticuerpos específicos. En modos de realización divulgados particulares, un hapteno que tiene un grupo funcional electrófilo (o que tiene un grupo funcional capaz de convertirse en un grupo funcional electrófilo) se conjuga con el resto reactivo latente o con un conector (por ejemplo, un conector alifático o de poli(óxido de alquileo). En ciertos modos de realización, el hapteno incluye un grupo funcional de ácido carboxílico que se convierte en un grupo funcional electrófilo activado que contiene carbonilo, tal como, pero sin limitación, un haluro de acilo, un éster (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida) o un anhídrido. El resto reactivo latente incluye un grupo funcional nucleófilo (por ejemplo, amino, hidroxilo, tiol o aniones formados a partir de los mismos) capaz de reaccionar con el grupo funcional electrófilo activado del hapteno. El grupo electrófilo del hapteno se puede acoplar al grupo nucleófilo del resto reactivo latente usando técnicas de acoplamiento orgánico conocidas por un experto en la técnica de la síntesis química orgánica. En modos de realización en los que el conjugado incluye un conector, el conector tiene típicamente un grupo funcional nucleófilo en un extremo y un grupo funcional electrófilo en el otro extremo. El grupo nucleófilo del conector se puede acoplar al grupo electrófilo del hapteno, y el grupo electrófilo del conector se puede activar y acoplar al grupo nucleófilo del resto reactivo latente utilizando técnicas de acoplamiento orgánico conocidas por un experto en la materia de la síntesis química orgánica.

En modos de realización ilustrativos adicionales, el conjugado de señalización se usa como un conjugado de amplificación. El conjugado de señalización se puede usar como un conjugado de amplificación en el que el resto cromóforo es un resto de marcaje eficaz. En modos de realización ilustrativos, un anticuerpo específico para un resto cromóforo permite que el resto cromóforo sirva como un conjugado de señalización y marcaje. Desde otra perspectiva, un hapteno que posee atributos físicos, como se divulga en el presente documento, para restos cromóforos eficaces, se puede usar como un resto cromóforo y como un hapteno. Existen beneficios particulares de usar un conjugado de señalización como conjugado de amplificación. En particular, la etapa de amplificación daría como resultado la deposición de cantidades significativas, por ejemplo, potencialmente detectables, del resto cromóforo. Como resultado, la detección cromogénica posterior podría ser más fuerte. De manera similar, como se describe en el presente documento con respecto a la mezcla de cromógenos de diferentes clasificaciones, se podría generar un color único usando la superposición de absorbancias de dos o más restos cromóforos.

VI. MODOS DE REALIZACIÓN DE TRABAJO

Procedimientos generales y preparación

Toda la detección por ISH se realizó en un Ventana Benchmark XT. Las sondas marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición del conjugado de señalización (concentración final de 12,5 μ M) se catalizó por la adición de H₂O₂ (porcentaje final de un 0,003 %).

Para ensayos que utilizan una etapa de amplificación intermedia, el anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda cataliza la deposición del conjugado de amplificación (concentración final de 6,25 μ M) mediante la adición de H₂O₂. Los conjugados de amplificación unidos covalentemente en el tejido sirvieron como sitios de unión para conjugados enzimáticos monoclonales (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición del conjugado de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μ M) y H₂O₂.

Prueba del conjugado de señalización:

En cada solución de colorante de tiramida se sometió a prueba la funcionalidad en un intervalo de concentraciones de micromolar a milimolar usando un modelo de inmunohistoquímica contra la proteína Her2 en tejidos de xenoinjerto Calu-3, ZR75-1 y MCF-7 incluidos en parafina y fijados en formol montados en portaobjetos Superfrost. Los tejidos se tiñeron usando un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos Ventana Benchmark XT. Los reactivos necesarios para la prueba incluyen anticuerpo primario Her2 (4B5) de VMSI (n.º ref. 790-2991), HRP anti-Rb UltraMap (n.º ref. 760-4315), kit de detección de AmpMap con TSA (n.º ref. 760-121), hematoxilina II (n.º ref. 790-2208) y reactivo de azulado (n.º ref. 760-2037). Los portaobjetos se desparafinaron y luego se recuperó el antígeno utilizando la solución de acondicionamiento celular 1 (n.º ref. 950-124), seguido de la adición del anticuerpo primario durante 16 minutos a 37 °C, el anticuerpo secundario durante 16 minutos a 37 °C y amplificación usando una única solución de tiramida en diluyente TSA (n.º ref. 60900) o solución salina tamponada con fosfato con la adición de TSA-H₂O₂ (n.º ref. VMSI 760-4141) e incubación de la reacción durante 20 minutos. Cada portaobjetos se contratiñó con incubación durante 4 minutos de hematoxilina seguido de una incubación durante 4 minutos de la solución de azulado y se deshidrató usando alcoholes de gradiente y cubreobjetos.

Evaluación del conjugado de señalización:

La evaluación de la señal de tiramida se visualizó mediante el uso de un microscopio de luz blanca de campo claro. Cada portaobjetos comprendía un control positivo para la proteína Her2 de alta expresión (xenoinjerto Calu-3), un control de nivel de proteína intermedio (xenoinjerto ZR75-1) y un control negativo para la expresión de proteína Her2

(xenoinjerto MCF7). En las soluciones de tiramida que tenían tinción específica se sometió a prueba además la intensidad de colorante óptima en el ensayo anterior antes de que se realizara la tinción tisular para las dianas de nucleótidos.

5 *Solubilidad y pH del conjugado de señalización:* La solubilidad y el pH demostraron ser variables únicas para cada colorante de tiramida. Por ejemplo, la tiramida verde de malaquita demostró ser insoluble en el diluyente TSA básico a pH 8,5 (n.º ref. VMSI 60900); sin embargo, usando un pH neutro de 7,4, la solución salina tamponada con fosfato
10 mostró una mejor solubilidad y ninguna alteración de las propiedades de color. Cualquier intervalo de pH inferior a 6,0 para la tiramida verde malaquita convirtió la solución verde original en un color amarillo que no era deseado. También se encontró que, para que los colorantes de tiramina se visualizaran bajo una luz blanca de campo claro, debían alcanzarse concentraciones muy altas, del orden de 10 a 20 veces más altas que las utilizadas para la fluorescencia, para generar material suficientemente coloreado en el portaobjetos de tejido. Las soluciones madre se formularon a concentraciones milimolares o superiores y la solución de trabajo se diluyó en un tampón acuoso a pH y solubilidad óptimos para cada colorante de tiramida único.

15 **Ejemplo 1**

El interrogatorio de la expresión génica en secciones de tejido mediante PCR o micromatrices se ha utilizado con éxito para clasificar la probabilidad de recidiva tumoral de los pacientes e identificar a aquellos que se pueden
20 beneficiar de terapias específicas. Sin embargo, la especificidad tisular y el contexto celular, que mejoran el valor de los ensayos basados en tejido, se pierden durante la extracción de ARNm. Además, se pueden generar resultados falsos positivos o negativos debido a la presencia de células no tumorales “contaminantes” en la sección. Como resultado, existe la necesidad de ensayos de hibridación *in situ* automatizados que se dirijan a ARNm (ISH-ARNm) que permitan una evaluación robusta y reproducible de la expresión de biomarcadores mientras se preserva el
25 contexto y especificidad tisular, así como las relaciones entre células. La preservación del contexto y la capacidad de minimizar la contaminación de ácido nucleico (ARN) entre células son deseables para las pruebas que cuestionan la clonalidad celular en la que una célula expresa cualquiera de los dos biomarcadores, pero nunca ambos.

Se describen procedimientos para analizar la expresión de una diana de ARNm en una muestra. En modos de
30 realización ilustrativos, los procedimientos incluyen poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico marcada. La detección de la sonda marcada crea una señal que corresponde a la expresión de la diana de ARNm. La presente divulgación describe además composiciones, kits y procedimientos para la determinación de la clonalidad celular en muestras de cáncer humano. Específicamente, se describen linfomas de linfocitos B que resultan de la expansión clonal de una población específica de linfocitos B que expresan ARNm de KAPPA o
35 LAMBDA.

En modos de realización ilustrativos, un procedimiento para analizar simultáneamente la expresión de dos dianas de ARNm en una muestra incluye poner en contacto la muestra con una sonda de diana de ARNm, en la que la sonda de diana de ARNm se marca con un primer hapteno, poner en contacto la muestra con una sonda de estándar de ARNm interno, en la que la sonda de estándar de ARNm interno se marca con un segundo hapteno, poner en
40 contacto la muestra con un primer reactivo de detección cromogénica, poner en contacto la muestra con un segundo reactivo de detección cromogénica, detectar una segunda señal del segundo reactivo de detección cromogénica, en la que la segunda señal proporciona la expresión del estándar de ARNm interno, y detectar una primera señal del primer reactivo de detección cromogénica, en la que la primera señal proporciona la expresión de la diana de ARNm. En un modo de realización, la detección de la segunda señal por debajo de un nivel de señal predeterminado indica que la muestra carece de integridad para el análisis de la diana de ARNm.

El cáncer es el resultado del crecimiento incontrolado de una población celular; esta población puede surgir a partir de una única célula madre mutante y, por lo tanto, comprender una población clonal. Un ejemplo de cáncer derivado
50 de una población clonal es el de los linfomas no Hodgkin de linfocitos B (LNH-B) que surgen de la proliferación monoclonal de linfocitos B. La expansión clonal de una población específica de linfocitos B se puede detectar mediante expresión única de proteína y ARNm de cadena ligera Kappa o Lambda como parte de su anticuerpo contra receptores de linfocitos B. Un enfoque para la identificación de la proliferación monoclonal de linfocitos B es la tinción cromogénica doble del ARNm de Kappa y Lambda. Con referencia a las figuras 21(A-B), se muestra un
55 enfoque de tinción doble cromogénica ejemplar.

La expresión uniforme de cualquiera de las cadenas ligeras por los linfocitos B cancerosos permite la diferenciación de los linfomas de linfocitos B monoclonales de las poblaciones de linfocitos B que expresan cadenas ligeras Kappa y Lambda que resultan durante la respuesta inmunitaria normal. La determinación de los patrones de expresión del ARNm de la cadena ligera se complica por el intervalo del número de copias del ARNm de la cadena ligera y la proteína del anticuerpo expresados por neoplasias de linfocitos B derivadas de una variedad de estadios de linfocitos B (células indiferenciadas y de memoria: 10-100 copias por célula; células plasmáticas: ~ 100 mil copias por célula). La figura 22 es un esquema que muestra los números de copias de Kappa / Lambda esperados asociados con diferentes tipos de linfomas de linfocitos B no Hodgkins.

65 Aunque la presente divulgación describe, en particular, procedimientos sensibles para analizar una muestra usando

ARNm de KAPPA y LAMBDA en muestras de tejido que expresan un intervalo de números de copias de ARNm de cadena ligera, los enfoques descritos en el presente documento son generales y aplicables a diversos biomarcadores útiles expresados únicamente por poblaciones celulares específicas. La aplicación de la tecnología divulgada a sondas de estándar de ARNm y dianas adicionales está dentro del alcance de la presente divulgación.

Al aplicar de este modo la tecnología divulgada, el presente procedimiento permite la interrogación de estados de enfermedad adicionales y el desarrollo de análisis predictivos y pronósticos mejorados para pacientes con cáncer, así como nuevas técnicas diagnósticas complementarias. Además, aunque la divulgación describe el análisis por ISH de ARNm bicolor, el alcance de la presente invención incluye colores adicionales (por ejemplo, tricolor, cuatricolor, etc.).

En modos de realización ilustrativos, un procedimiento para determinar la clonalidad celular analizando la expresión de dianas de ARNm en una muestra que son expresadas de forma única por una población celular específica comprende poner en contacto la muestra con una primera sonda de diana de ARNm, en la que la primera sonda de diana de ARNm se marca con un primer hapteno, poner en contacto la muestra con una segunda sonda de diana de ARNm, en la que la segunda sonda de diana de ARNm se marca con un segundo hapteno, poner en contacto la muestra con un primer reactivo de detección cromogénica, poner en contacto la muestra con un segundo reactivo de detección cromogénica, detectar una primera señal del primer reactivo de detección cromogénica, en la que la primera señal proporciona la expresión de la primera diana de ARNm, detectar una segunda señal del segundo reactivo de detección cromogénica, en la que la segunda señal proporciona la expresión de la segunda diana de ARNm. En un modo de realización, la primera y la segunda señal indican la clonalidad celular para la muestra. En otro modo de realización, la muestra es una población de linfocitos B específica y la primera y la segunda señal corresponden a ARNm de KAPPA o LAMBDA.

Preparación y formulación de la sonda: Las ribosondas KAPPA y LAMBDA complementarias (antisentido) y no complementarias (sentido) se transcribieron *in vitro* a partir de plantillas de ADNds amplificadas por PCR que contenían el promotor T7. Los ácidos nucleicos se marcaron químicamente con diferentes haptenos (DIG, DNP) utilizando brazos conectores preparados conforme a las indicaciones del fabricante (Label IT® Technology, Mirus Bio LLC, Madison, WI) y NHS-PEG8-haptenos. Veinticinco nanogramos de cada sonda se suspendieron en un ml de un tampón de hibridación (RiboHybe™, n.º ref. VMSI 760-104) y se colocaron en un dispensador (n.º ref. VMSI 760-205) compatible con un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos (VMSI, Discovery XT, n.º ref. F-DISXT-750000).

Hibridaciones *in situ* de ARNm y detección: Las muestras se tiñeron usando reactivos de ISH-ARNm (RiboMap, n.º ref. VMSI 760-102). Las muestras clínicas de tejido de amígdala y linfoma incluidas en parafina y fijadas en formol se montaron en portaobjetos (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser) y se desparafinaron y se recuperó el antígeno utilizando reactivos de acondicionamiento celular (Cell Conditioning 1, n.º ref. VMSI 950-124 y proteasa 3, n.º ref. VMSI 760-2020). Después de la recuperación, se dispuso en el portaobjetos una gota (100 µl) de un cóctel de sondas de cadena anti-sentido HER2 y ACTB marcadas con hapteno, se desnaturalizaron a 80 °C durante 8 min y se hibridaron a 65 °C durante 6 h. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron 3 veces usando un tampón de rigurosidad (0,1x SSC n.º ref. VMSI 950-110) a 75 °C durante 8 min para eliminar la sonda no específicamente hibridada.

Se utilizó un procedimiento de amplificación de dos niveles para amplificar la señal para cada uno de los eventos de unión. Los reactivos incluyeron (1) un anticuerpo anti-hapteno conjugado con HRP para catalizar la deposición de (2) un conjugado tiramida-hapteno que luego se unió mediante (3) un segundo anticuerpo anti-hapteno conjugado con HRP. La HRP se usó para catalizar la deposición de un cromóforo y un conjugado de tiramida para LAMBDA y DAB para KAPPA.

La actividad de la peroxidasa tisular endógena se inactivó dispensando una gota de un inhibidor (inhibidor de PO, n.º ref. VMSI 760-4143) e incubando la reacción durante 12 min. Después de varios lavados, se dispuso una gota de un segundo reactivo de bloqueo de amplificación (bloqueo TSA, n.º ref. VMSI 760-4142) en el portaobjetos y se incubó durante 4 min. A continuación, se dispuso una gota de solución de anticuerpo monoclonal anti-hapteno conjugado con HRP (conjugado de 2,5 µg/ml preparado en diluyente de avidina más bloqueador B5, n.º ref. VMSI 90040); la mezcla se incubó durante 28 min. La amplificación de haptenos mediada por tiramida se realizó dispensando una gota de conjugado tiramida-hapteno sobre el portaobjetos, seguido de una gota de una solución de peróxido de hidrógeno (TSA-H₂O₂, n.º ref. VMSI 760-4141) y permitiendo que la reacción se incubara durante 20 min.

El procedimiento se repitió para dirigir la amplificación mediada por tiramida del segundo hapteno en el cóctel de sondas. Los estudios de control demostraron que se prefería el uso de tres aplicaciones sucesivas del inhibidor de peróxido para inactivar el anticuerpo anti-hapteno conjugado con HRP previo. La omisión de la etapa de inactivación dio como resultado la colocalización de señales y la presencia de señales de ARNm no específicas. El hapteno amplificado con LAMBDA se detectó luego secuencialmente utilizando una estrategia de amplificación similar que incluía tres aplicaciones del inhibidor de peróxido, la aplicación de un anticuerpo monoclonal anti-hapteno afín y la aplicación de un conjugado tiramina-cromóforo y peróxido. El hapteno que designa a KAPPA estaba detectando el uso de un reactivo de detección DAB (OptiView DAB, n.º ref. VMSI 760-700).

A continuación, los núcleos tisulares se tiñeron usando una solución de hematoxilina y un reactivo de azulado (VMSI, Hematoxilina II, n.º ref. 790-2208, Reactivo de azulado, n.º ref. 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron luego usando alcoholes de gradiente y se cubrieron con cubreobjetos.

Ejemplos de microfotografías de muestras de tejido tratadas de acuerdo con los procedimientos anteriores se muestran en las figuras 23(A-B), que son microfotografías de (A) una primera muestra de tejido de linfoma que muestra una tinción doble de ARNm KAPPA (marrón) y ARNm LAMBDA (púrpura, mínimamente observada) que muestra muy pocas células que expresan ARNm LAMBDA y (B) una segunda muestra de tejido de linfoma que muestra una tinción doble de ARNm KAPPA (marrón, mínimamente observado) y ARNm LAMBDA (púrpura) que muestra muy pocas células que expresan ARNm KAPPA. Las poblaciones casi monoclonales observadas son indicativas de un cáncer.

Las figuras 24(A-B) son microfotografías de un ensayo de ISH-ARNm KAPPA y LAMBDA (púrpura) de doble color (marrón) para un tejido. En la figura 24(A), la población de linfocitos B policlonales está teñida claramente con púrpura o marrón, indicando que las células están expresando ARNm de LAMBDA o KAPPA. La muestra exhibe altos niveles de expresión de ARNm tanto de KAPPA como de LAMBDA. La figura 24(B) muestra una parte de la muestra que exhibe una población celular monoclonal indicativa de cáncer. Los niveles elevados de expresión de ARNm de KAPPA y LAMBDA en la muestra, como un todo, resultarían confusos en un análisis molecular de la muestra, ya que la diferencia entre la expresión del ARNm de KAPPA y LAMBDA es mínima. Sin embargo, debido a que la expresión del ARNm de KAPPA y LAMBDA se visualiza a través de un análisis histopatológico, el enfoque de tinción doble descrito en el presente documento permite la detección de la población monoclonal.

La ISH-ARNm bicolor es técnicamente factible para la gran mayoría de las muestras como reemplazo o como complemento de los análisis de ISH e IHC existentes y aún no descubiertos. La diferenciación de muestras de linfoma clonal de procesos reactivos no clonales se potenció por el sistema de detección de dos colores. Además, se demostró la utilidad del ensayo para la detección sensible y la discriminación de dianas de ARNm de baja copia en diversos casos de linfoma. Colectivamente, estas observaciones indican que el enfoque es útil para la determinación de la clonalidad celular utilizando biomarcadores de ARNm expresados de manera única por una población específica.

Además, el uso de cromóforos y conjugados de tiramida permite una nueva clase de análisis cromogénico bicolor. Los conjugados son susceptibles de multiplexación debido a sus anchos de banda estrechos (por ejemplo, AMA). Los conjugados son estables como reactivos durante largos períodos de tiempo. Los conjugados se unen covalentemente al tejido en oposición a los sistemas cromógenos tradicionales que precipitan, por lo que los conjugados no resultan afectados adversamente por el proceso de tinción posterior o las etapas de tinción posteriores. La amplificación drástica de la diana permite la detección en campo claro y a concentraciones significativas del cromóforo localizado proximalmente a la diana. Estas altas concentraciones superan muchas preocupaciones asociadas con el blanqueo fotográfico, especialmente en comparación con las concentraciones apropiadas para la detección fluorescente. El uso de los nuevos cromóforos y conjugados de tiramida ha permitido una nueva e importante clase de metodologías analíticas: ISH-ARNm cromogénica.

Ejemplo 2

Los obstáculos a la utilidad del ensayo ARNm-ISH en muestras biológicas (por ejemplo, tejidos incluidos en parafina y fijados en formol, "tejidos IPFF") incluyen variación en la preparación de la muestra (por ejemplo, fijación tisular) que influye en la integridad / accesibilidad del ARNm de la muestra y en el rendimiento del ensayo. Un aspecto de la presente divulgación es que se han desarrollado ensayos de ISH-ARNm automatizados para muestras IPFF que permiten el análisis simultáneo de la expresión de biomarcadores y de una expresión génica de control interno para monitorizar el rendimiento del ensayo y la integridad de la muestra. De acuerdo con un ejemplo específico, los bloques clínicos de tejido IPFF de cáncer de mama se caracterizaron por el número de copias del gen HER2 y la expresión de la proteína Her2 usando ensayos INFORM HER2 Dual ISH e IHC (Ventana Medical Systems, Inc.), respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm de HER2 en relación con ACTB (β -actina) se determinaron usando qPCR de acuerdo con procedimientos conocidos. Los resultados de los análisis de copia de genes, expresión de proteínas y qPCR se compararon con los resultados obtenidos mediante la detección por ISH-ARNm de ARNm de HER2 y ACTB en muestras IPFF (figura 27). Se usaron condiciones de recuperación de tejido variadas para probar la utilidad de un estándar de ARNm interno para identificar muestras en las que la integridad del ARNm está comprometida.

Si bien la presente divulgación describe, en particular, procedimientos para analizar una muestra usando ARNm de HER2 y ACTB, los enfoques descritos en el presente documento son generales y aplicables a diversos biomarcadores útiles. La aplicación de la tecnología divulgada a sondas de estándar de ARNm y dianas adicionales está dentro del alcance de la presente divulgación.

En modos de realización ilustrativos, un procedimiento para analizar la expresión de una diana de ARNm y un estándar de ARNm interno en una muestra incluye poner en contacto la muestra con una sonda de diana de ARNm,

en la que la sonda de diana de ARNm se marca con un primer hapteno, poner en contacto la muestra con una sonda de estándar de ARNm interno, en la que la sonda de estándar de ARNm interno se marca con un segundo hapteno, poner en contacto la muestra con un primer conjugado de señalización, poner en contacto la muestra con un segundo conjugado de señalización, detectar una segunda señal del segundo conjugado de señalización, en la que la segunda señal proporciona la expresión del estándar de ARNm interno, y detectar una primera señal del primer conjugado de señalización, en la que la primera señal proporciona la expresión de la diana de ARNm. En un modo de realización, la detección de la segunda señal por debajo de un nivel de señal predeterminado indica que la muestra carece de idoneidad para el análisis de la diana de ARNm. En otro modo de realización, la detección de la primera señal incluye determinar la expresión del ARNm de forma semicuantitativa.

En modos de realización ilustrativos, poner en contacto la muestra con el primer conjugado de señalización incluye poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo anti-hapteno y conjugado enzimático, siendo el primer anticuerpo anti-hapteno y el conjugado enzimático específicos para el primer hapteno, poner en contacto la muestra con un tercer hapteno y conjugado de derivado de tiramida, poner en contacto la muestra con un tercer anticuerpo anti-hapteno y conjugado enzimático, siendo el tercer anticuerpo anti-hapteno y el conjugado enzimático específicos para el tercer hapteno, y poner en contacto la muestra con un primer cromógeno. En modos de realización ilustrativos adicionales, poner en contacto la muestra con el segundo conjugado de señalización incluye poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo anti-hapteno y conjugado enzimático, siendo el segundo anticuerpo anti-hapteno y conjugado enzimático específicos para el segundo hapteno, poner en contacto la muestra con un cuarto hapteno y conjugado de tiramida, poner en contacto la muestra con un cuarto anticuerpo anti-hapteno y conjugado enzimático, siendo el cuarto anticuerpo anti-hapteno específico para el cuarto hapteno, y poner en contacto la muestra con un segundo cromógeno. En un modo de realización, el primer cromógeno se selecciona del grupo que consiste en DAB, AEC, CN, BCIP/NBT, Fast Red, Fast Blue, fucsina, NBT y ALK GOLD. En otro modo de realización, el segundo cromógeno comprende un cromóforo y conjugado de tiramida. En un modo de realización, el segundo cromógeno se selecciona del grupo que consiste en DAB, AEC, CN, BCIP/NBT, Fast Red, Fast Blue, fucsina, NBT y ALK GOLD. En otro modo de realización más, el primer cromógeno comprende un cromóforo y conjugado de tiramida.

Preparación y formulación de la sonda: Las ribosondas HER2 y ACTB complementarias (antisentido) y no complementarias (sentido) se transcribieron *in vitro* a partir de plantillas de ADNds amplificadas por PCR que contenían el promotor T7. Los ácidos nucleicos se marcaron químicamente con diferentes haptenos (DIG, DNP) utilizando brazos conectores preparados conforme a las indicaciones del fabricante (Label IT® Technology, Mirus Bio LLC, Madison, WI) y NHS-PEG8-haptenos. Veinticinco nanogramos de cada sonda se suspendieron en un ml de un tampón de hibridación (RiboHybe™, n.º ref. VMSI 760-104) y se colocaron en un dispensador (n.º ref. VMSI 760-205) compatible con un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos (VMSI, Discovery XT, n.º ref. F-DISXT-750000).

Hibridaciones *in situ* de ARNm y detección: Las muestras se tiñeron usando reactivos de ISH-ARNm (RiboMap, n.º ref. VMSI 760-102). Las muestras clínicas de tejido de mama incluidas en parafina y fijadas en formol se montaron en portaobjetos (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser) y se desparafinaron y se recuperó el antígeno utilizando reactivos de acondicionamiento celular (Cell Conditioning 1, n.º ref. VMSI 950-124 y proteasa 3, n.º ref. VMSI 760-2020). Después de la recuperación, se dispuso en el portaobjetos una gota (100 µl) de un cóctel de sondas de cadena anti-sentido HER2 y ACTB marcadas con hapteno, se desnaturalizaron a 80 °C durante 8 min y se hibridaron a 65 °C durante 6 h. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron 3 veces usando un tampón de rigurosidad (0,1x SSC n.º ref. VMSI 950-110) a 75 °C durante 8 min para eliminar la sonda no específicamente hibridada.

Se utilizó un procedimiento de amplificación de dos niveles para amplificar la señal para cada uno de los eventos de unión. Los reactivos incluyeron (1) un anticuerpo anti-hapteno conjugado con HRP para catalizar la deposición de (2) un conjugado tiramida-hapteno que luego se unió mediante (3) un segundo anticuerpo anti-hapteno conjugado con HRP. La HRP se usó para catalizar la deposición de un cromóforo y un conjugado de tiramida para ACTB y DAB para HER2.

La actividad de la peroxidasa tisular endógena se inactivó dispensando una gota de un inhibidor (inhibidor de PO, n.º ref. VMSI 760-4143) e incubando la reacción durante 12 min. Después de varios lavados, se dispuso una gota de un segundo reactivo de bloqueo de amplificación (bloque TSA, n.º ref. VMSI 760-4142) en el portaobjetos y se incubó durante 4 min. A continuación, se dispuso una gota de solución de anticuerpo monoclonal anti-hapteno conjugado con HRP (conjugado de 2,5 µg/ml preparado en diluyente de avidina más bloqueador B5, n.º ref. VMSI 90040); la mezcla se incubó durante 28 min. La amplificación de haptenos mediada por tiramida se realizó dispensando una gota de conjugado tiramida-hapteno sobre el portaobjetos, seguido de una gota de una solución de peróxido de hidrógeno (TSA-H₂O₂, n.º ref. VMSI 760-4141) y permitiendo que la reacción se incubara durante 20 min.

El procedimiento se repitió para dirigir la amplificación mediada por tiramida del segundo hapteno en el cóctel de sondas. Los estudios de control demostraron que se prefería el uso de tres aplicaciones sucesivas del inhibidor de peróxido para inactivar el anticuerpo anti-hapteno conjugado con HRP previo. La omisión de la etapa de inactivación

5 dio como resultado la colocalización de señales y la presencia de señales de ARNm no específicas. El hapteno amplificado con ACTB se detectó luego secuencialmente utilizando una estrategia de amplificación similar que incluía tres aplicaciones del inhibidor de peróxido, la aplicación de un anticuerpo monoclonal anti-hapteno afín y la aplicación de un conjugado tiramina-cromóforo y peróxido. El hapteno que designa a HER2 estaba detectando el uso de un reactivo de detección DAB (OptiView DAB, n.º ref. VMSI 760-700).

10 A continuación, los núcleos tisulares se tiñeron usando una solución de hematoxilina y un reactivo de azulado (VMSI, Hematoxilina II, n.º ref. 790-2208, Reactivo de azulado, n.º ref. 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron luego usando alcoholes de gradiente y se cubrieron con cubreobjetos.

15 Ejemplos de microfotografías de muestras de tejido tratadas de acuerdo con los procedimientos anteriores se muestran en las figuras 25(A-B). La figura 25(A) muestra una microfotografía de (A) un análisis de ACTB realizado en una muestra de tejido fijada durante 4 horas y (B) una muestra de tejido fijada durante 24 horas. La primera muestra (figura 25(A)) incluye una débil tinción de ACTB que se clasificó como carente de integridad de la muestra debido a las condiciones de fijación inadecuadas. La segunda muestra (figura 25(B)) incluye una fuerte tinción de ACTB y se clasificó como adecuada para la evaluación de HER2 (las figuras 25(A-B) incluyen solo un único color). Las figuras 26(A-C) muestran ejemplos de muestras clínicas de tejido que presentan tinción por ISH-ARNm bicolor de ARNm de ACTB y (A) tinción por ISH-ARNm de HER2 negativa (0+), (B) tinción por ISH-ARNm de HER2 positiva (1/2+), y (C) tinción por ISH-ARNm de HER2 positiva (3+). La figura 28 muestra datos de 20 bloques de tejido que incluyen los resultados del análisis por ISH de HER2 (ensayo VENTANA INFORM HER2 Dual ISH, VMSI), análisis por IHC de HER2 (PATHWAY HER-2/neu, OptiView DAB, VMSI) y análisis por ISH bicolor de ARNm de HER2.

25 Se descubrió que las señales de ARNm de ACTB estaban influenciadas por el tratamiento de prehibridación del ensayo y, por lo tanto, eran útiles para la evaluación del rendimiento del ensayo y la determinación de las condiciones de ensayo apropiadas. Las señales de ISH-ARNm de HER2 se correlacionan predominantemente con el número de copias y la expresión de proteínas en muestras con un número de copias y niveles de proteína concordantes; en muestras discordantes (número normal de copias con expresión de proteínas aumentada o número de copias aumentado con escasa expresión de proteínas detectable), las señales de ISH-ARNm de HER2 fueron en gran medida elevadas. De forma colectiva, estas observaciones sugieren que el ensayo de ISH-ARNm puede servir como un ensayo complementario para esclarecer las muestras que albergan niveles de proteína y número de copias del gen HER2 discordantes. Además, estos estudios demuestran la utilidad de una plataforma de ensayo de campo claro accesible para la expresión génica que conserva el contexto celular en tejidos IPFF.

35 De lo anterior y los datos incluidos en la figura 4 se extrajeron las siguientes conclusiones. La ISH-ARNm bicolor es técnicamente factible para la gran mayoría de las muestras como reemplazo o como complemento de los análisis de ISH e IHC existentes y aún no descubiertos. La inclusión de un control interno de ACTB, o un control interno similar, permite la identificación de tejidos no adecuados para análisis y/o con fracaso del ensayo. En consecuencia, la presente divulgación describe nuevos enfoques para disminuir las tasas de falsos negativos debidos a la falta de idoneidad de la muestra o al fracaso del ensayo. Las señales de ISH-ARNm de HER2 se pueden clasificar en tres patrones de expresión en gran medida concordantes con los niveles de proteína Her2 convencionales establecidos. Donde ISH-ADN e IHC de HER2 son discordantes en un 10 % y un 5 % de las muestras, respectivamente. Los análisis de expresión génica (qPCR y ISH-ARNm) se correlacionan con el número de copia de ADN o con los niveles de proteína en muestras discordantes. El ensayo de ISH-ARNm de HER2/ACTB de campo claro bicolor puede servir como prueba complementaria para esclarecer muestras discordantes.

45 Además, el uso de cromóforos y conjugados de tiramida permite una nueva clase de análisis cromogénico bicolor. Los conjugados son susceptibles de multiplexación debido a sus anchos de banda estrechos (por ejemplo, AMA). Los conjugados son estables como reactivos durante largos períodos de tiempo. Los conjugados se unen covalentemente al tejido en oposición a los sistemas cromógenos tradicionales que precipitan, por lo que los conjugados no resultan afectados adversamente por el proceso de tinción posterior o las etapas de tinción posteriores. La amplificación drástica de la diana permite la detección en campo claro y a concentraciones significativas del cromóforo localizado proximalmente a la diana. Estas altas concentraciones superan muchas preocupaciones asociadas con el blanqueo fotográfico, especialmente en comparación con las concentraciones apropiadas para la detección fluorescente. El uso de los nuevos cromóforos y conjugados de tiramida ha permitido una nueva e importante clase de metodologías analíticas: ISH-ARNm cromogénica.

Ejemplo 3

60 Las sondas de ISH de ADN de PTEN marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de rodamina-tiramida (concentración final de 12,5 µM) fue catalizada por la adición de H₂O₂ (porcentaje final de un 0,003 %). Las figuras 28(A-B) muestran los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar una sonda de ISH de ADN de PTEN en células tumorales de xenoinjerto de VCAP. La figura 28(A) es una imagen tomada a 40 aumentos, y la figura 28(B) es una imagen de un área separada del tejido tomada a 63 aumentos.

Ejemplo 4

Las sondas de ISH de ADN de ERH5' marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de rodamina-tiramida (concentración final de 12,5 μ M) fue catalizada por la adición de H₂O₂ (porcentaje final de un 0,003 %).

Además, un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda se utiliza para catalizar la deposición de tiramida-BF (concentración final de 6,25 μ M) mediante la adición de H₂O₂. El conjugado de amplificación unido covalentemente en el tejido sirvió como sitios de unión para anticuerpos monoclonales anti-BF conjugados con HRP (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición del conjugado de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μ M) y H₂O₂.

La figura 29 muestra los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar una sonda de ISH de ADN de ERG5' en células tumorales de xenoinjerto de MCF7.

Ejemplo 5

Las sondas de ISH de ADN de ERG3' marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de Dabsyl-tiramida (concentración final de 12,5 μ M) fue catalizada por la adición de H₂O₂ (porcentaje final de un 0,003 %).

Además, un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda se utiliza para catalizar la deposición del conjugado de amplificación (concentración final de 6,25 μ M) mediante la adición de H₂O₂. El conjugado de amplificación unido covalentemente en el tejido sirvió como sitios de unión para anticuerpos monoclonales anti-NP conjugados con HRP (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición del conjugado de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μ M) y H₂O₂.

La figura 30 ilustra los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar una sonda de ISH de ADN de ERG3' en células de tumor de xenoinjerto de MCF7.

Ejemplo 6

Las sondas de ISH de ADN de ERG3' y ERG5' marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de conjugados rodamina-tiramida y Dabsyl-tiramida (concentración final de 12,5 μ M) fue catalizada por la adición de H₂O₂ (porcentaje final de un 0,003 %).

Además, un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda se utiliza para catalizar la deposición del conjugado de amplificación (concentración final de 6,25 μ M) mediante la adición de H₂O₂. El conjugado de amplificación unido covalentemente en el tejido sirvió como sitios de unión para anticuerpos monoclonales anti-BF y anti-NP conjugados con HRP (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición de los conjugados de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μ M) y H₂O₂.

La figura 31 muestra los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar sondas de ISH de ADN de ERG3' y ERG5' en células tumorales de xenoinjerto de MCF7. Las señales de la sonda roja se generan a partir de la detección combinada de la señal de ERG5'-rodamina y la señal de ERG3'-Dabsyl.

Ejemplo 7

Este modo de realización se refiere a la detección de un reordenamiento del gen ERG en células de carcinoma de próstata usando conjugados de señalización múltiples.

Las sondas de ISH de ADN de ERG3' y ERG5' marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de conjugados rodamina-tiramida y Dabsyl-tiramida (concentración final de 12,5 μ M) fue catalizada por la adición de H₂O₂ (porcentaje final de un 0,003 %).

Además, un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda se utiliza para catalizar la deposición del conjugado de amplificación (concentración final de 6,25 μM) mediante la adición de H_2O_2 . El conjugado de amplificación unido covalentemente en el tejido sirvió como sitios de unión para anticuerpos monoclonales anti-BF y anti-NP conjugados con HRP (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición de los conjugados de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μM) y H_2O_2 .

La figura 32 muestra los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar sondas de ISH de ADN de ERG3' y ERG5' en células tumorales de xenoinjerto de VCAP. Las señales de la sonda individuales y fusionadas se indican con flechas: la señal fusionada de ERG5'-rodamina y ERG3'-Dabsyl (señal roja en la flecha) que se divide en una señal púrpura separada de ERG5'-rodamina (en la punta de la flecha) y una señal amarilla separada de ERG3'-Dabsyl (en la flecha de bloque gruesa).

50 Ejemplo 8

Este modo de realización se refiere a la detección de un reordenamiento del gen ALK en células de carcinoma CARPUS usando conjugados de señalización múltiples.

Las sondas de ISH de ADN de Alk3' y Alk5' marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de conjugados rodamina-tiramida y Dabsyl-tiramida (concentración final de 12,5 μM) fue catalizada por la adición de H_2O_2 (porcentaje final de un 0,003 %).

Además, un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda se utiliza para catalizar la deposición del conjugado de amplificación (concentración final de 6,25 μM) mediante la adición de H_2O_2 . El conjugado de amplificación unido covalentemente en el tejido sirvió como sitios de unión para anticuerpos monoclonales anti-BF y anti-NP conjugados con HRP (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición de los conjugados de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μM) y H_2O_2 .

La figura 33 ilustra los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar las sondas de ISH de ADN tanto de Alk3' como de Alk5' en un sedimento celular CARPUS. Las señales de la sonda en dos células con reordenamiento del gen ALK se han indicado con flechas; la señal fusionada de Alk5'-rodamina y Alk3'-Dabsyl (señal roja en la flecha) que se divide en una señal púrpura separada de Alk5'-rodamina (en la punta de la flecha) y una señal amarilla separada de Alk3'-Dabsyl (en la flecha de bloque gruesa).

50 Ejemplo 9

Este modo de realización se refiere a la detección de un reordenamiento del gen ALK en tejido de cáncer de pulmón humano usando conjugados de señalización múltiples.

Las sondas de ISH de ADN de Alk3' y Alk5' marcadas con DNP o DIG (concentración final de 0,25 ng/ml) se hibridaron durante una a tres horas en un tampón que contenía formamida, seguido de lavado riguroso en 2x SSC. La detección de la sonda estuvo mediada por un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG (concentración final de 2,5 ng/ml) que se había conjugado con peroxidasa de rábano picante. La deposición de conjugados rodamina-tiramida y Dabsyl-tiramida (concentración final de 12,5 μM) fue catalizada por la adición de H_2O_2 (porcentaje final de un 0,003 %).

Además, un anticuerpo monoclonal anti-DNP o anti-DIG conjugado con HRP unido a la sonda se utiliza para catalizar la deposición del conjugado de amplificación (concentración final de 6,25 μM) mediante la adición de H_2O_2 . El conjugado de amplificación unido covalentemente en el tejido sirvió como sitios de unión para anticuerpos monoclonales anti-BF y anti-NP conjugados con HRP (concentración final de 2,5 ng/ml) y la deposición de los conjugados de señalización se catalizó mediante la adición del conjugado de señalización (concentración final de 25 μM) y H_2O_2 .

La figura 34 ilustra los resultados obtenidos del uso de este modo de realización para detectar las sondas de ISH de ADN tanto de Alk3' como de Alk5' en una sección de 4 micrómetros de adenocarcinoma de pulmón. El área dentro del cuadro indica una célula tumoral en la que se ha producido un reordenamiento de una copia del gen ALK, separando la señal combinada Alk5'-rodamina y Alk3'-Dabsyl (señal roja en la flecha) en una señal púrpura separada de Alk5'-rodamina (en la punta de la flecha) y una señal amarilla separada de Alk3'-Dabsyl (en la flecha de bloque gruesa).

50 Ejemplo 10

5 Este modo de realización se refiere a la detección de dianas de ARN 18S usando dos colores diferentes de
conjugados de señalización simultáneamente para crear un tercer color. Las figuras 35(A-C) son microfotografías
que ilustran la detección directa de dianas génicas en células Calu-3 usando un ensayo de ISH de ARNm. La figura
35(A) muestra la detección de la diana de ARN 18S usando un conjugado rodamina-tiramida. La figura 35(B)
muestra la detección de la diana de ARN 18S usando deposición directa de un conjugado DABSYL-tiramida. La
figura 35(C) ilustra una detección tanto con el conjugado DABSYL-tiramida como con el conjugado Rod-tiramida. La
señal observada en la figura 35(A) aparece púrpura, la señal de la figura 35(B) aparece en naranja, y la señal de la
figura 35(C) aparece en rojo. La figura 36 es una microfotografía que ilustra la detección directa de proteínas HER2 y
10 P53 en células Calu-3 usando un ensayo de IHC multiplexado. HER2 se detecta por deposición directa del
conjugado DABSYL-tiramida. P53 se detecta por deposición directa del conjugado Rodamina-tiramida. Mientras que
los dos conjugados de señalización mostrados en las figuras 35(A-B) se pueden usar juntos para generar un tercer
color de combinación, estos dos cromógenos también se pueden usar en un formato multiplexado en el que cada
15 color se puede asignar a una diana en particular.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una primera diana en una muestra biológica, que comprende:

5 poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda de detección que comprende un fragmento de oligonucleótido o un anticuerpo de una especie particular capaz de unirse específicamente a la primera diana, en la que el fragmento de oligonucleótido incluye un hapteno;

10 poner en contacto la muestra biológica con un primer conjugado de marcaje que incluye un anticuerpo antiespecie o antihapteno acoplado a una primera enzima, en el que la primera enzima es una oxidoreductasa o peroxidasa, y en el que el primer conjugado de marcaje, mediante su inclusión de un anticuerpo antiespecie o antihapteno, se une selectivamente a la primera sonda de detección;

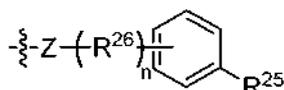
15 poner en contacto la muestra biológica con un primer conjugado de señalización que comprende un primer resto reactivo latente y un primer resto cromógeno;

iluminar la muestra biológica con una fuente de luz espectralmente estrecha que tiene una emisión espectral con una anchura a media altura (AMA) de entre 30 nm y 250 nm; y

20 detectar la primera diana detectando una primera señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta, estando asociada la primera señal coloreada asociada con una absorbancia espectral con el primer resto cromógeno del primer conjugado de señalización;

25 en la que la primera enzima cataliza la conversión del primer resto reactivo latente en un primer resto reactivo, que se une covalentemente a la muestra biológica proximalmente a o directamente sobre la primera diana al reaccionar con un residuo de tirosina de la muestra biológica, el primer conjugado de marcaje, la primera sonda de detección o combinaciones de los mismos;

30 en el que el primer resto reactivo latente tiene la fórmula general



35 en la que R^{25} se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, éter, amina y amina sustituida; R^{26} se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, $-OR_m$, $-NR_m$ y $-SR_m$, en la que m es 1-20; n es 1-20; Z se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y NR^a en la que R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, arilo, y alquilarilo; y en el que la absorbancia espectral asociada con el primer resto cromógeno del primer conjugado de señalización tiene una anchura a media altura (AMA) de entre 30 nm y 250 nm.

40 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer resto reactivo latente es tiramina.

45 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el hapteno se selecciona del grupo que consiste en un hapteno de oxazol, hapteno de pirazol, hapteno de tiazol, hapteno de nitroarilo, hapteno de benzofurano, hapteno de triterpeno, hapteno de urea, hapteno de tiourea, hapteno de rotenoide, hapteno de cumarina, hapteno de ciclolignano, hapteno de dinitrofenilo, hapteno de biotina, hapteno de digoxigenina, hapteno de fluoresceína y hapteno de rodamina.

50 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la absorbancia de la luz por el conjugado de señalización incluye una absorbancia de al menos un 5 % de luz incidente o al menos un 20 % de luz incidente.

55 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la absorbancia espectral asociada con el primer resto cromógeno del primer compuesto de señalización tiene una anchura a media altura (AMA) de entre 30 nm y 150 nm o entre 30 nm y 100 nm

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la detección comprende usar un microscopio de campo claro o un escáner digital equivalente.

60 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que iluminar la muestra biológica con luz comprende iluminar la muestra biológica con una fuente de luz espectralmente estrecha que tiene una emisión espectral con una anchura a media altura (AMA) de entre 30 nm y 150 nm o entre 30 nm y 100 nm.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una fuente de luz LED o con una fuente de luz filtrada.

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:

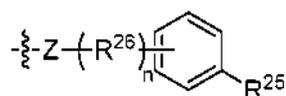
poner en contacto la muestra biológica con un inhibidor enzimático;

poner en contacto la muestra biológica con una segunda sonda de detección que comprende un fragmento de oligonucleótido o un anticuerpo de una especie particular capaz de unirse específicamente a una segunda diana, en la que el fragmento de oligonucleótido incluye un hapteno;

poner en contacto la muestra biológica con un segundo conjugado de marcaje que incluye un anticuerpo antiespecie o antihapteno acoplado a una segunda enzima, en el que la segunda enzima es una oxidoreductasa o peroxidasa, y en el que el segundo conjugado de marcaje, mediante su inclusión de un anticuerpo antiespecie o antihapteno, se une selectivamente a la segunda sonda de detección;

poner en contacto la muestra biológica con un segundo conjugado de señalización que comprende un segundo resto reactivo latente y un segundo resto cromógeno, en el que la segunda enzima cataliza la conversión del segundo resto reactivo latente en un segundo resto reactivo, que se une covalentemente a la muestra biológica proximalmente a o directamente sobre la segunda diana al reaccionar con un residuo de tirosina de la muestra biológica, el segundo conjugado de marcaje, la segunda sonda de detección o combinaciones de los mismos;

en el que el segundo resto reactivo latente tiene la fórmula general



en la que R^{25} se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, éter, amina y amina sustituida; R^{26} se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, $-OR_m$, $-NR_m$ y $-SR_m$, en la que m es 1-20; n es 1-20; Z se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y NR^a en la que R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, arilo, y alquilarilo; y en el que la absorbancia espectral asociada con el segundo resto cromógeno del segundo conjugado de señalización tiene una anchura a media altura (AMA) de entre 30 nm y 250 nm.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el segundo resto reactivo latente es tiramina.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que la primera enzima y la segunda enzima son las mismas.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende además detectar una tercera, cuarta, quinta o sexta diana, en el que la detección de la tercera, cuarta, quinta o sexta diana comprende:

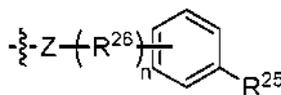
poner en contacto la muestra biológica con un total de tres a seis sondas de detección que comprenden un fragmento de oligonucleótido o un anticuerpo de una especie particular capaz de unirse específicamente a la tercera, cuarta, quinta o sexta diana, en la que el fragmento de oligonucleótido incluye un hapteno;

poner en contacto la muestra biológica con un total de tres a seis conjugados de marcado, en el que cada uno de los tres a seis conjugados de marcado incluye un anticuerpo antiespecie o antihapteno acoplado a una enzima, en el que la enzima es una oxidoreductasa o peroxidasa, y en el que cada uno de los tres a seis conjugados de marcaje, mediante su inclusión de un anticuerpo antiespecie o antihapteno, se une selectivamente a una de las tres a seis sondas de detección;

poner en contacto la muestra biológica con un total de tres a seis conjugados de señalización, en el que cada uno de los tres a seis conjugados de señalización comprende un resto reactivo latente y un resto cromógeno, en el que las enzimas de los tres a seis conjugados de marcaje catalizan la conversión de los tres a seis restos reactivos latentes en tres a seis restos reactivos que se unen covalentemente a la muestra biológica proximalmente a o directamente sobre la tercera, cuarta, quinta o sexta diana, respectivamente, al reaccionar con un residuo de tirosina de la muestra biológica, el conjugado de marcaje, la sonda de detección o combinaciones de los mismos;

poner en contacto la muestra biológica con un inhibidor enzimático antes de poner en contacto la muestra biológica con uno de los tres a seis conjugados de señalización;

en el que los tres a seis restos reactivos latentes tienen la fórmula general



5 en la que R^{25} se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, éter, amina y amina sustituida; R^{26} se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, $-OR_m$, $-NR_m$ y $-SR_m$, en la que m es 1-20; n es 1-20; Z se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y NR^a en la que R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo; y

10 en el que la detección de las tres a seis dianas incluye detectar la absorbancia de la luz por los tres a seis conjugados de señalización detectando un total de tres a seis señales coloreadas seleccionadas entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta, el total de tres a seis señales coloreadas asociadas con absorbancias espectrales asociadas con el total de tres a seis restos cromógenos de los tres a seis conjugados de señalización, en el que las absorbancias espectrales de los tres a seis restos cromógenos son distintas entre sí y tienen una AMA de entre 30 nm y 250 nm.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los tres a seis restos reactivos latentes son tiramina.

14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la primera diana y la segunda diana son ácidos nucleicos genéticos, en el que

25 detectar la segunda diana a través de la absorbancia de la luz por el segundo conjugado de señalización comprende detectar una segunda señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta, estando asociada la segunda señal coloreada asociada con la absorbancia espectral con el segundo resto cromógeno del segundo conjugado de señalización; y

30 detectar una superposición en proximidad a través de la absorbancia de la luz por el primer conjugado de señalización que se superpone en proximidad con el segundo conjugado de señalización, de modo que se genera una tercera señal coloreada asociada con la absorbancia espectral superpuesta de la primera absorbancia espectral y la segunda absorbancia espectral.

15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la tercera señal coloreada señala un ordenamiento genético normal y la primera y la segunda señal coloreada indican un reordenamiento o translocación genética.

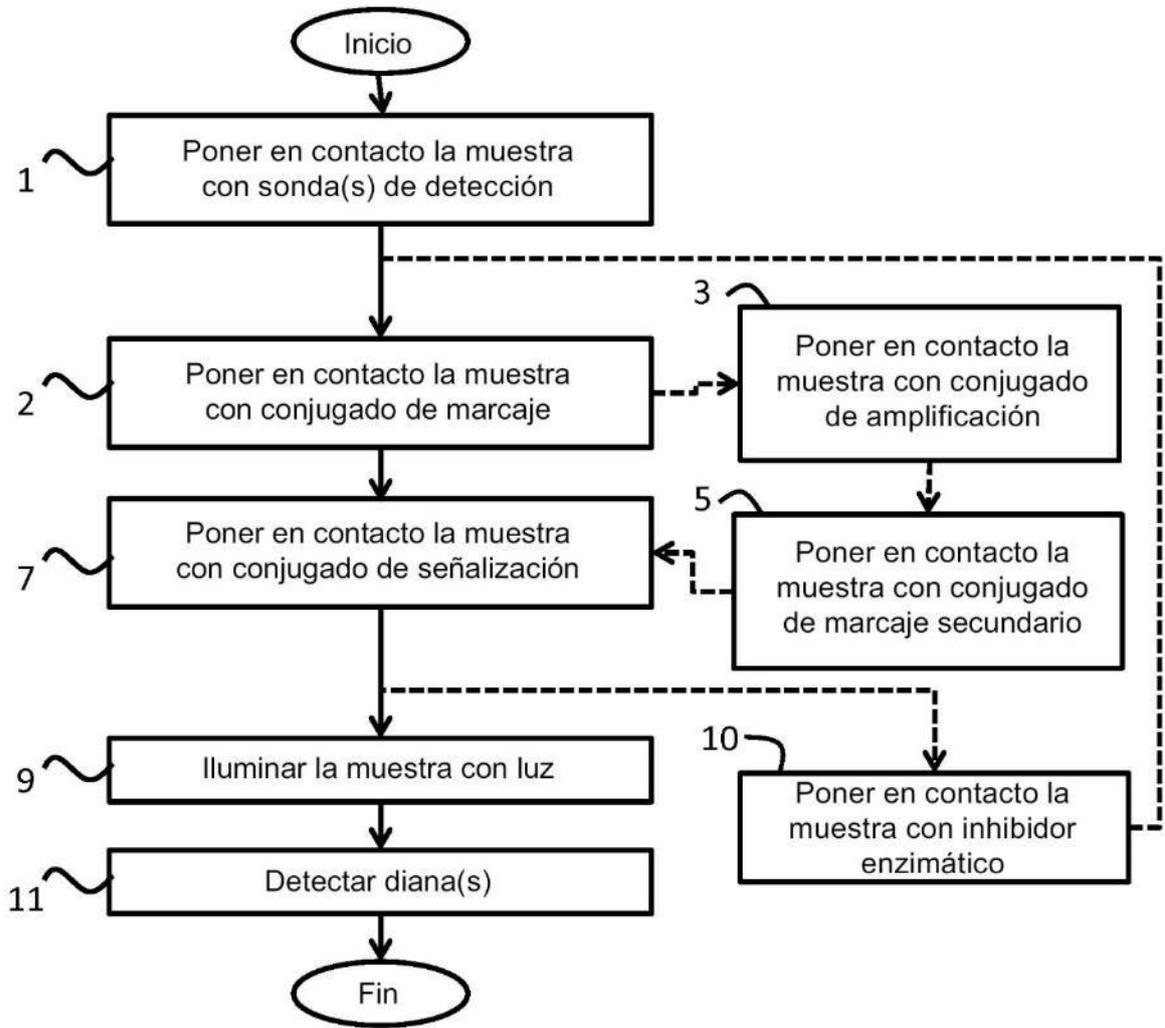


FIG. 1

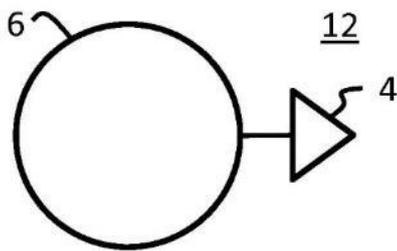


FIG. 2(A)

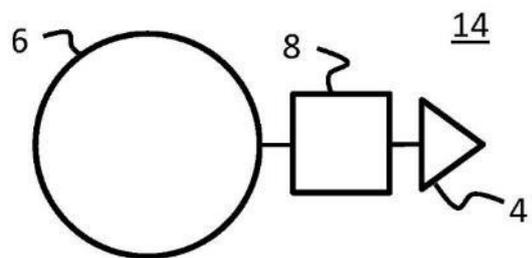


FIG. 2(B)



FIG. 3(A)



FIG. 3(B)

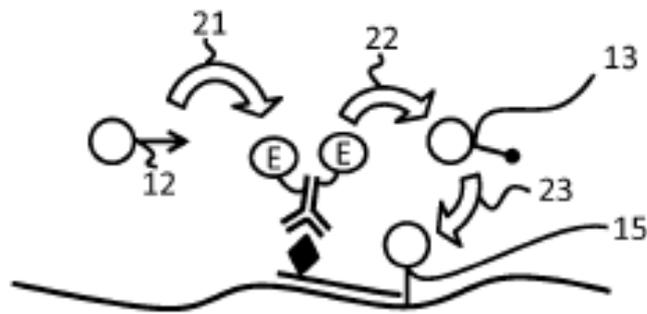


FIG. 3(C)

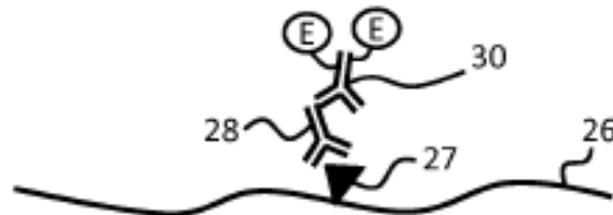


FIG. 3(D)

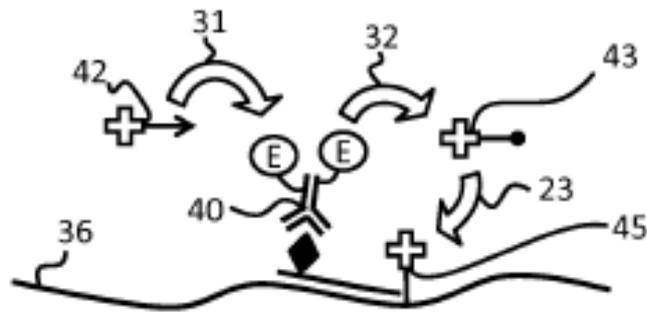


FIG. 3(E)

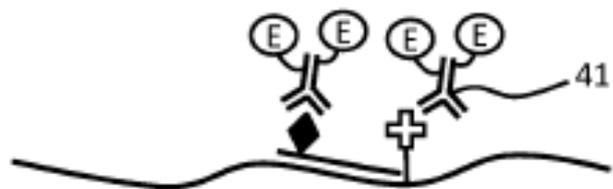


FIG. 3(F)

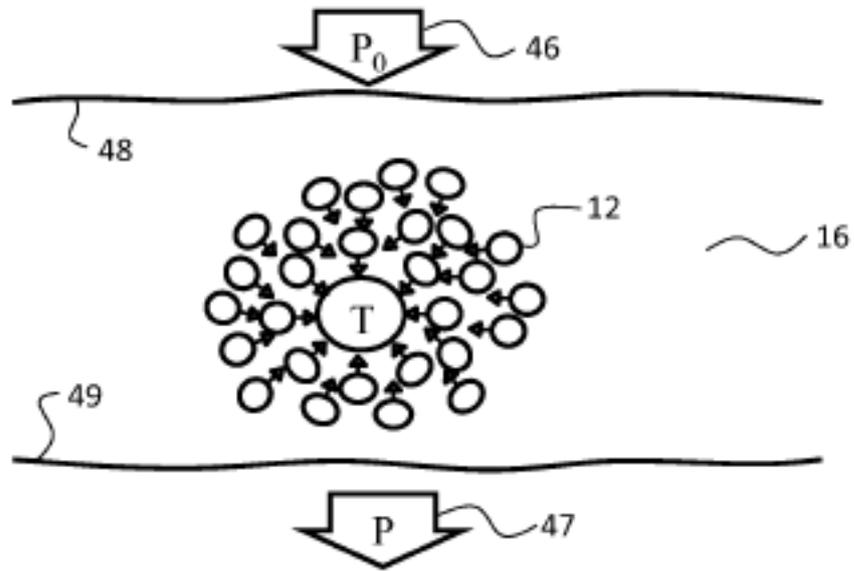


FIG. 4(A)

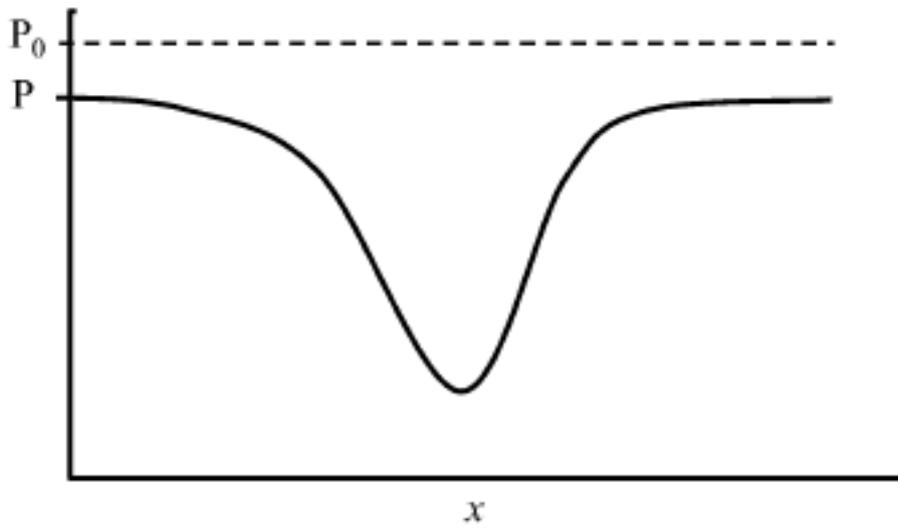


FIG. 4(B)

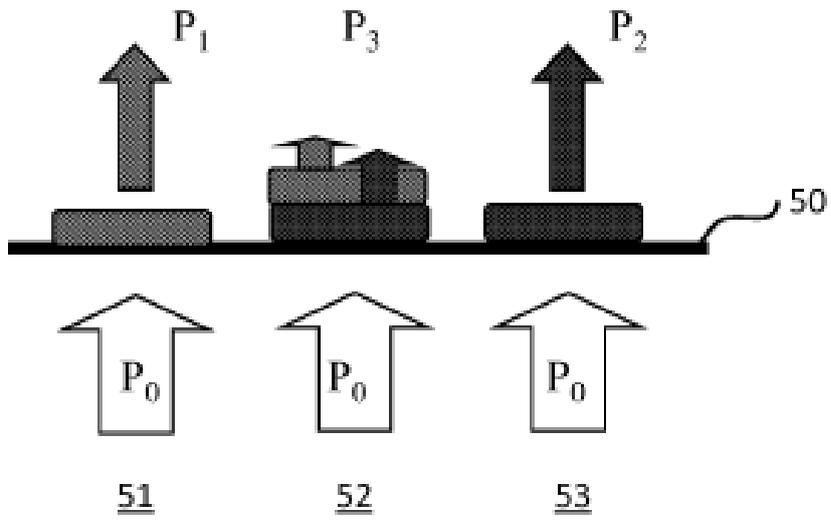


FIG. 5(A)

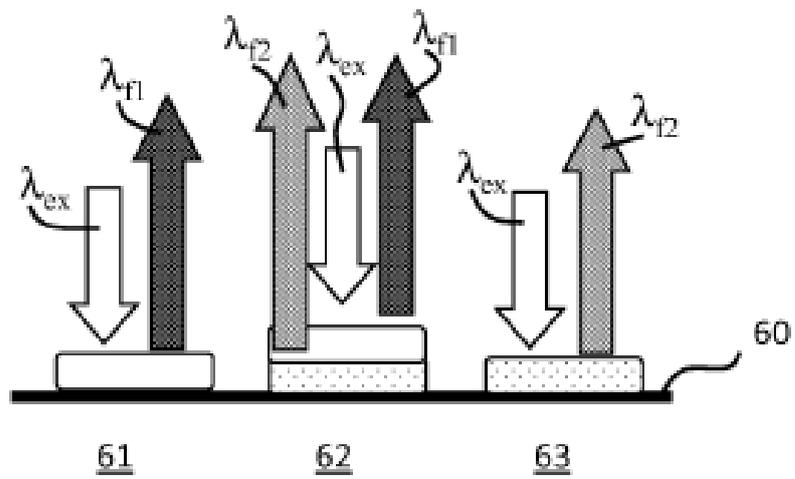


FIG. 5(B)

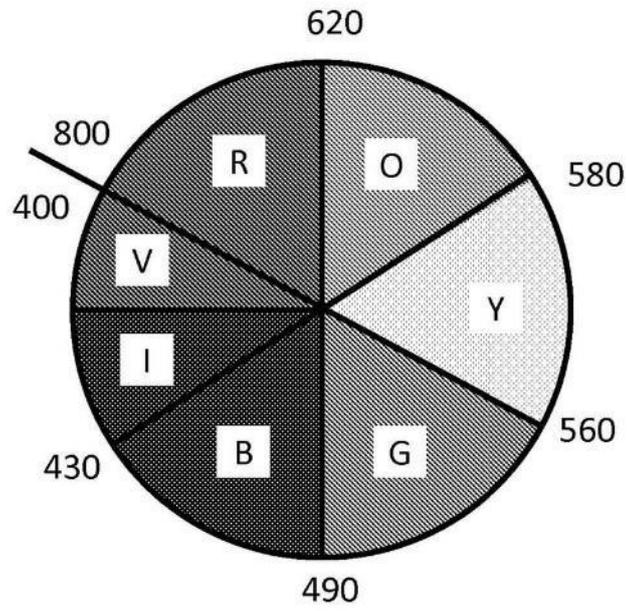


FIG. 6(A)

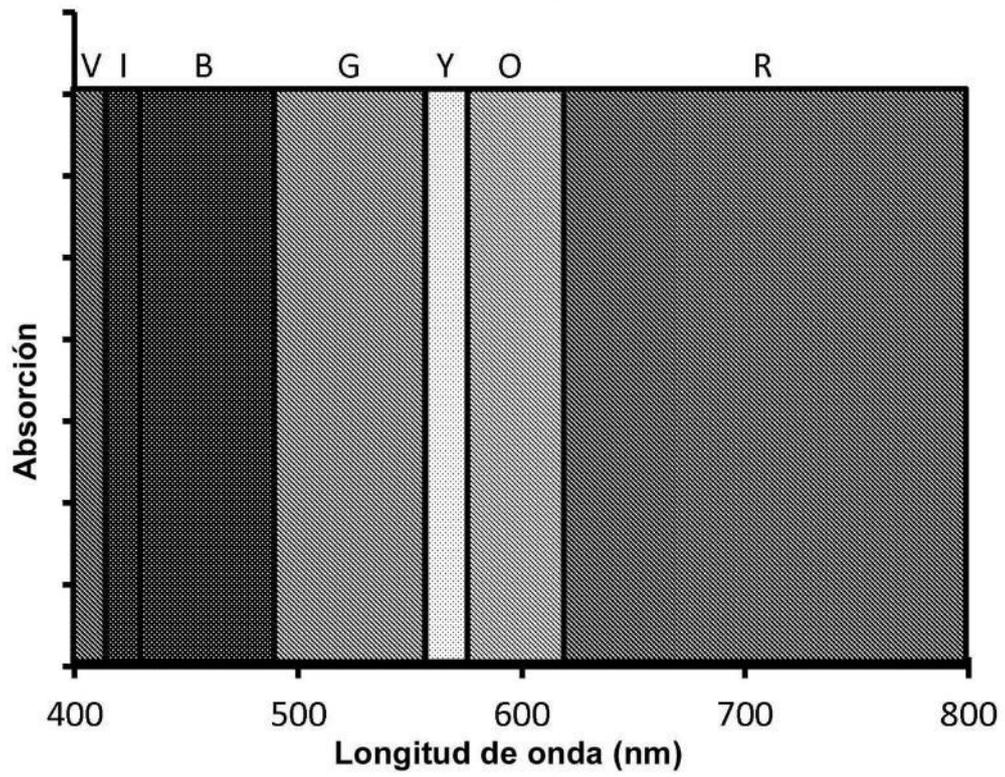
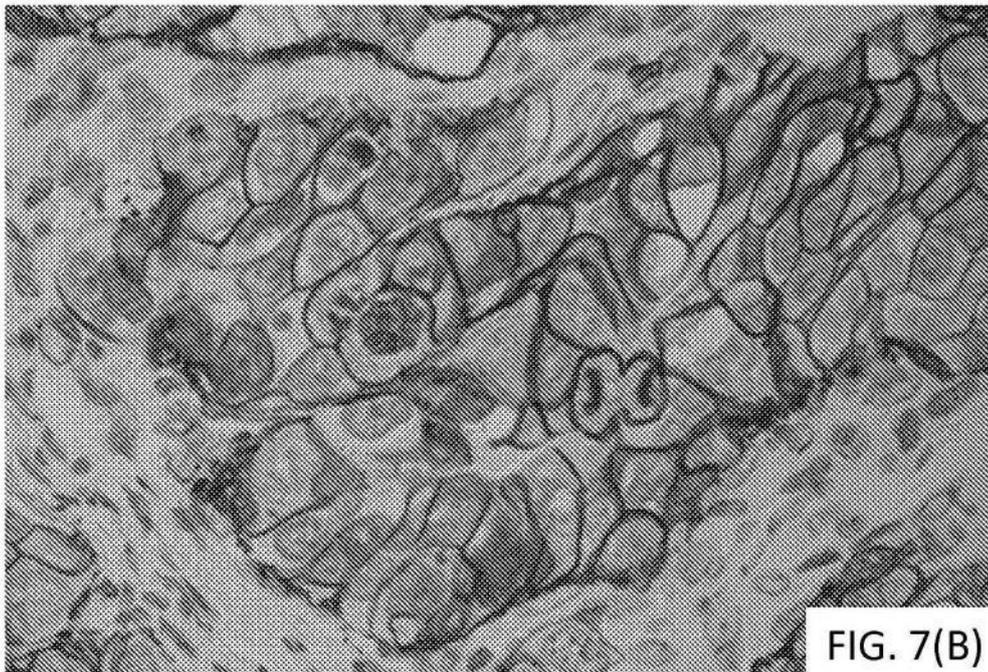
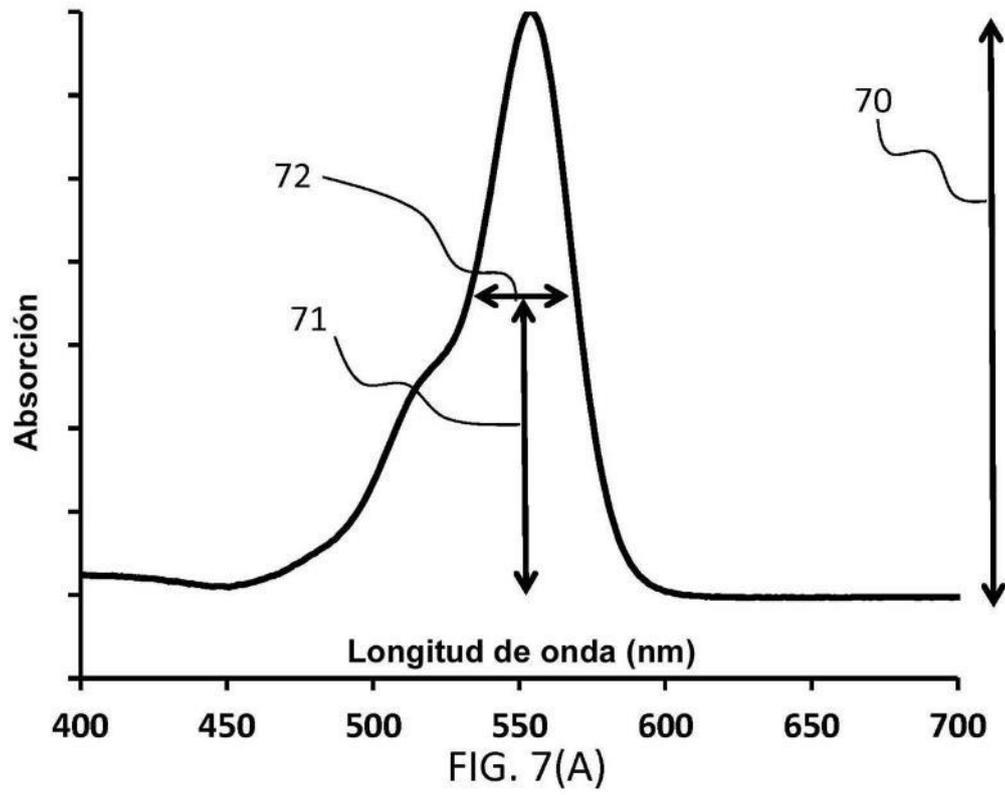
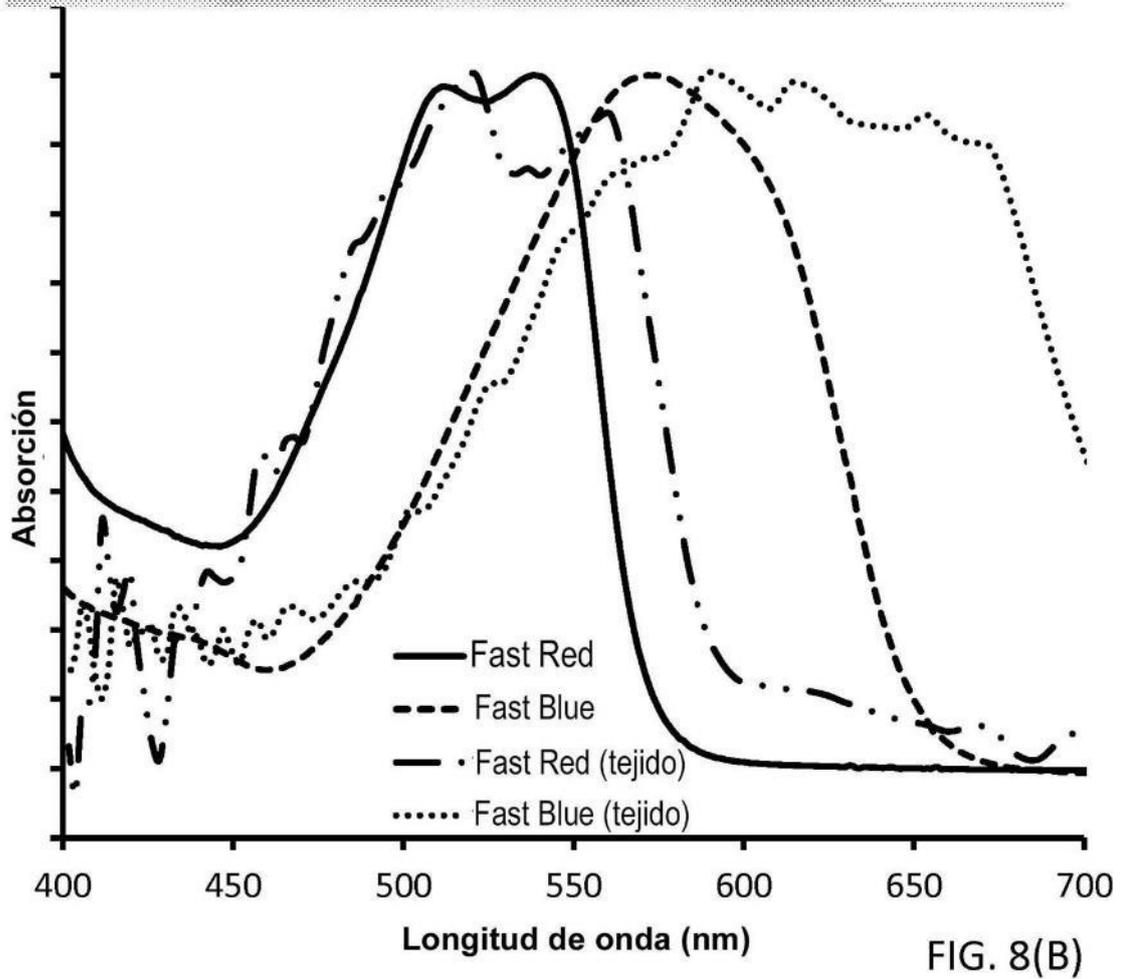
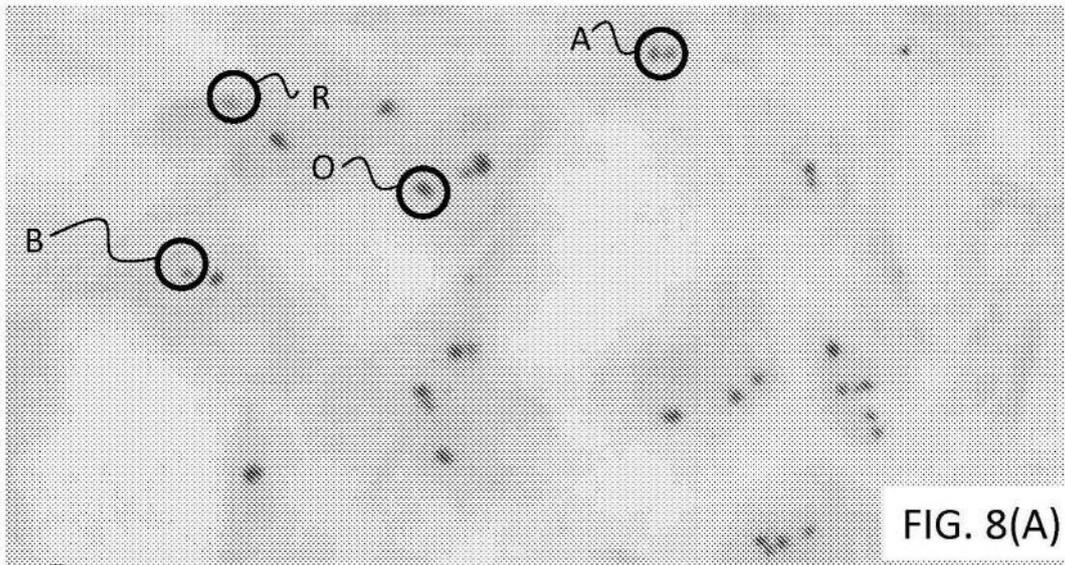


FIG. 6(B)





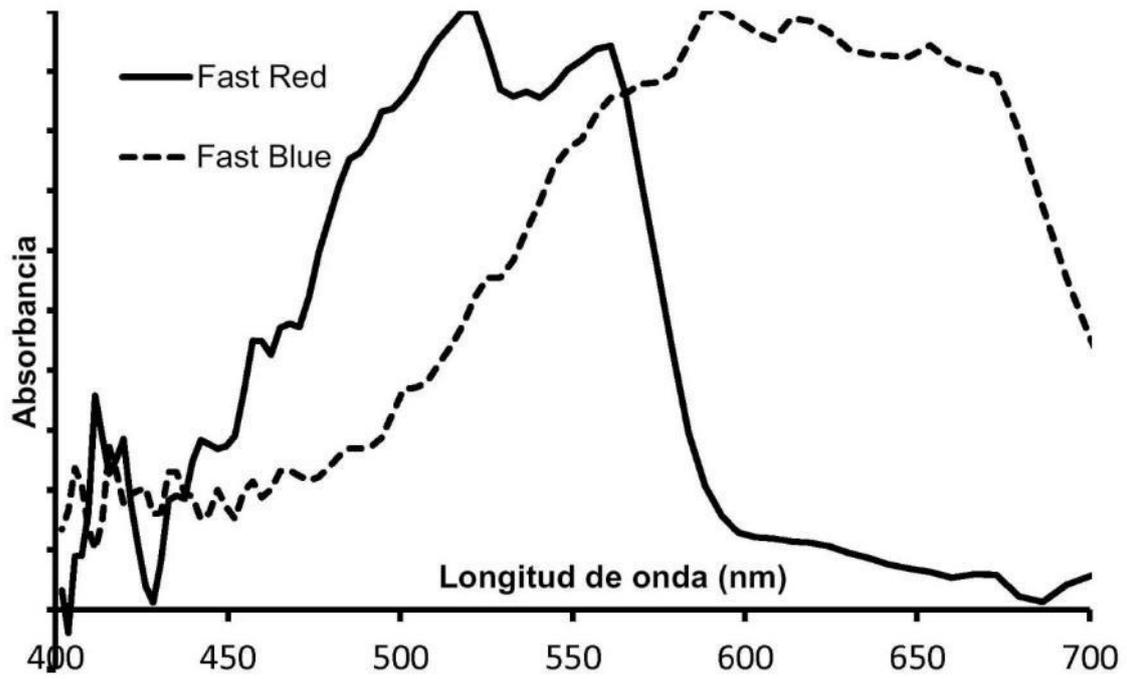


FIG. 9(A)

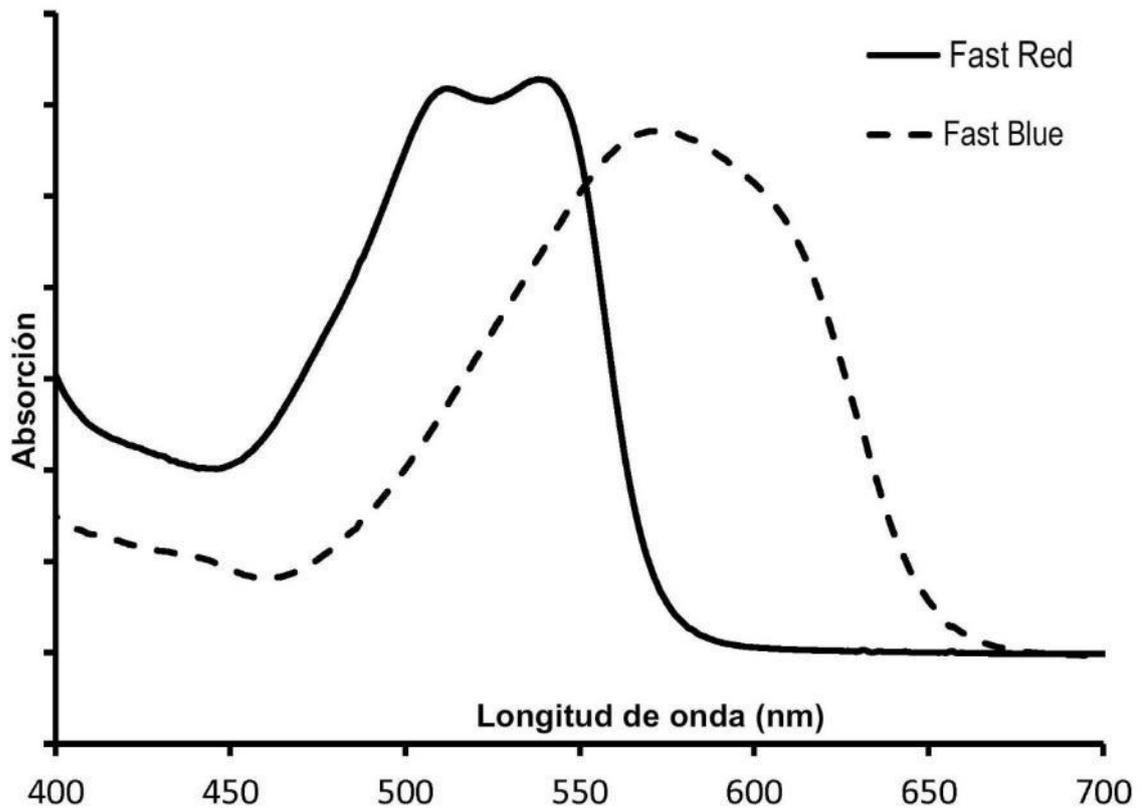


FIG. 9(B)

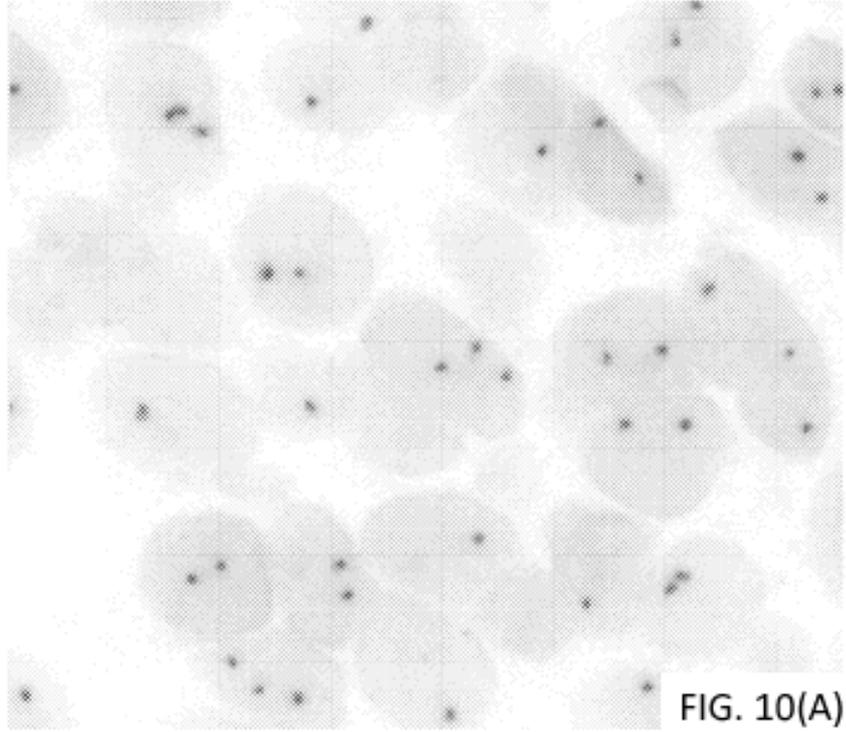


FIG. 10(A)

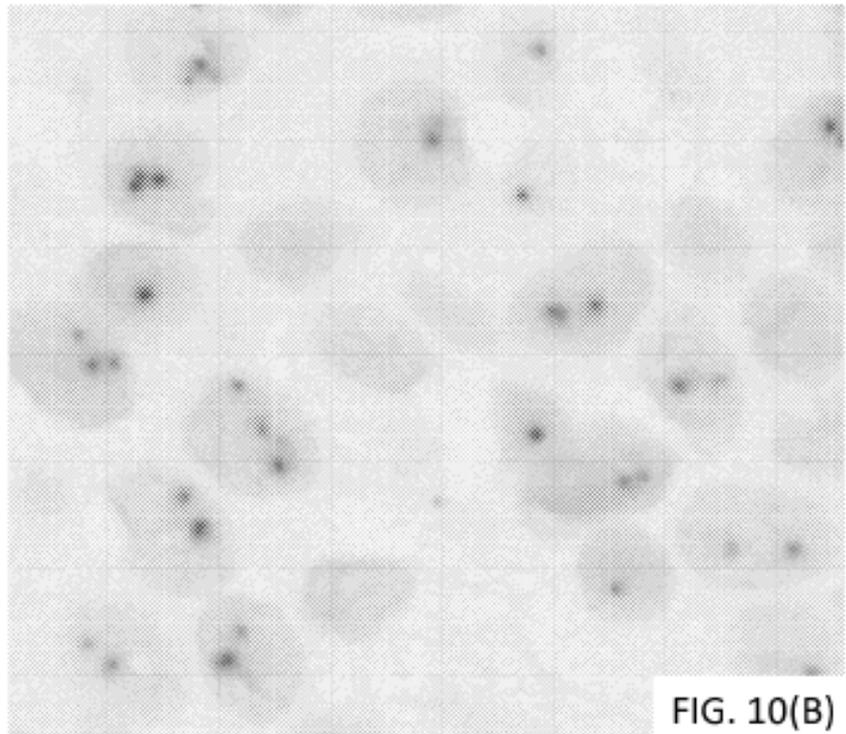


FIG. 10(B)

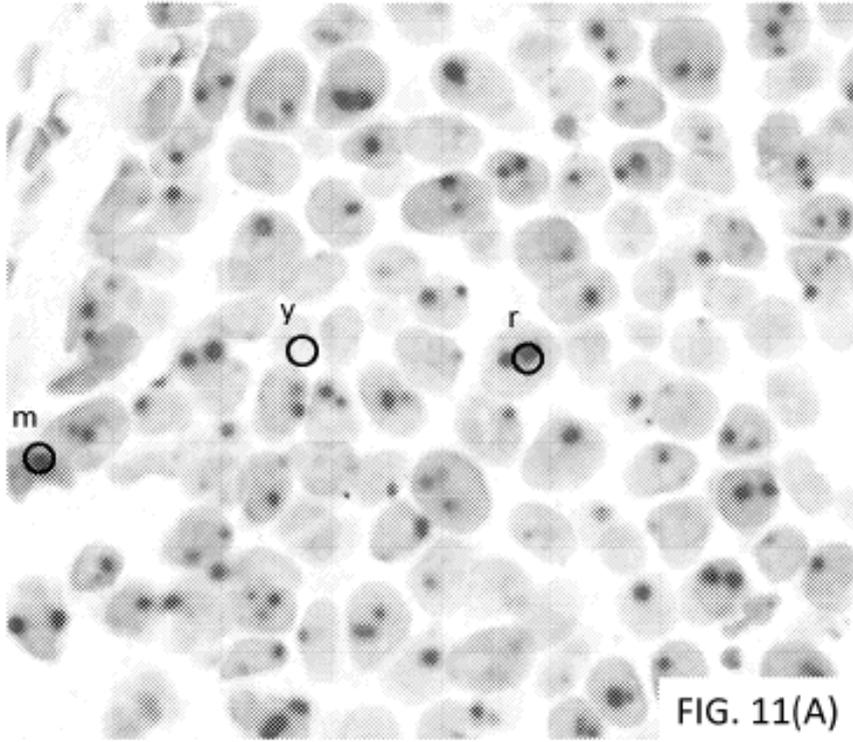


FIG. 11(A)

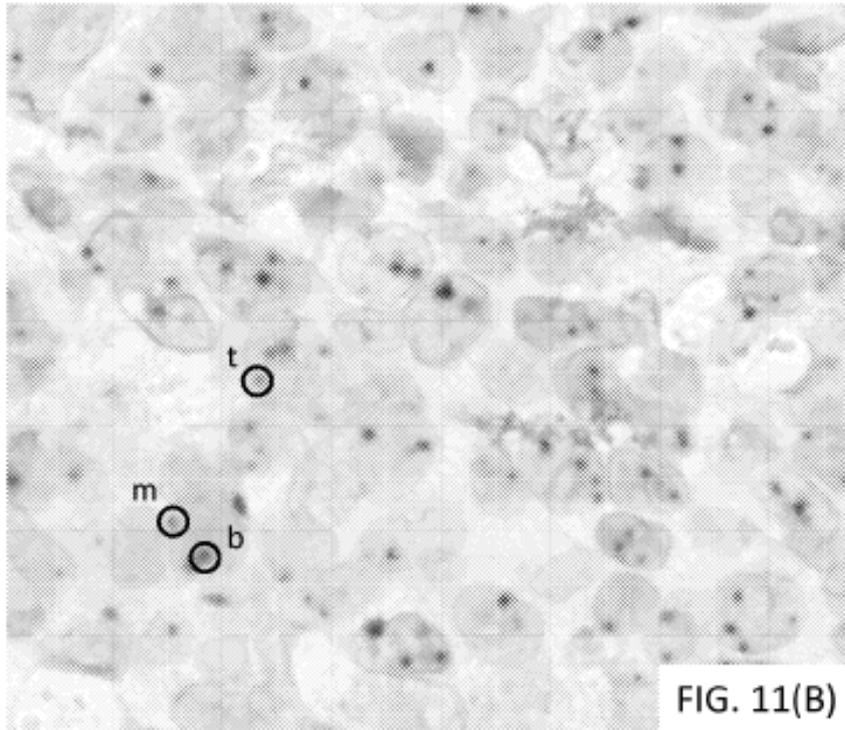


FIG. 11(B)

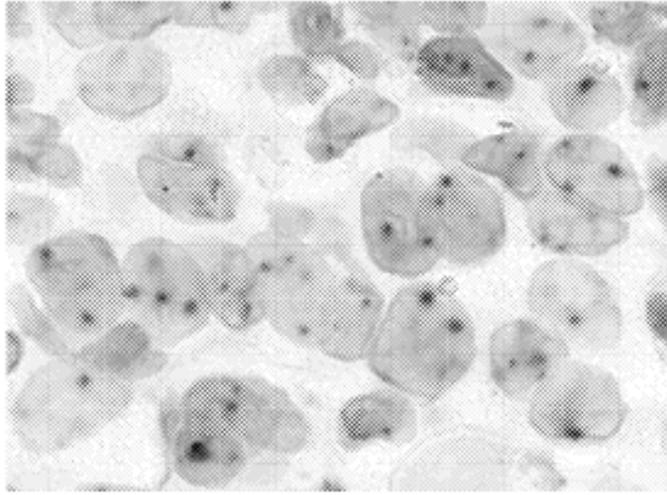


FIG. 12(A)

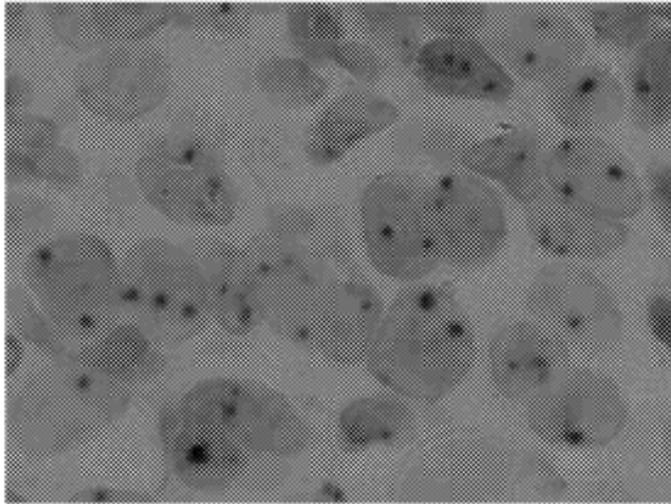


FIG. 12(B)

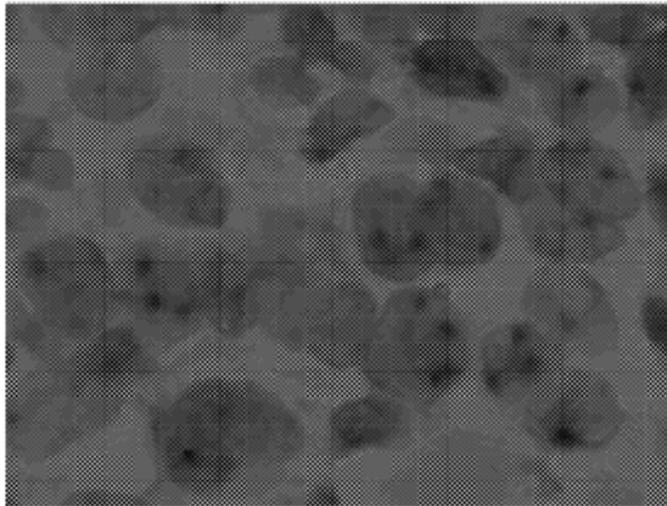


FIG. 12(C)

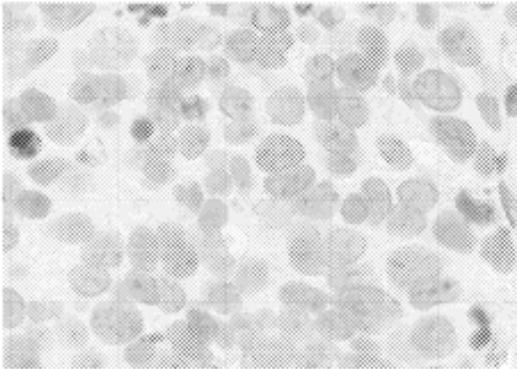


FIG. 13(A)

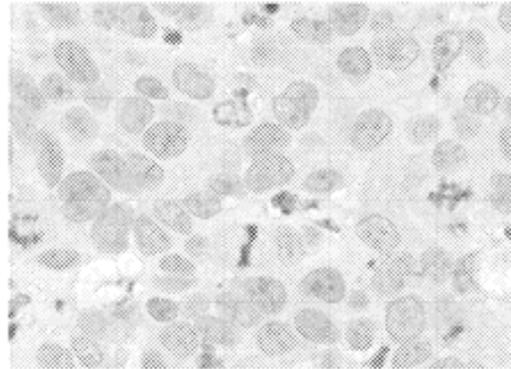


FIG. 13(B)

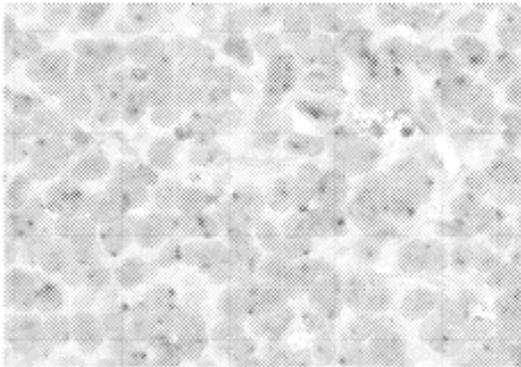


FIG. 14(A)

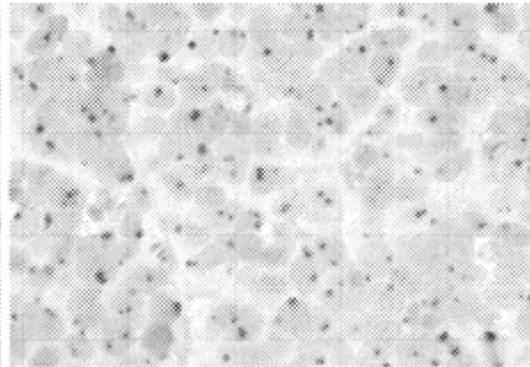


FIG. 14(B)

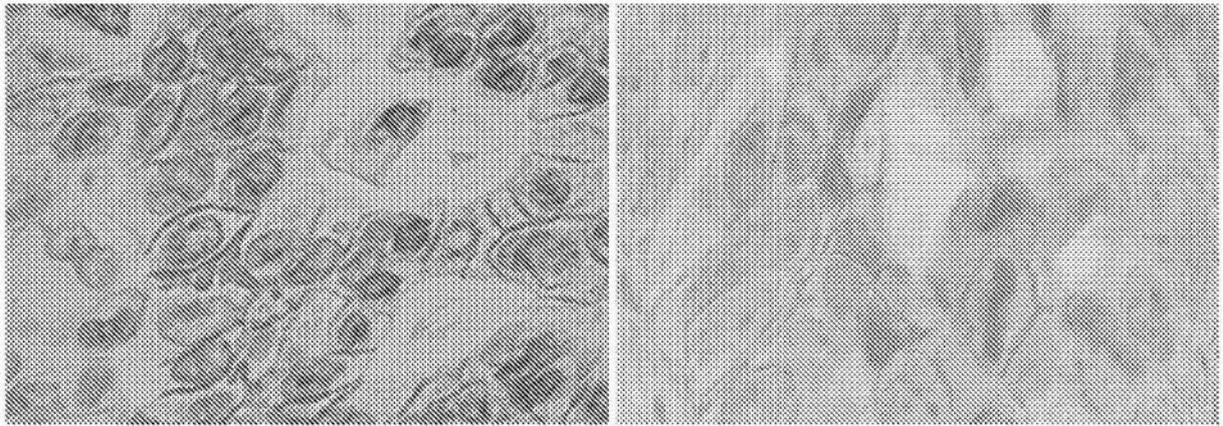


FIG. 15(A)

FIG. 15(B)

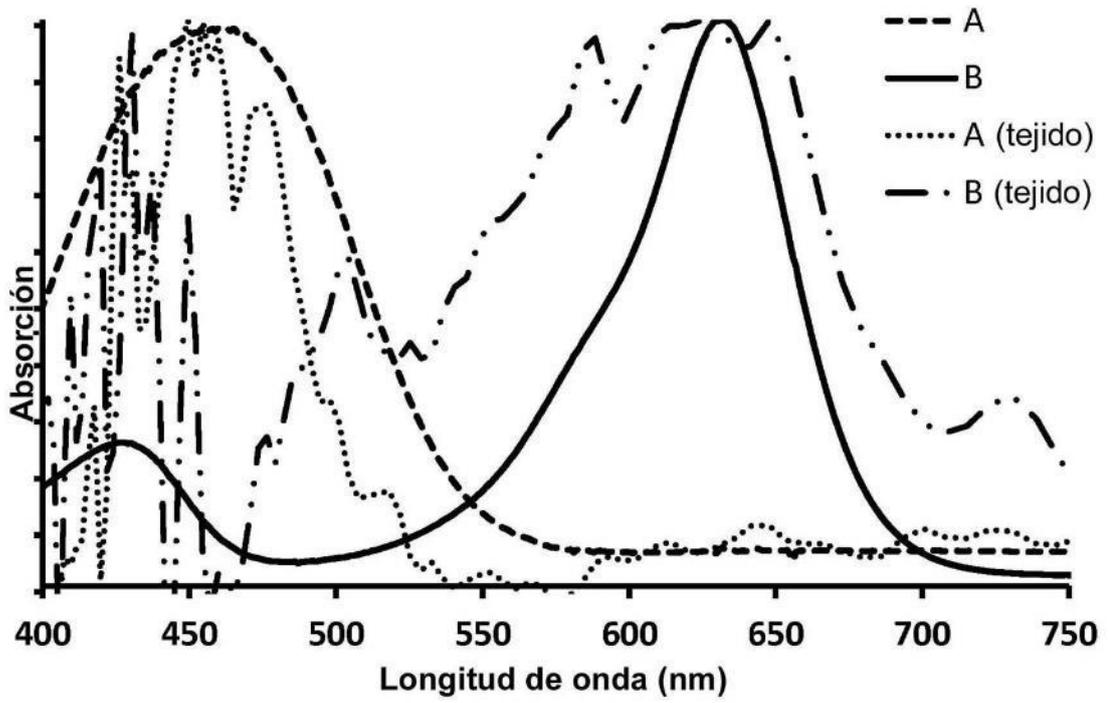
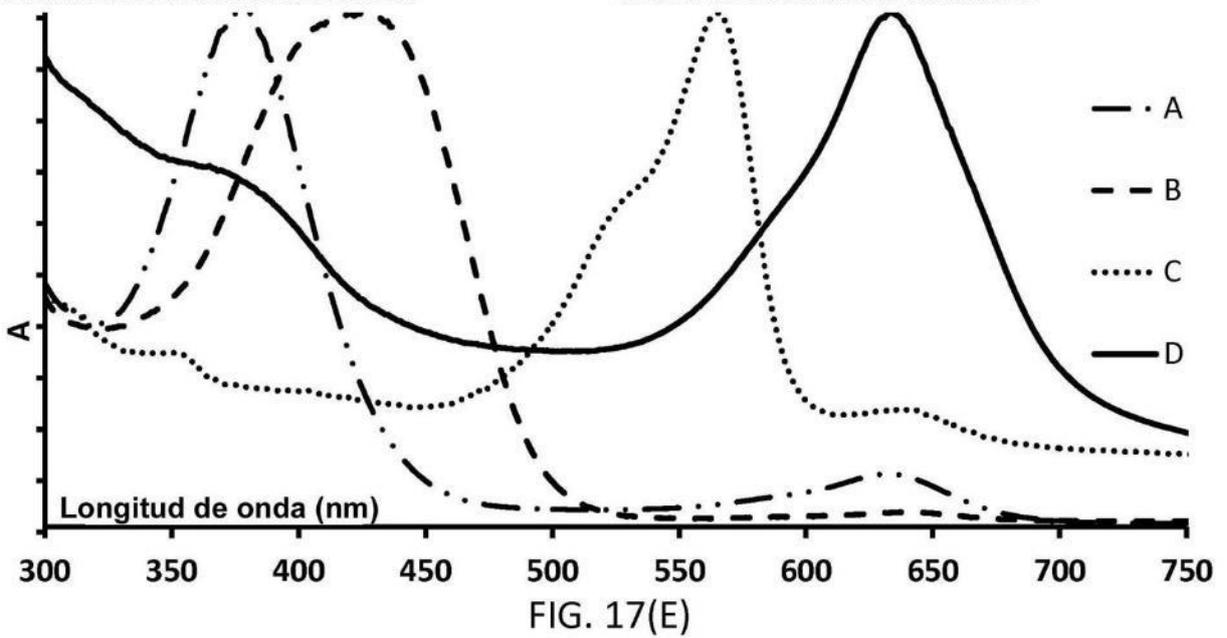
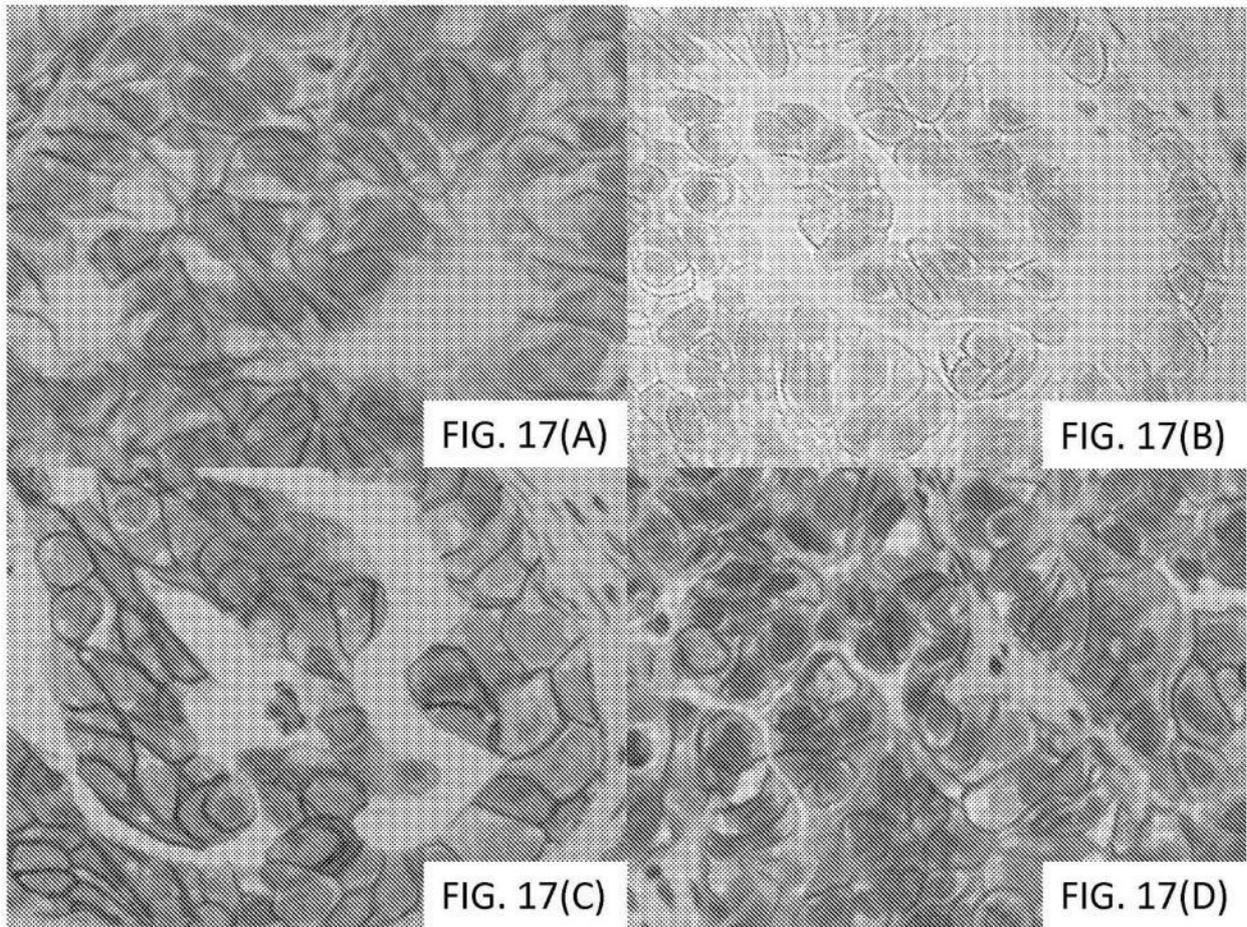
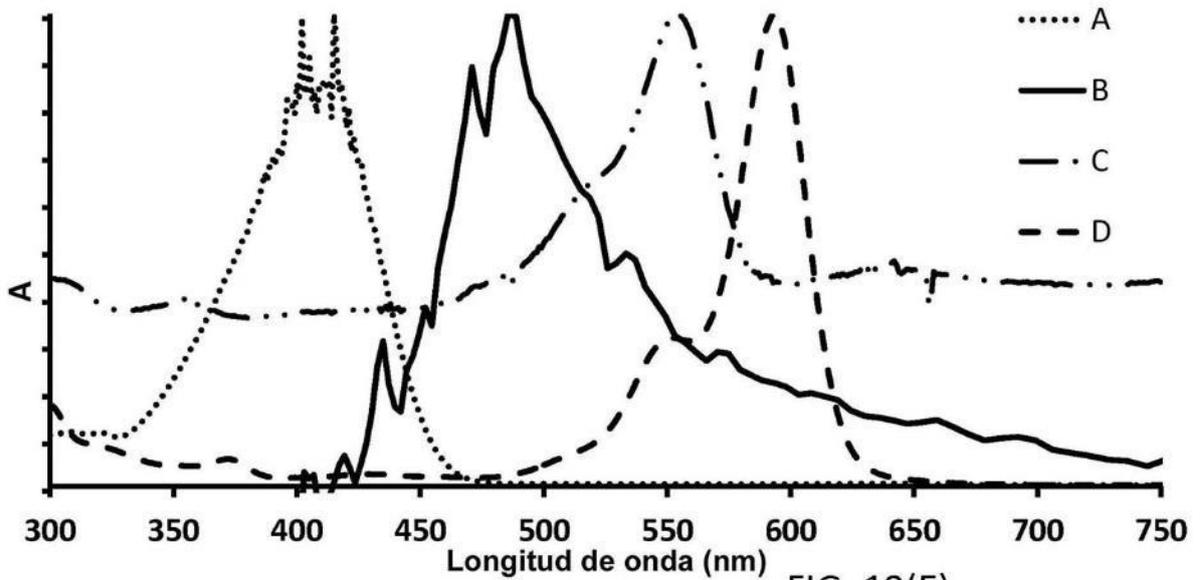
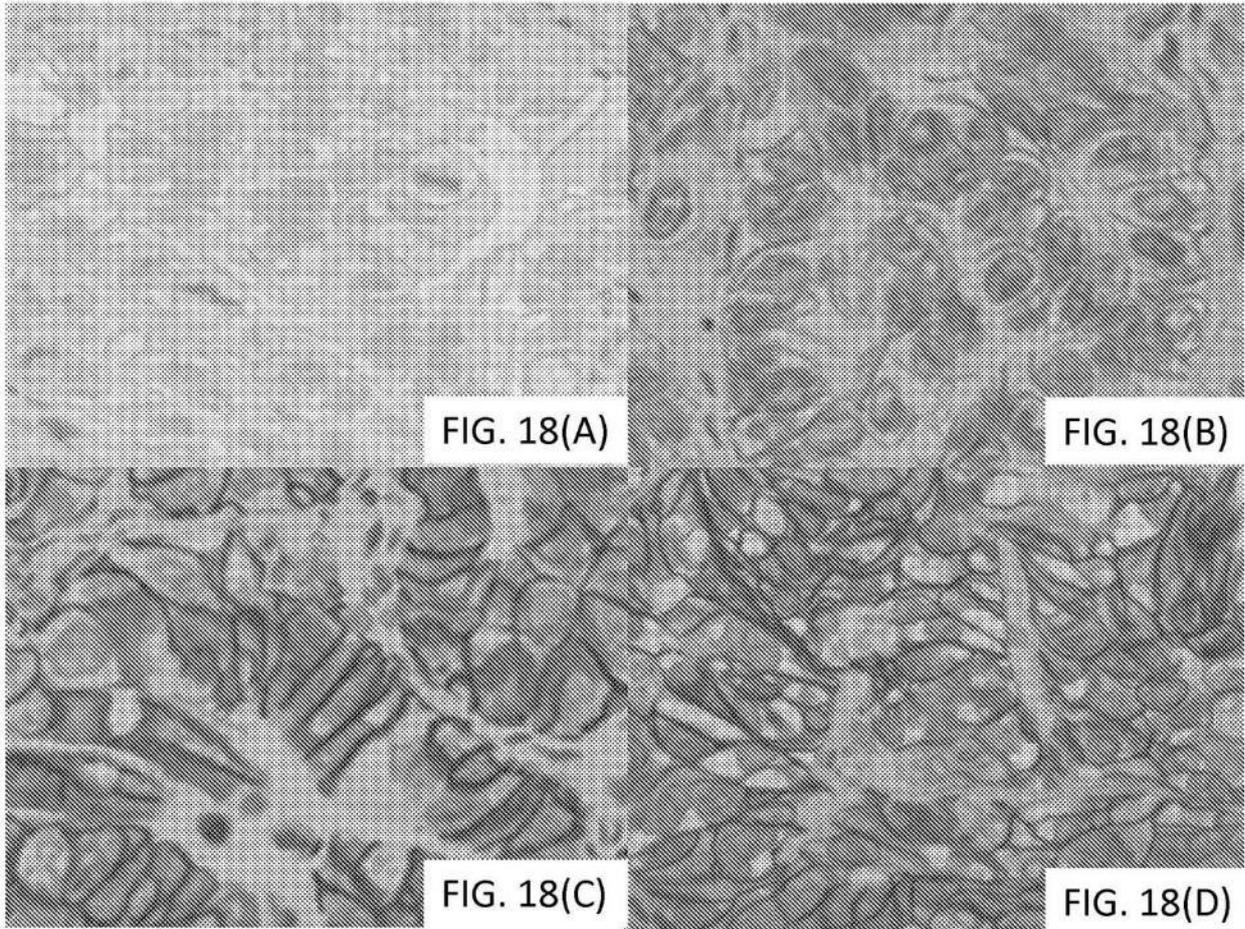
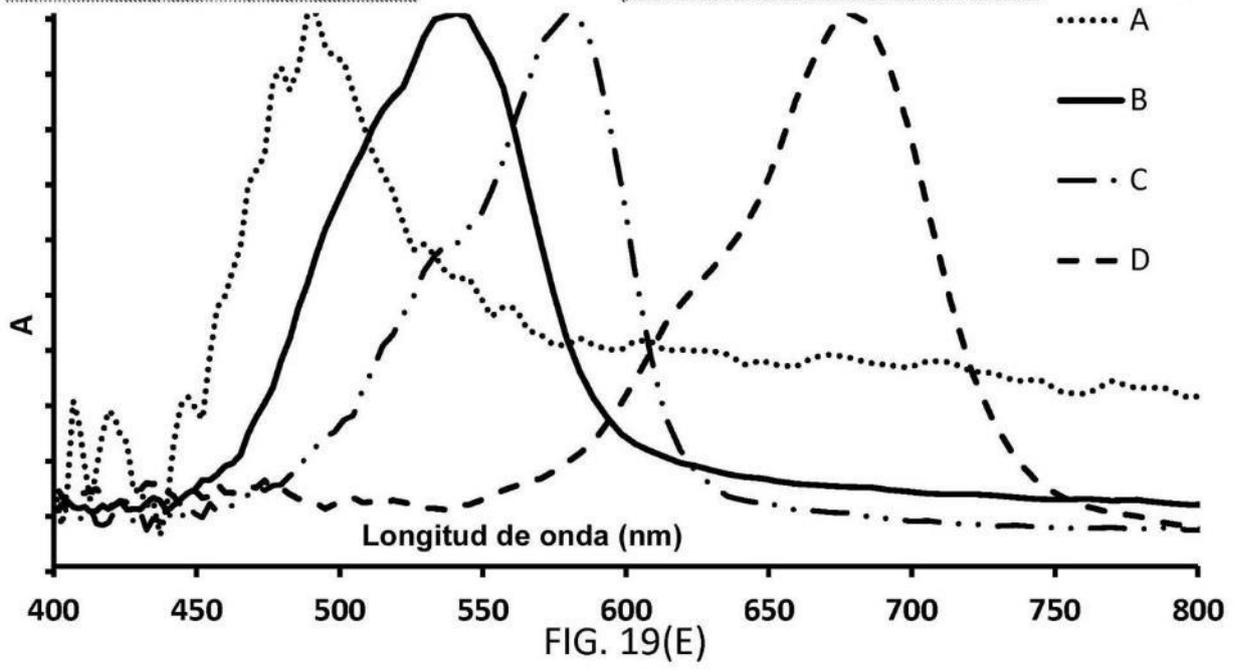
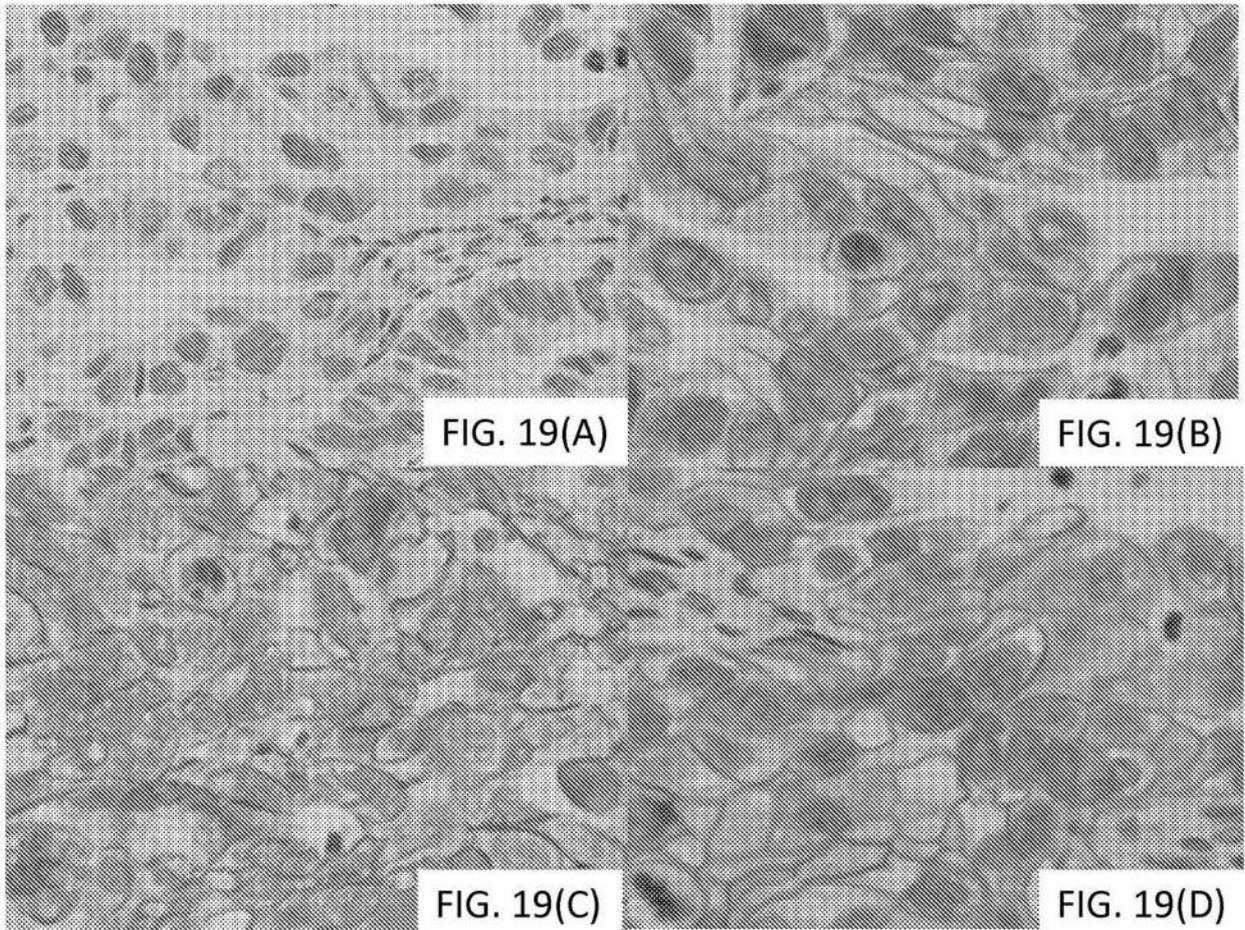
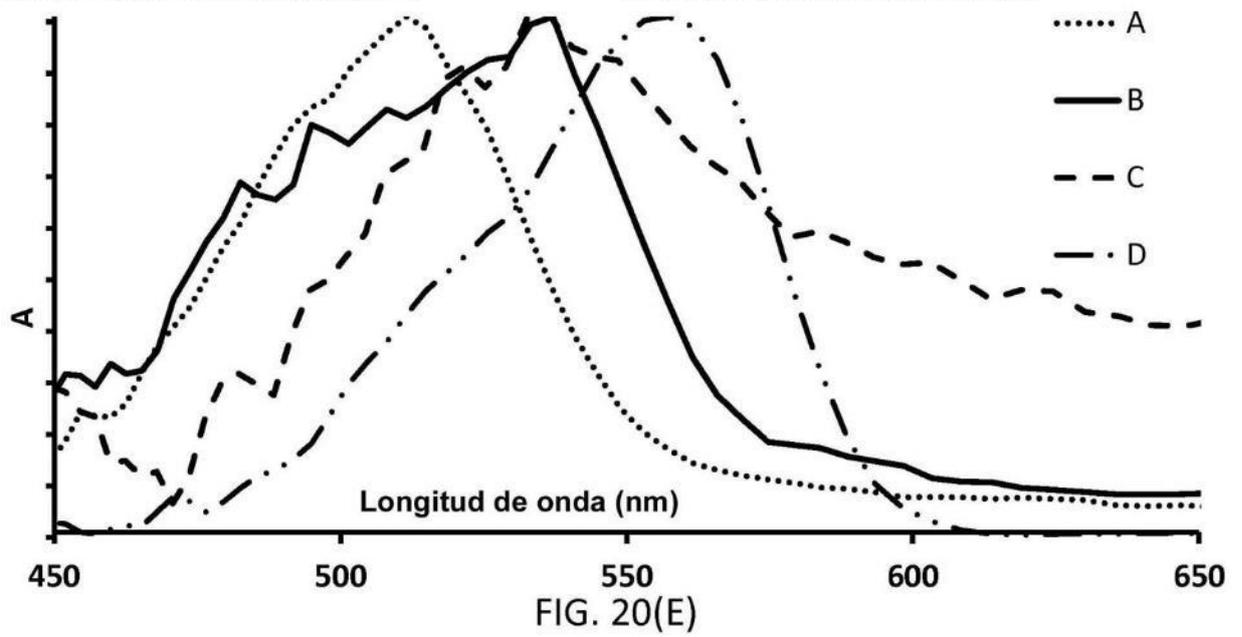
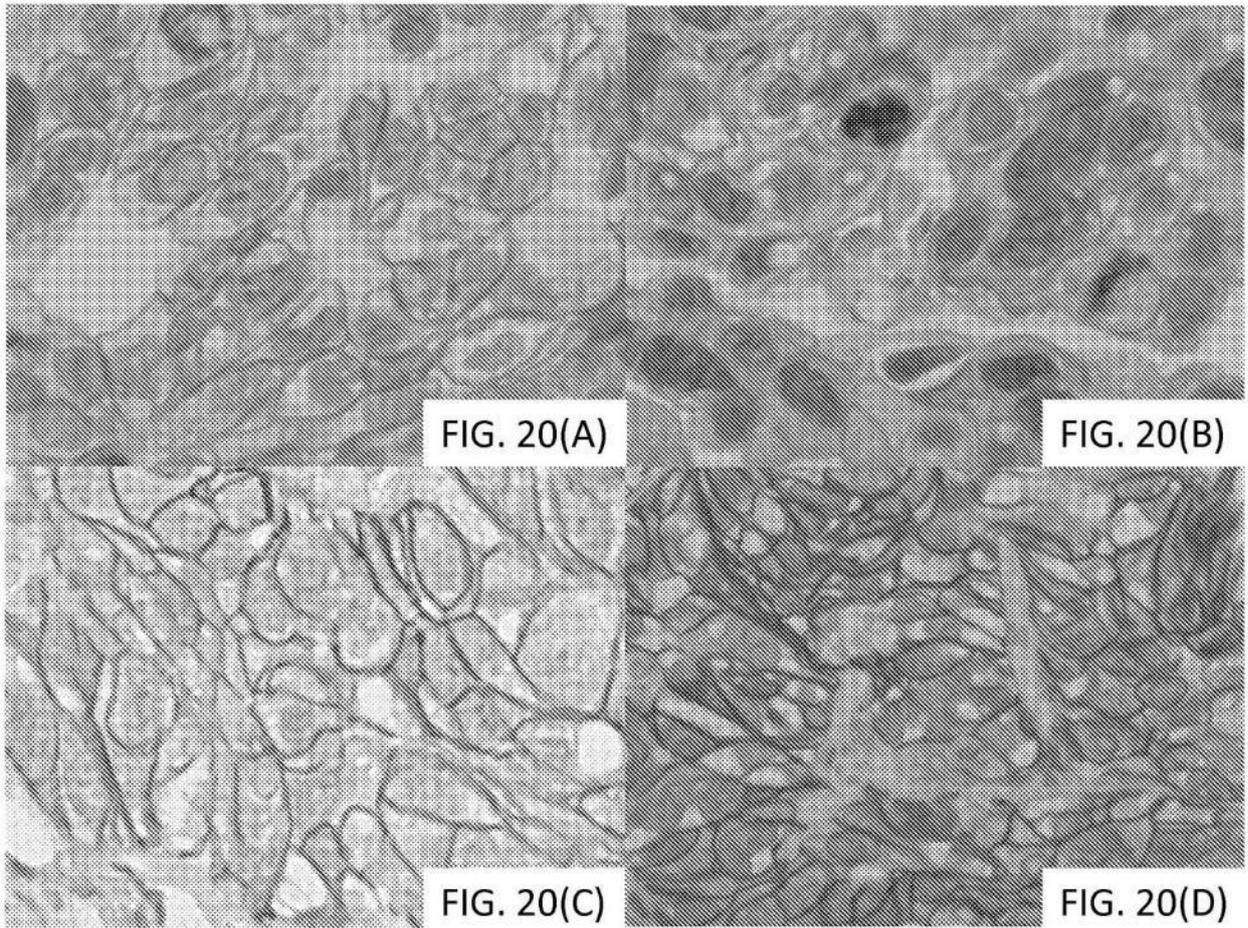


FIG. 16









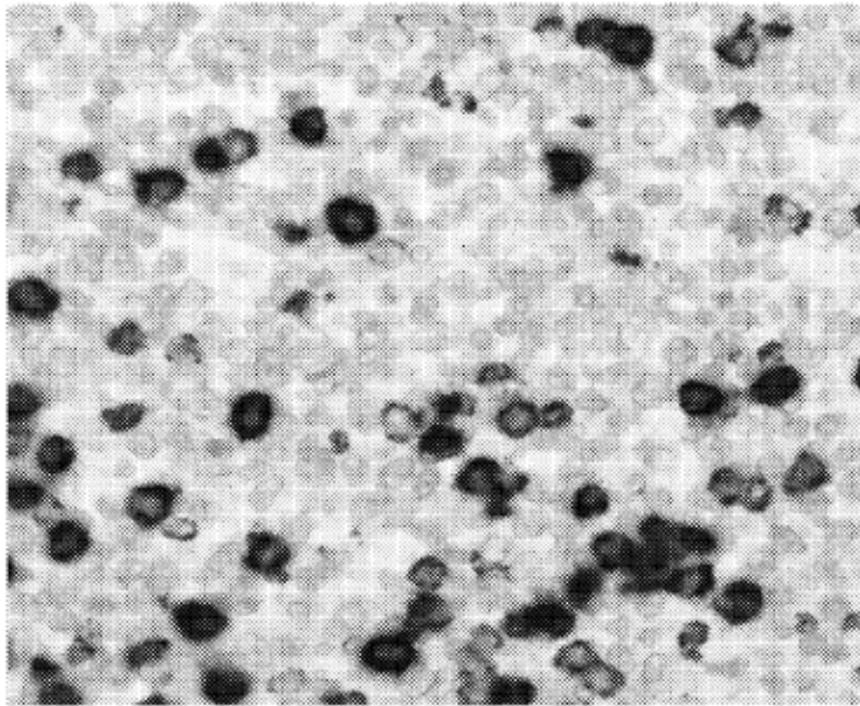


FIG. 21(A)

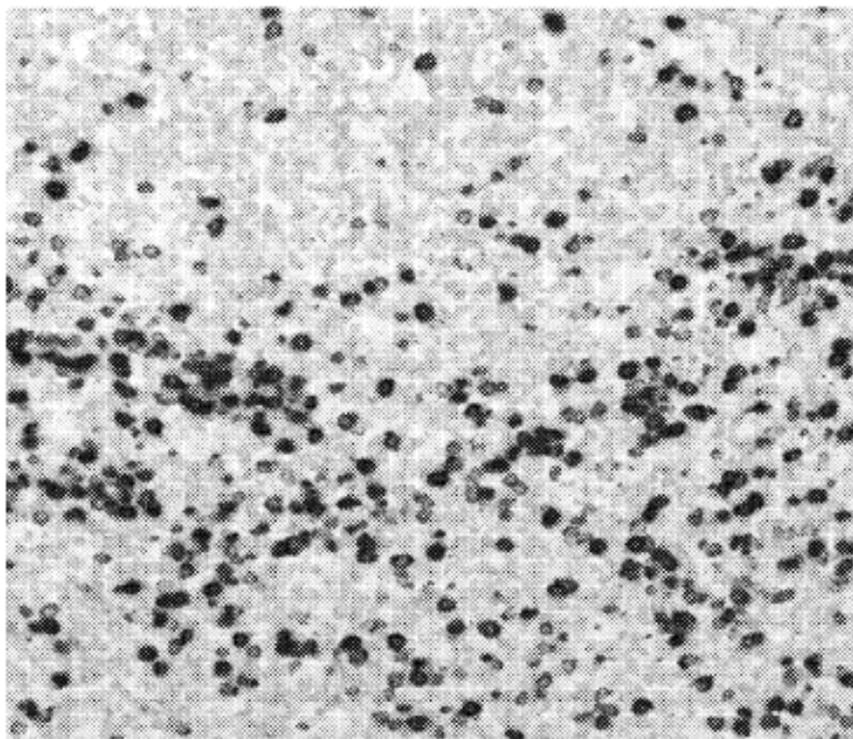


FIG. 21(B)

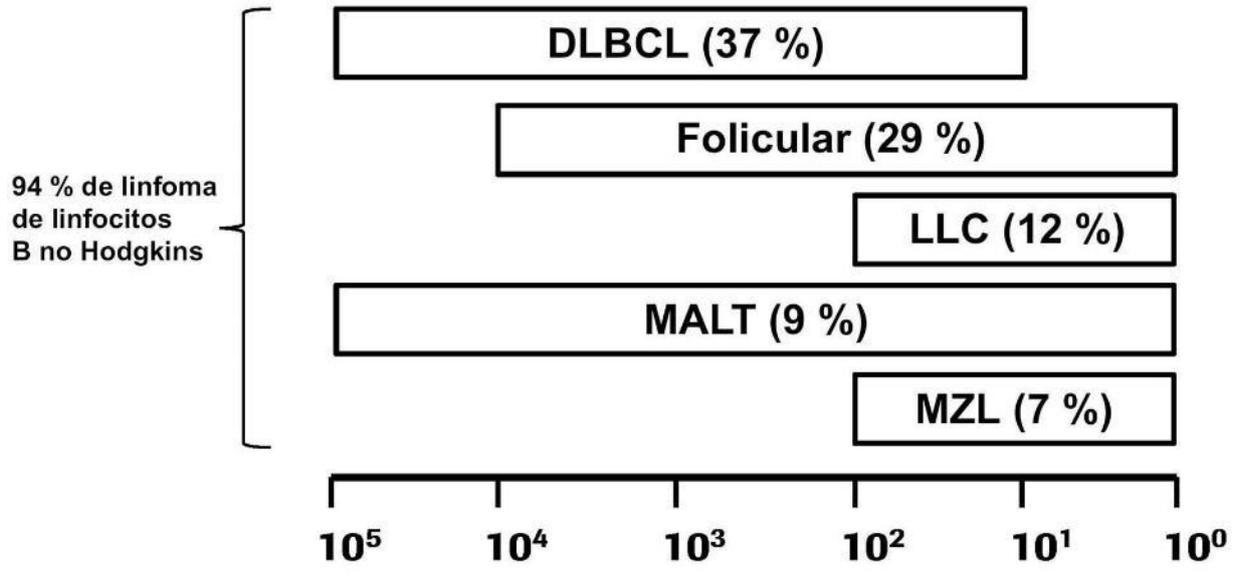


FIG. 22

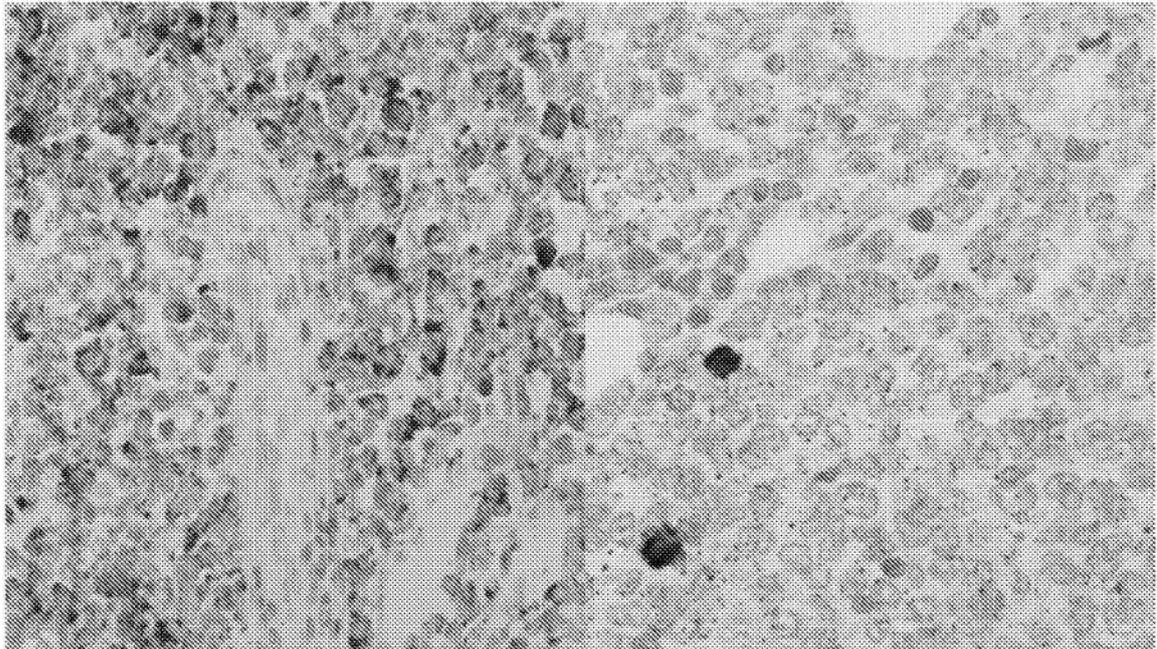


FIG. 23(A)

FIG. 23(B)

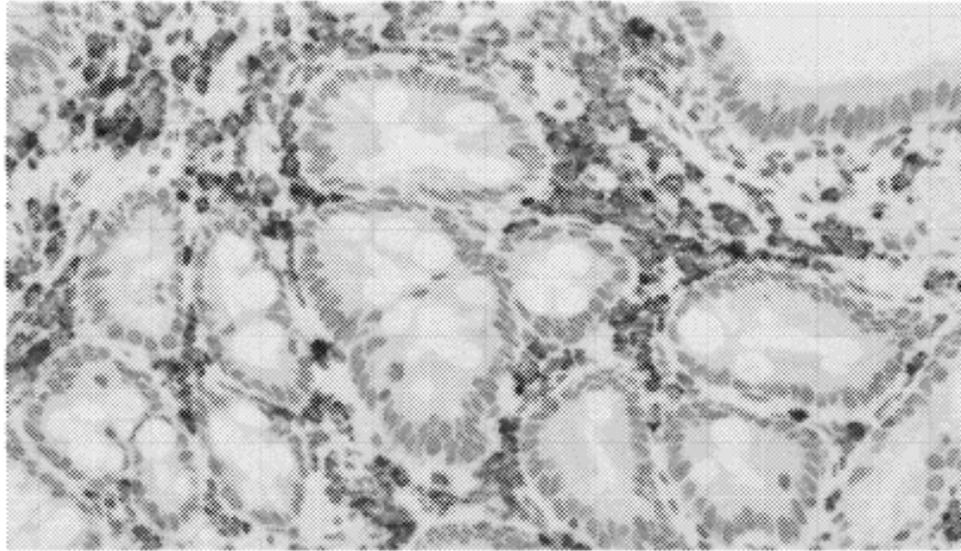


FIG. 24(A)

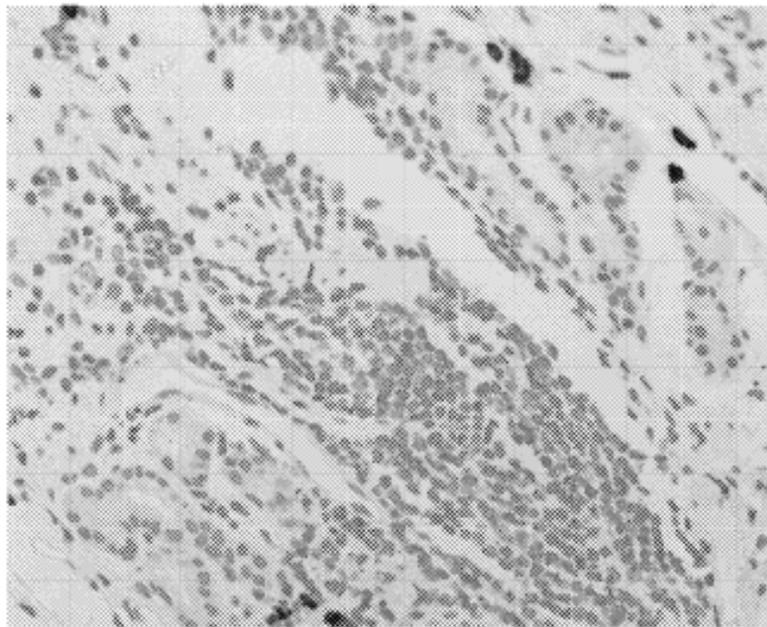


FIG. 24(B)

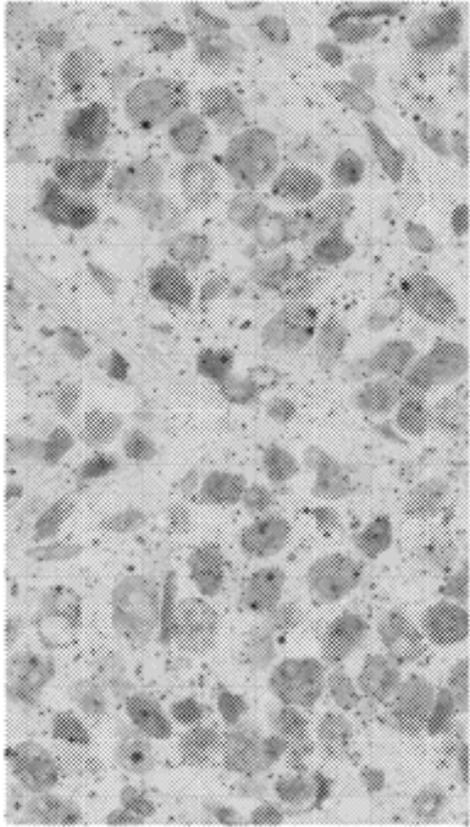


FIG. 25(A)

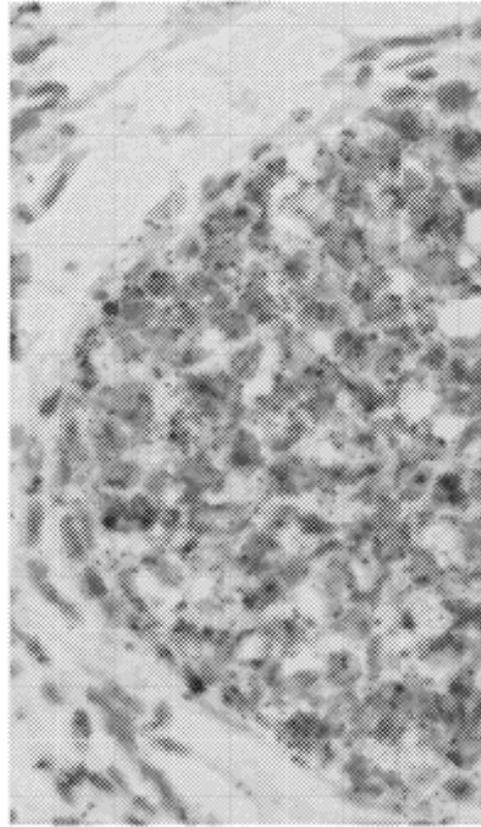


FIG. 25(B)

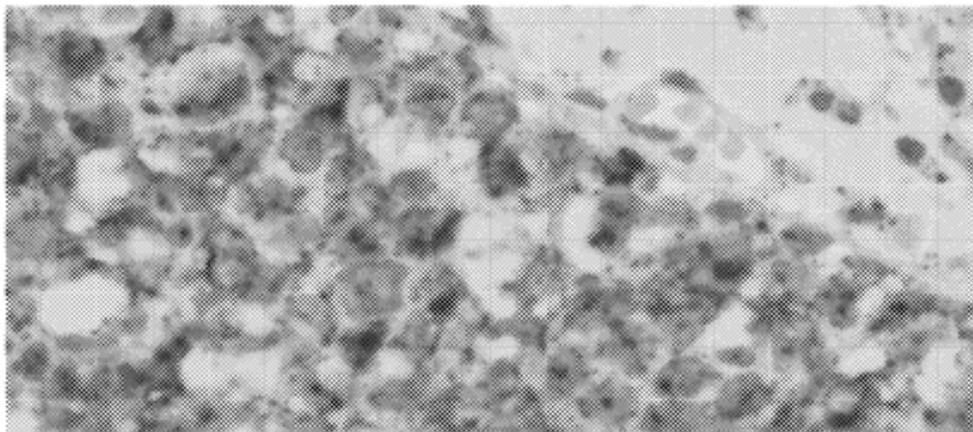


FIG. 26(A)

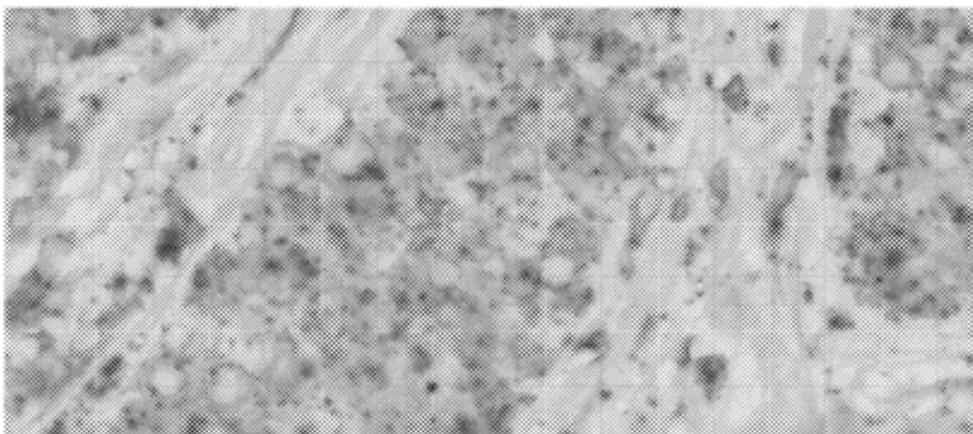


FIG. 26(B)

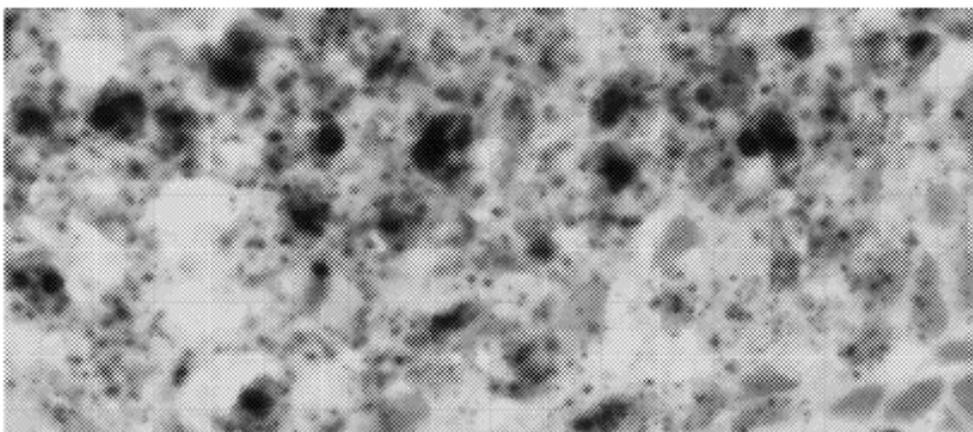


FIG. 26(C)

N.º ID lab bloque	Número de copias de ADN de <i>HER2</i>	Estado de proteína Her2 (IHC)	Relación <i>HER2/ACTB</i> (qPCR)	Señal de ISH- ARNm de <i>ACTB</i>	Señal de ISH- ARNm de <i>HER2</i>
26	Normal	0	0,00	Positiva	0+
28	Normal	0	0,42	Positiva	0+
32	Amplificado	3+	3,14	Negativa	0+
35	Normal	0	0,52	Positiva	1/2+
36	Normal	1+	0,94	Positiva	1/2+
48	Amplificado	1+	0,06	Positiva	1/2+
20	Amplificado	3+	94,59	Negativa	1/2+
40	Normal	2+	4,81	Positiva	1/2+
41	Normal	2+	2,65	Positiva	1/2+
43	Normal	2+	2,99	Positiva	1/2+
54	Normal	0	0,33	Positiva	1/2+
7	Normal	3+	7,41	Positiva	3+
8	Amplificado	3+	93,38	Positiva	3+
23	Amplificado	3+	0,81	Positiva	3+
27	Amplificado	3+	34,68	Positiva	3+
30	Amplificado	3+	7,78	Positiva	3+
33	Amplificado	3+	7,48	Positiva	3+
51	Amplificado	1+	8,19	Positiva	3+
56	Amplificado	3+	4,78	Positiva	3+
57	Amplificado	3+	5,47	Positiva	3+

FIG. 27

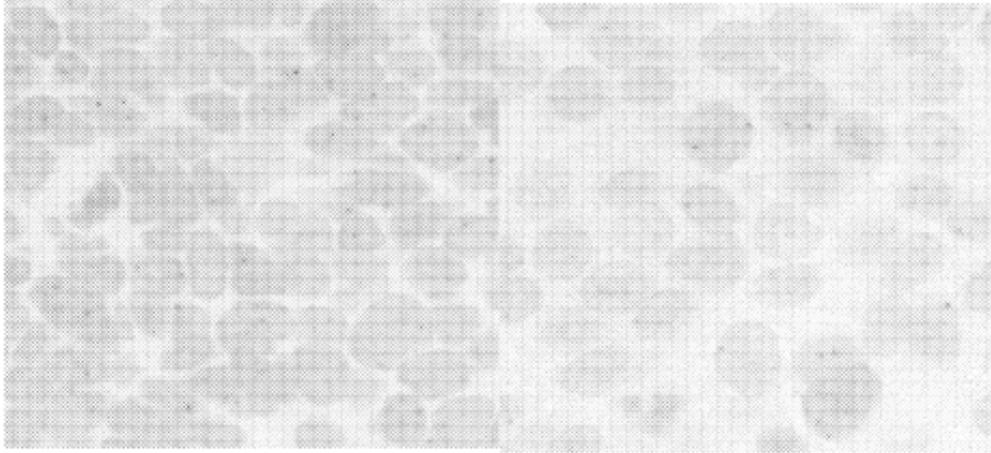


FIG. 28(A)

FIG. 28(B)

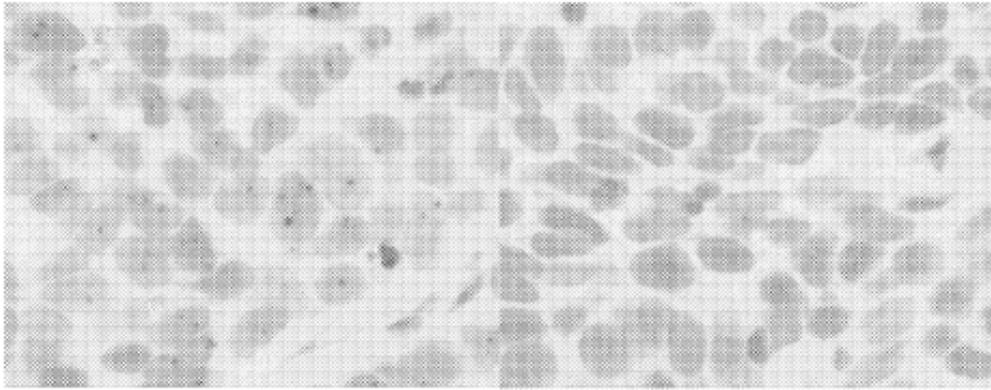


FIG. 29

FIG. 30

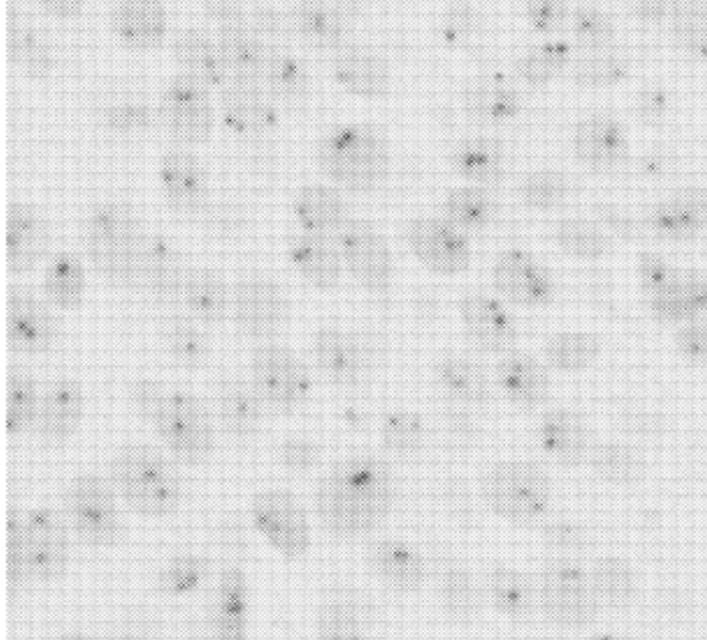


FIG. 31

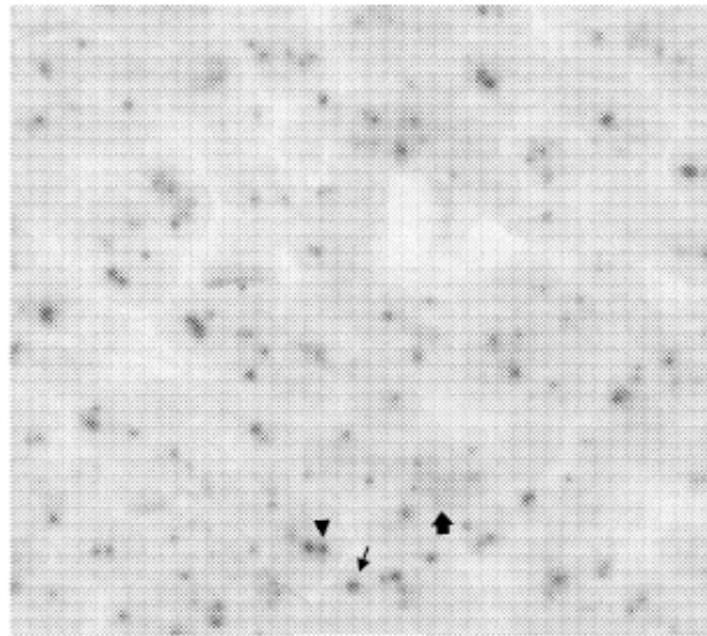


FIG. 32

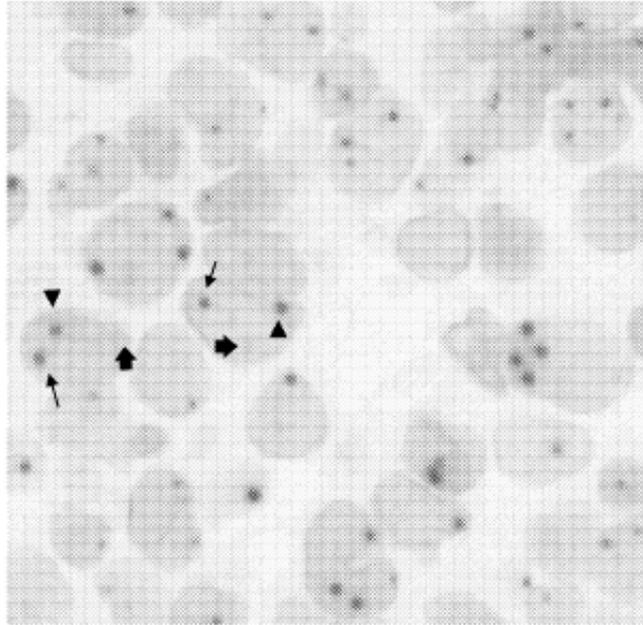


FIG. 33

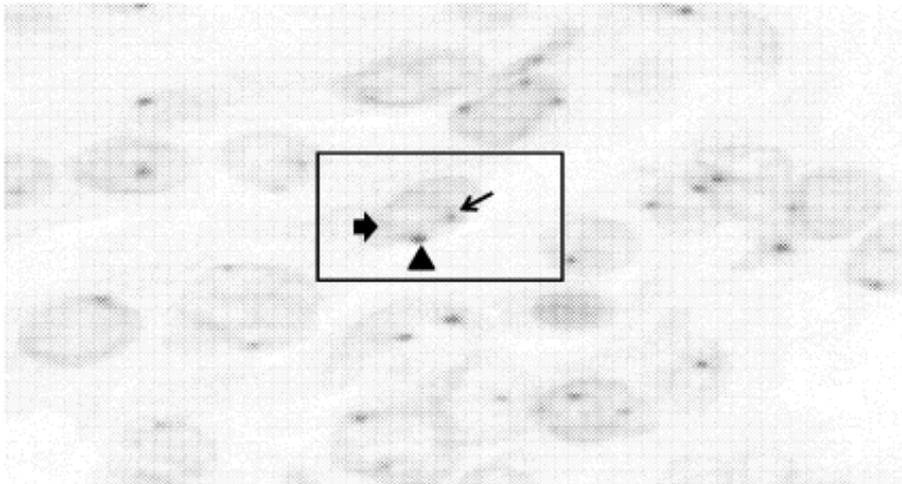


FIG. 34

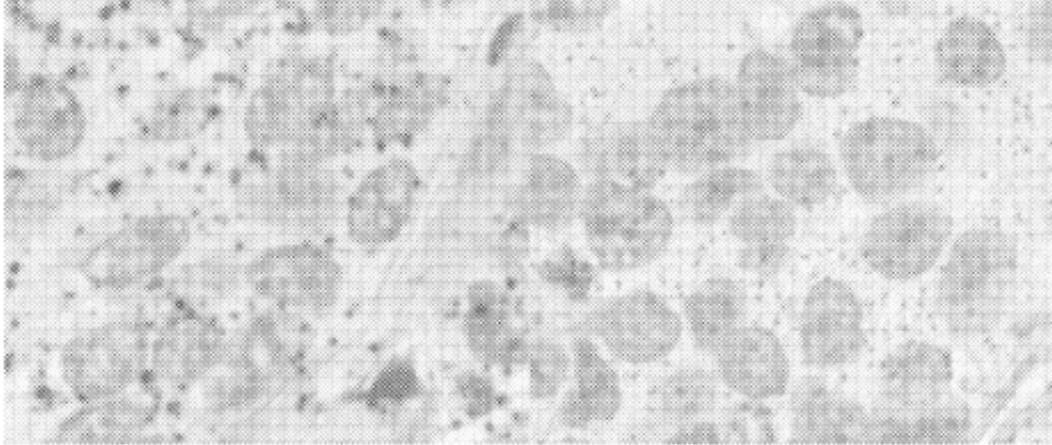


FIG. 35(A)

FIG. 35(B)

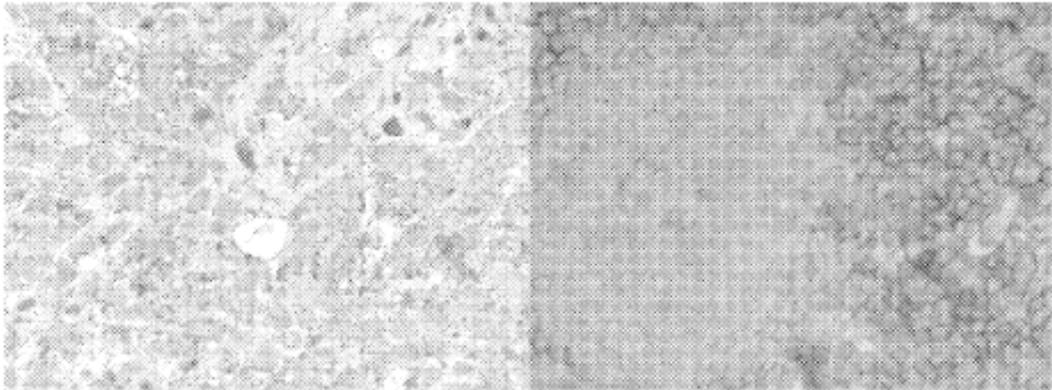


FIG. 35(C)

FIG. 36