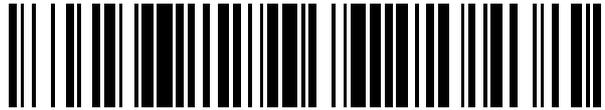


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 705**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2017 PCT/EP2017/052662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2017 E 17702667 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3414570**

54 Título: **Procedimientos de multiplexación cíclica de muestras y obtención de imágenes in situ**

30 Prioridad:

08.02.2016 EP 16154746

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

21.12.2020

73 Titular/es:

**LUNAPHORE TECHNOLOGIES SA (100.0%)
EPFL Innovation Park Bâtiment C
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**CIFTLIK, ATA TUNA;
DUPOUY, DIEGO GABRIEL;
JORIS, PIERRE y
GIJS, MARTIN**

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 799 705 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

Procedimientos de multiplexación cíclica de muestras y obtención de imágenes *in situ*

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece en general a los campos de obtención de imágenes de muestras *in situ*, en particular muestras biológicas mediante multiplexación cíclica.

10 **Antecedentes de la invención**

Las técnicas de medición analítica de muestras basadas en imágenes se han visto limitadas por el número de mediciones moleculares que pueden observarse simultáneamente (el alcance de la multiplexación) en una muestra individual, por ejemplo, un espécimen de tejido. Hasta ahora, esto ha restringido este tipo de estrategias analíticas del uso de la 'ómica' a gran escala en comparación con otras tecnologías altamente multiplexadas, como la secuenciación de células individuales o la citometría de masas. Como consecuencia, se están perdiendo detalles espaciales esenciales, que actualmente solo pueden revelar las estrategias basadas en imágenes. El uso de inmunofluorescencia en lugar de la inmunohistoquímica clásica puede superar en parte este problema, pero las mediciones aún están limitadas a un máximo de 4-5 lecturas moleculares simultáneas. La principal limitación de las mediciones analíticas de muestras multiplexadas basadas en imágenes es la separación de señales distintas en un espécimen individual sin diafonía entre señales. En el caso de la obtención de imágenes por fluorescencia, por ejemplo, la superposición de espectros impide una separación clara de las señales emitidas en un experimento de marcado multicolor altamente multiplexado. Además, los fluoróforos pueden exhibir un comportamiento de autoextinción a altas densidades de marcado, limitando aún más la aplicación simultánea de múltiples marcas. Otra limitación en la capacidad de multiplexación de las estrategias inmunológicas es el requisito de que cada anticuerpo primario tiene que derivarse de diferentes especies animales para asegurar la amplificación y detección específicas con anticuerpos secundarios. En principio, esto podría superarse mediante inmunofluorescencia directa, en otras palabras, marcar los anticuerpos primarios directamente, pero esta estrategia da lugar a otros problemas, como una menor especificidad y una menor salida de señal debido a la falta de amplificación.

Se han logrado múltiples lecturas moleculares usando inmunofluorescencia usando un procedimiento de mezcla de anticuerpos mostrado en el documento WO2007/047450. Aunque este procedimiento tiene las ventajas de estar basado en imágenes, ser aplicable a secciones de tejido y poder utilizarse en entornos que contienen nucleasas no específicas, el número máximo de detecciones simultáneas es limitado. La inclusión de estándares de referencia cuantificables en el procedimiento de medición, como se describe en el documento WO2008/005464, mientras que se aumenta la precisión en las lecturas de inmunohistoquímica de cuantificación en ciertas aplicaciones, como la puntuación semicuantitativa de proteínas de biomarcadores, por ejemplo, como se aplica a la puntuación semicuantitativa de la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) en tejidos de cáncer de mama, puede limitar aún más la posibilidad de lecturas simultáneas múltiples debido a la división de las señales de salida en bandas específicas. La multiplexación de muestras con obtención de imágenes *in situ* puede lograrse llevando a cabo multiplexación espectral que comprende aplicar diferentes tintes en la misma muestra y extraer imágenes de tintes individuales de los resultados de la obtención de imágenes como se describe en el documento EP1131631. La técnica implica recopilar datos espectrales de cada píxel de la muestra, generar computacionalmente un espectro que habría resultado de cada tinción individual y mostrar los resultados individuales en un espectro de color corregido. Aunque permite la cuantificación de marcadores múltiples, el rendimiento del dispositivo es inversamente proporcional al número de tintes paralelos debido a la posible diafonía entre cada señal.

Los avances recientes en tecnologías de inmunotinción son muy prometedores con respecto a la superación de las limitaciones mencionadas anteriormente. Estas tecnologías hacen uso de obtención de imágenes *in situ* de múltiples ciclos, que implica la inactivación del colorante y/o elución de anticuerpos después de una etapa habitual de tinción/obtención de imágenes para permitir rondas adicionales de tinción y obtención de imágenes.

Esas estrategias incluyen la inactivación química de colorantes fluorescentes después de cada adquisición de imagen (Gerdes y col., 2013, PNAS, 110 (29), 11982-11987), disociación no destructiva de los enlaces anticuerpo-antígeno para ciclos de tinción sucesivos usando secuencialmente una solución de permanganato acidificado hecha a medida (WO2010/115089), elución sucesiva de anticuerpos con diversos tampones diferentes (Pirici y col., 2009, J. Histochem. Cytochem., 57 (6), 567-575), ciclos sucesivos de contacto de la sonda peptídica y desnaturalización a alta temperatura para la detección secuencial de múltiples dianas (WO 2009/11714), tinción iterativa y ciclos de obtención de imágenes usando una combinación de técnicas de desnaturalización y elución (Wahlby y col., 2002, Cytometry, 47 (1), 32-41), múltiples ciclos de tinción secuencial usando blanqueo antes de cada etapa de retención (Friedenberger, 2007, Nature Protocols, 2, 2285 - 2294), uso de puntos cuánticos bioconjugados como marcas biológicas para elaboración de perfiles multiplexada de biomarcadores moleculares (Schubert y col., 2006, Nature Biotechnology 24, 1270-1278), uso de polímeros solubles en agua que forman enlaces con múltiples moléculas diana de interés (Xing, 2007, Nature Protocols 2, 1152 - 1165). * * El documento WO2013/128322 se refiere a un procedimiento de multiplexación de cóctel y el documento US2014/055853 se refiere en general a un procedimiento de multiplexación de una muestra de tejido con diferentes sondas diana.

Todas esas estrategias de obtención de imágenes *in situ* de múltiples ciclos son iterativas y presentan las ventajas de permitir la utilización posterior de anticuerpos primarios generados en la misma especie, así como el mismo reactivo químico o fluoróforo para diferentes dianas moleculares y teóricamente permiten identificar un número ilimitado de diferentes dianas en la misma sección de tejido.

Aunque prometedora, la traducción de tecnologías de obtención de imágenes *in situ* de múltiples ciclos a la elaboración de perfiles moleculares multiplexados de alto rendimiento de muestras tales como, por ejemplo, secciones tumorales, no es sencilla. En primer lugar, los prolongados ciclos de incubación y lavado (habitualmente hasta varias horas) dan como resultado duraciones de protocolo totales extremadamente prolongadas que causan la degradación de los antígenos tisulares en condiciones ambientales fluctuantes. En segundo lugar, el montaje/desmontaje repetido de la obtención de imágenes de etapas de cubreobjetos de muestra deterioran aún más la integridad del tejido. Por lo tanto, esta manipulación manual de los ciclos afecta a la reproducibilidad y prácticamente impide la elaboración de perfiles moleculares fiable de especímenes de tejido con alto rendimiento y hace que el uso de tecnologías de múltiples ciclos resulte poco práctico en aplicaciones como fines de diagnóstico que requieren alto rendimiento, fiabilidad y características de implementación de bajo coste relativo.

Una limitación adicional de los procedimientos existentes disponibles para obtención de imágenes *in situ* de muestras también surge del requisito de obtención de imágenes de área grande para realizar ensayos de múltiples ciclos. Puesto que los especímenes se eliminan de los sistemas de obtención de imágenes para realizar el procesamiento manual entre cada ciclo y después del procesamiento manual, los especímenes se restauran de nuevo a los sistemas de obtención de imágenes para un marcador molecular posterior de obtención de imágenes de área grande y las imágenes obtenidas del espécimen en todos los ciclos se superponen, las diferencias sutiles de colocación de especímenes en los sistemas de obtención de imágenes en cada ciclo introducen errores en la localización de señales moleculares en todo el espécimen. Esto dificulta la verdadera localización de señales moleculares, en particular las de las características subcelulares que solo pueden observarse con un sistema de microscopía de alta resolución o de superresolución.

Los sistemas microfluídicos verticales también se han introducido como una posible herramienta para ser usada en inmunoensayos o análisis genéticos. Se ha desarrollado una sonda microfluídica que está compuesta de una cámara amplia y orificios de acceso vertical para teñir manchas de área pequeña en una muestra (documento WO2014/001935). Las dimensiones del área teñida en cada ciclo son del orden de 100 μ m. Por lo tanto, es necesario escanear la superficie de la muestra con varias etapas de tinción para obtener una imagen más grande. Los problemas de posibles errores de localización y aumento del tiempo de análisis que resultan del procedimiento de escaneo también están presentes en este procedimiento.

Recientemente se ha presentado un dispositivo microfluídico descubierto para facilitar la transición más fácil entre la tinción secuencial y las etapas de obtención de imágenes (documento WO 2014/035917). El procedimiento tiene como objetivo superar las varias desventajas de tener que retirar el cubreobjetos de la muestra entre cada ejecución sucesiva, como el consumo de tiempo adicional, la pérdida de tejido y la variación de imagen de portaobjetos a portaobjetos eliminando la necesidad de esta etapa, mientras que no aborda los requisitos de área de obtención de imágenes y de tiempo de proceso. Finalmente, se ha observado que la obtención de imágenes *in situ* que implica la exposición secuencial y repetida a fluoróforos de la muestra conduce a daños inducidos en la muestra. En particular, los anticuerpos marcados con fluorescencia generalmente se entrecruzan con la muestra o el tejido durante la obtención de imágenes y no se pueden eliminar de la muestra o el tejido posteriormente, lo que limita aún más el uso de obtención de imágenes *in situ* mediante multiplexación cíclica.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas técnicas, instrumentación y herramientas para obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica que permitan lecturas multimoleculares en la misma muestra con alto rendimiento, alta sensibilidad, fiabilidad y precisión con respecto a la verdadera localización de las señales moleculares, particularmente para aplicaciones en los campos de diagnóstico o supervisión de transcurso de tratamiento en los que actualmente la demanda se está expandiendo considerablemente.

Resumen de la invención

Un objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento para la obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica que permita obtener imágenes de diversas dianas moleculares a través de lecturas multimoleculares en la misma muestra de manera eficiente, precisa y fiable.

Resulta ventajoso proporcionar un procedimiento para la obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica que permita obtener imágenes de diversas dianas moleculares en la misma muestra de manera rápida y sensible.

Resulta ventajoso proporcionar un procedimiento de obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica donde se mantiene la integridad de la muestra evitando desmontar la muestra del soporte de muestra entre cada ciclo del procedimiento de multiplexación.

Resulta ventajoso proporcionar un procedimiento de obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica donde se reduce el tiempo de análisis total evitando la necesidad de desmontar la muestra del soporte de muestra entre cada ciclo del procedimiento de multiplexación e impidiendo la degradación de la reproducibilidad que resulta del desmontaje.

5 Resulta ventajoso proporcionar un procedimiento de obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica donde la muestra inmovilizada en un soporte de muestra dentro de un canal microfluídico se somete a un flujo totalmente controlable de sonda(s) de obtención de imágenes directamente en la superficie de la muestra que fluyó directamente en la superficie de la muestra en una secuencia específica para llevar a cabo un ciclo completo de marcado y obtención de imágenes de la muestra y repetir tal ciclo de manera de alto rendimiento.

10 Resulta ventajoso proporcionar un procedimiento de obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica donde se preserva la integridad de la muestra durante los ciclos de obtención de imágenes mediante el uso de tampones de obtención de imágenes que impiden la degradación de la muestra y la degradación de la(s) sonda(s) de obtención de imágenes a través de la formación de especies de oxígeno de radicales libres durante el procedimiento de multiplexación.

15 Resulta ventajoso proporcionar un tampón de obtención de imágenes que impida la reticulación de reactivos de obtención de imágenes bajo luz fluorescente de alta intensidad que, cuando se usa en un procedimiento de obtención de imágenes *in situ* mediante multiplexación cíclica según la invención, disminuye el tiempo de elución de reactivo necesario en cada ciclo subsiguiente y aumenta el número de posibles ciclos de marcado de muestra sin degradación de la reproducibilidad y/o sensibilidad de la señal de obtención de imágenes medida.

20 Los objetos de esta invención se han logrado proporcionando un procedimiento según la reivindicación 1.

25 En esta invención, según un primer aspecto de la invención, se describe un procedimiento para obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una muestra inmovilizada en un soporte de muestra;
- 30 (ii) proporcionar un dispositivo microfluídico que comprende una cámara microfluídica, al menos una entrada de fluido en un extremo de dicha cámara microfluídica y al menos una salida de fluido en otro extremo de dicha cámara microfluídica configurada para conducir un fluido suministrado desde un sistema de alimentación de fluido a presión a través de la cámara microfluídica para el transporte advectivo de sustancias fluidicas y reactivos dentro de dicha cámara microfluídica de manera uniforme, en el que al menos una pared de la cámara microfluídica está formada por el soporte de muestra y en el que el volumen de la cámara microfluídica es de aproximadamente 2,5 μ l y 200 μ l;
- 35 (iii) montar dicho soporte de muestra sobre dicha cámara microfluídica con la muestra orientada al interior de la cámara microfluídica;
- (iv) inyectar en secuencia una pluralidad de reactivos, incluyendo al menos una sonda de obtención de imágenes, a través de la entrada de fluido en la cámara microfluídica, a un caudal en un intervalo entre aproximadamente 1 μ l/s y aproximadamente 100 μ l/s;
- 40 (v) obtener imágenes de una señal emitida por componentes de la muestra que reaccionó con dicha al menos una sonda de obtención de imágenes;
- 45 (vi) repetir las etapas (iv) y (v) con diferentes sondas de obtención de imágenes;

en el que dicha inyección en secuencia de una pluralidad de reactivos incluye:

- una etapa de elución en la que se inyecta un tampón de elución para eliminar material no deseable tal como sondas de marcado (por ejemplo, anticuerpos o marcadores) que permanecen potencialmente en la muestra;
- 50 - una etapa de bloqueo de enlace no específico en la que se inyecta un tampón de bloqueo;
- una etapa de marcado de muestra en la que se inyecta una sonda de obtención de imágenes; y
- una etapa de preobtención de imágenes opcional en la que se inyecta un tampón de obtención de imágenes, en la que cada una de estas etapas puede ir precedida y/o seguida de una etapa de lavado opcional en la que se inyecta un tampón de lavado.

Breve descripción de los dibujos

60 **La Figura 1** es una ilustración de configuraciones ejemplares para un dispositivo que lleva a cabo el procedimiento de la invención como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 2 ilustra una secuencia de reactivos usada en el ciclo de obtención de imágenes del procedimiento (2A), mientras omite las etapas de tampón de lavado opcionales entre cada etapa de flujo principal (S1 a S4) y un diagrama de flujo de marcado de múltiples muestras y el procedimiento de obtención de imágenes usando anticuerpos que se dirigen a diversos componentes diana (T1, T2, Tn) en una muestra como sondas de marcado que muestran la secuencia de reactivos inyectados y las repeticiones de la secuencia, n veces con diferentes reactivos (2B).

La Figura 3 es una imagen obtenida por microscopía de fluorescencia confocal con un aumento de 40x como se

describe en el Ejemplo 2 de una muestra usada en un procedimiento según la invención. **A:** donde se usa PBS como un tampón de obtención de imágenes según el protocolo de multiplexación de la invención y donde se produce reticulación entre antígenos y anticuerpos; **B:** donde se usa un tampón de obtención de imágenes que consiste en PBS suplementado con un depurador de radicales (Trolox 10 mM) como un tampón de obtención de imágenes según el protocolo de multiplexación de la invención y donde se impide la reticulación entre antígenos y anticuerpos.

La Figura 4 muestra las imágenes consecutivas obtenidas durante el Ejemplo 3 de tinción colocalizada multiplexada de los diversos biomarcadores en una sección de tejido de cáncer de mama individual. El orden de imagen A a G corresponde al orden de adquisición indicado en el protocolo.

Descripción detallada de la invención

Con referencia a las figuras, en particular primero a las Figuras 1 y 2, se proporciona una ilustración de un procedimiento para la obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una muestra (1) inmovilizada en un soporte de muestra (2);
- (ii) proporcionar un dispositivo microfluídico (3) que comprende una cámara microfluídica (4), al menos una entrada de fluido (6) en un extremo de dicha cámara microfluídica y al menos una salida de fluido (7) en otro extremo de dicha cámara microfluídica configurada para conducir un fluido suministrado desde un sistema de alimentación de fluido a presión (8) a través de la cámara microfluídica para el transporte advectivo de sustancias fluidas y reactivos dentro de (10) dicha cámara microfluídica de manera uniforme, en el que al menos una pared de la cámara microfluídica (5a) está formada por el soporte de muestra (2) y está montada de manera desmontable en la otra pared de la cámara microfluídica (5b) a través de medios de sujeción (11) y en el que el volumen de la cámara microfluídica es de aproximadamente 2,5 μl y 200 μl ;
- (iii) montar dicho soporte de muestra sobre dicha cámara microfluídica con la muestra (1) orientada al interior de la cámara microfluídica (12);
- (iv) inyectar en secuencia una pluralidad de reactivos, incluyendo al menos una sonda de obtención de imágenes, a través de la entrada de fluido (6) en la cámara microfluídica, a un caudal en un intervalo entre aproximadamente 1 $\mu\text{l/s}$ y aproximadamente 100 $\mu\text{l/s}$;
- (v) obtener imágenes de una señal emitida por componentes de la muestra que reaccionó con dicha al menos una sonda de obtención de imágenes;
- (vi) repetir las etapas (iv) y (v) con diferentes sondas de obtención de imágenes;

en el que dicha inyección en secuencia de una pluralidad de reactivos incluye:

- una etapa de elución opcional (S1) en la que se inyecta un tampón de elución para eliminar material no deseable, como sondas de marcado (por ejemplo, anticuerpos o marcadores) que permanecen potencialmente en la muestra;
- una etapa de bloqueo de enlace no específico (S2) en la que se inyecta un tampón de bloqueo;
- una etapa de marcado de muestra en la que se inyecta una sonda de obtención de imágenes (S3 que comprende S3' y S3''); y
- una etapa de preobtención de imágenes (S4) en la que se inyecta un tampón de obtención de imágenes, en la que cada una de estas etapas puede ir precedida y/o seguida de una etapa de lavado opcional en la que se inyecta un tampón de lavado.

En otra realización, la sonda de obtención de imágenes es una sonda marcada adecuada para interactuar con entidades moleculares específicas en la muestra. Por ejemplo, una sonda de obtención de imágenes puede ser una secuencia de ARN o ADN marcada útil para hibridación *in situ* con secuencias de ARN o ADN procedentes de la muestra (secuencias complementarias). En otro ejemplo, la sonda de obtención de imágenes es un anticuerpo primario marcado (por ejemplo, fluorescente), que se une directamente al antígeno diana.

En otra realización, la sonda de obtención de imágenes resulta de la inyección de una secuencia de sondas de marcado tales como anticuerpos específicos y moléculas de detección cromógenas o fluorescentes, dirigidas a las entidades moleculares que han de ser analizadas dentro de la muestra. En una realización, la sonda de obtención de imágenes resulta de un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, fluorescente) que se inyecta después de un anticuerpo primario.

Según una realización particular, el caudal de la pluralidad de reactivos inyectada es un intervalo de aproximadamente 1 $\mu\text{l/s}$ a aproximadamente 30 $\mu\text{l/s}$, tal como de aproximadamente 5 $\mu\text{l/s}$ a aproximadamente 30 $\mu\text{l/s}$ (por ejemplo, aproximadamente 25 $\mu\text{l/s}$).

Según otra realización particular, la altura de la cámara microfluídica definida por la distancia desde la pared de soporte de muestra a la pared opuesta de la cámara microfluídica varía de aproximadamente 10 mm y aproximadamente 300 mm, y la diagonal o el diámetro de la cámara microfluídica varía de aproximadamente 100 mm y aproximadamente 56 mm, formando una geometría poco profunda y ancha.

En otra realización, cada etapa en la secuencia de la pluralidad de reactivos inyectada se aplica durante un período de tiempo necesario para enjuagar la solución previa en la secuencia de etapas de flujo de solución desde la cámara microfluidica, en la que el enjuague corresponde a una disminución de concentración de la solución previa hasta el 1 % de la concentración inyectada previamente.

5 En otra realización, cada etapa en la secuencia de la pluralidad de reactivos inyectada se aplica durante un período de tiempo necesario para aumentar la concentración de la solución inyectada hasta el 99 % de la concentración de protocolo prevista dentro de la cámara microfluidica.

10 En una realización, cada etapa en la secuencia de la pluralidad de reactivos inyectada dura de aproximadamente 1 s a aproximadamente 120 s, tal como de aproximadamente 5 s a aproximadamente 20 s (por ejemplo, aproximadamente 10 s).

En otra realización particular, la etapa de inyectar en secuencia una pluralidad de reactivos incluye:

- 15
- una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S0);
 - una etapa de bloqueo de enlace no específico (S2) en la que se inyecta un tampón de bloqueo;
 - una etapa de incubación opcional, en la que el tampón de bloqueo inyectado previamente se incuba con o sin ninguna condición de flujo;
- 20
- una etapa de lavado opcional, en la que se inyecta un tampón de lavado;
 - una etapa de marcado de muestra en la que se inyecta una sonda de obtención de imágenes (S3);
 - una etapa de incubación opcional, en la que la sonda de obtención de imágenes inyectada previamente se incuba con o sin ninguna condición de flujo;
 - una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S3a);
- 25
- una etapa de preobtención de imágenes opcional (S4) en la que se inyecta un tampón de obtención de imágenes;

en la que la etapa de marcado de muestra comprende inyectar directamente una sonda marcada o una secuencia de sondas de marcado que conducen a una sonda de obtención de imágenes.

30 Según una realización particular, la etapa de marcado de muestra comprende inyectar una secuencia de sondas de marcado que conducen a una sonda de obtención de imágenes que comprende una primera etapa en la que se inyecta un anticuerpo primario (S3'), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S3'') y una etapa adicional en la que se inyecta un anticuerpo secundario marcado (S3''').

35 En una realización particular, la etapa de marcado de muestra comprende una primera etapa en la que se inyecta un anticuerpo primario (SB3'), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (SB3''), una segunda etapa en la que se inyecta un anticuerpo secundario ligado a enzima (SB3'''), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (SB3''''), y una etapa adicional en la que se inyecta un cromógeno o una molécula de detección fluorescente que reacciona con la enzima que está ligada al anticuerpo secundario SB3''''.

40 En otra realización particular, la etapa de marcado de muestra comprende una primera etapa en la que se inyecta un anticuerpo primario (SB3'), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (SC3''), una segunda etapa en la que se inyecta un anticuerpo postprimario, una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (SC3'''), una tercera etapa en la que se inyecta un anticuerpo secundario ligado a enzima (SC3''''), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (SC3''''') y una etapa adicional en la que se inyecta un cromógeno o una molécula de detección fluorescente que reacciona con la enzima que está ligada al anticuerpo secundario SC3''''.

45 En otra realización particular, la etapa de marcado de muestra comprende inyectar al menos una sonda marcada, tal como para hibridación *in situ* con algo de material de ADN/ARN dentro de la muestra, tal como una sonda de ARN o ADN marcada.

50 En una realización particular adicional, cuando la etapa de marcado de muestra comprende inyectar al menos una sonda marcada tal como para hibridación *in situ* con algo de material de ADN/ARN dentro de la muestra, el procedimiento de la invención comprende además aplicar ciclos de temperatura dentro de la cámara microfluidica requerida para la etapa de hibridación y deshibridación de algo de material de ADN/ARN dentro de la muestra con las sondas de ARN o ADN (secuencias complementarias). Por ejemplo, calentadores externos a la cámara microfluidica o al soporte de muestra pueden aplicar tales ciclos de temperatura. La hibridación *in situ* puede lograrse, por ejemplo, como se define en *Modern Pathology*, 2011, 24, 613-623; doi: 10.1038/mod-pathol.2010.228). A continuación se logra la obtención de imágenes en las sondas de hibridación inmovilizadas para detección de secuencias de ARN y ADN (sondas de secuencia complementarias marcadas).

55 En una realización particular, cuando la etapa de marcado de muestra comprende inyectar al menos una sonda marcada, tal como para hibridación *in situ* con algo de material de ADN/ARN dentro de la muestra, la inyección de la sonda marcada es seguida por una inyección de un tampón de obtención de imágenes, en particular, por ejemplo, un tampón de obtención de imágenes que comprende al menos un antioxidante y/o depurador de radicales como se describe en esta invención.

5 En otra realización particular, cuando la etapa de marcado de muestra comprende inyectar al menos una sonda
 marcada tal como para hibridación *in situ* con algo de material de ADN/ARN dentro de la muestra, se lleva a cabo una
 etapa de elución mientras se aplica un ciclo de temperatura (por ejemplo, a un intervalo de temperatura de
 aproximadamente 10 °C y aproximadamente 100 °C) para asegurar la eliminación de sondas o marcadores hibridados
 10 *in situ* no deseables que permanecen potencialmente en la muestra antes de repetir el procedimiento con otra etapa
 de marcado de muestra. En este caso, el tampón de elución puede comprender un tampón de deshibridación alcalino
 como se describe en Zhang y col., 2011, 17(10): 2867-2873 (por ejemplo, a pH 11,2) y la etapa de elución es seguida
 por una etapa de lavado con un tampón de lavado a una temperatura de deshibridación (por ejemplo, a un intervalo
 de temperatura de aproximadamente 10 °C y aproximadamente 100 °C) antes de llevar a cabo una nueva etapa de
 marcado de muestra.

15 En una realización particular, cada etapa en la secuencia de la pluralidad de reactivos inyectada comprende para cada
 reactivo dos etapas de caudal:

- una primera etapa de caudal en la que el reactivo se inyecta a un caudal inicial en un intervalo entre aproximadamente
 1 µl/s y aproximadamente 100 µl/s;
- una segunda etapa de caudal en la que se inyecta el mismo reactivo a un flujo inferior (típicamente de
 aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 µl/s) para asegurar un flujo suficiente del dicho reactivo con la
 20 muestra, antes de inyectar el siguiente reactivo en la secuencia.

En una realización particular adicional, la segunda etapa de caudal de un reactivo dura de aproximadamente 1 minuto
 a aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 minutos).

25 Según una realización particular, la duración de la segunda etapa de caudal depende del volumen usado por el canal
 microfluídico y del tiempo necesario para la incubación del reactivo con la muestra. Se requiere un tiempo de
 incubación calculado de aproximadamente 1 minuto para una altura de cámara inferior a 100 mm.

30 En una realización, la etapa de obtención de imágenes (v) se realiza mediante microscopía de fluorescencia confocal.

En una realización, la etapa de obtención de imágenes (v) se realiza mediante microscopía de fluorescencia.

En una realización, la etapa de obtención de imágenes (v) se realiza mediante microscopía de campo claro.

35 Según una realización particular, un tampón de lavado se selecciona de entre una solución salina tamponada con
 fosfato (PBS) y solución salina tamponada con Tris (TBS).

40 Según una realización particular, un tampón de elución se selecciona de entre una solución con un pH bajo (por
 ejemplo, pH 2) suplementada con un detergente (TritonX). La solución tampón de elución puede contener además
 altas concentraciones de sal iónica (por ejemplo, desde aproximadamente 0,001 M de NaCl hasta aproximadamente
 1 M de NaCl), agentes caotrópicos y/o agentes reductores/oxidantes.

45 Según una realización particular, un tampón de bloqueo se selecciona de entre tampón de citrato de sodio y PBS
 complementado con proteína (por ejemplo, albúmina de suero bovino o suero) y/o detergente (por ejemplo, Tween).

Según una realización particular, la etapa de bloqueo de enlace no específico (S2) es opcional.

50 Según una realización particular, la etapa de marcado de muestra comprende una primera etapa en la que se inyecta
 un anticuerpo primario (S3'), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S3") y una etapa adicional
 en la que se inyecta un anticuerpo secundario (S3''').

55 Según una realización particular, los anticuerpos primarios de la invención pueden ser cualquier anticuerpo adecuado
 para cualquier ensayo de inmunohistoquímica e inmunofluorescente tal como se describe en Dabbs, Diagnostic
 Immunohistochemistry: theranostic and diagnosis aplicaciones, 4ª edición, 2014, ISBN 978-1-4557-4461-9. Por
 ejemplo, los anticuerpos adecuados son anticuerpos de inmunoglobulina G o Y de ratón o conejo dirigidos contra
 epítotos clínicamente relevantes.

60 Según otra realización particular, el tampón de obtención de imágenes comprende al menos un antioxidante y/o
 depurador de radicales. Ejemplos de antioxidante y/o depurador de radicales se seleccionan de entre ácido ascórbico,
 ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ciclooctatetraeno, ácido lipoico y alcohol 4-
 nitrobenzílico.

65 Según otra realización particular, el tampón de obtención de imágenes se selecciona de entre agua destilada, solución
 salina tamponada con fosfato (PBS) y solución salina tamponada con Tris (TBS).

Según otra realización particular, el tampón de obtención de imágenes según la invención comprende al menos un

antioxidante y/o depurador de radicales, en el que dicho al menos un antioxidante y/o depurador de radicales están en forma soluble, es decir, en forma de una solución tampón de obtención de imágenes (Altman y col., 2011, Nat Methods, 9(1), 68-71).

5 En otra realización, el flujo se aplica de manera continua.

Según una realización particular, un procedimiento según la invención comprende al menos aproximadamente 2 a 80 ciclos de etapas (iv) a (vi), en particular al menos aproximadamente 20 a 80 ciclos de etapas (iv) a (vi).

10 Según una realización particular, un procedimiento según la invención comprende de 2 hasta aproximadamente 200 ciclos de etapas (iv) a (vi), en particular de 2 hasta aproximadamente 20 ciclos o de 2 hasta aproximadamente 100 ciclos.

15 En esta invención, según otro aspecto de la invención, se describe un tampón de obtención de imágenes que comprende al menos un antioxidante y/o depurador de radicales, en particular cuando dicho al menos un antioxidante y/o depurador de radicales está en una concentración comprendida entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 1.000 mM (por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 mM o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM).

20 Según una realización adicional, se proporciona un tampón de obtención de imágenes según la invención que comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 mM de ácido ascórbico (por ejemplo, aproximadamente 100 mM) o aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM de Trolox o ácido lipoico.

25 En una realización particular adicional, se proporciona un procedimiento para obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica como se describe en esta invención en el que en la etapa de preobtención de imágenes se inyecta un tampón de obtención de imágenes según la invención.

30 Según un aspecto, el procedimiento de la invención permite la obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica de elaboración de perfiles moleculares en diversas muestras, en particular muestras biológicas, incluyendo secciones de tejido, cultivos celulares, proteínas o preparaciones de ácidos nucleicos.

35 Según otro aspecto, las muestras que se proporcionan para el análisis mediante un procedimiento de la invención como inmobilizadas por diferentes tipos de técnicas e incluyen muestras de tejido embebido en parafina y fijado en formalina (FFPE), muestras de tejido fijado criogénicamente, frotis celulares, muestras de biopsia con aguja y preparaciones celulares fijadas. Pueden realizarse diferentes tipos de etapas de preparación de muestra dependiendo del tipo de muestra y la aplicación deseada.

40 Según otro aspecto, las sondas de marcado comprenden colorantes químicos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos u oligonucleótidos que conducen a una sonda de obtención de imágenes tales como sondas de hibridación o amplificación *in situ*.

Las características mencionadas anteriormente pueden combinarse de cualquier manera apropiada.

45 Una característica ventajosa de la invención es proporcionar un procedimiento en el que los tiempos del ciclo de incubación, lavado y elución se reducen a minutos, impidiendo la degradación de los antígenos de la muestra en condiciones ambientales fluctuantes y durante la exposición a tampones agresivos.

50 Una característica ventajosa de la invención es proporcionar un procedimiento que permite llevar a cabo marcado de muestra convencional, tal como anticuerpos primarios y secundarios convencionales combinados con sistemas de detección convencionales, sin necesidad de reactivos, tampones o sistemas de detección dedicados o personalizados para marcado múltiple.

55 Una ventaja evidente para un procedimiento de la invención es eliminar la necesidad de montar y desmontar repetidamente cubreobjetos de muestra a través de cada ciclo de obtención de imágenes, lo que puede afectar la integridad de la muestra y ocasionar la degradación de la reproducibilidad e impedir la automatización completa de tal procedimiento, lo que también es esencial para un marcado reproducible.

Una ventaja evidente adicional para un procedimiento de la invención es usar el 100 % de un área de muestra para análisis de multiplexación.

60 Otra característica ventajosa de la invención es proporcionar un procedimiento cuyo rendimiento multiciclo puede mejorarse aún más usando composiciones de tampón de obtención de imágenes específicas durante la etapa de obtención de imágenes para eliminar eficientemente las sondas de marcado tales como moléculas fluorescentes del analito durante la etapa de elución antes de llevar a cabo la siguiente etapa analítica y para impedir alteraciones fotoinducidas de la muestra o de las moléculas marcadas usadas durante la etapa de marcado de muestra.

65 Aparte del análisis de muestras, un procedimiento según la invención puede ser útil para multiplexar la detección de

secuencias genéticas, tal como por hibridación *in situ*.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de las reivindicaciones, la descripción detallada y las figuras. Habiéndose descrito la invención, los siguientes ejemplos se presentan a título de ilustración y no de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ejemplo de protocolo de multiplexación para llevar a cabo ciclos de marcado de muestra sucesivos

Un procedimiento de la invención para obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica se implementa en un dispositivo en una muestra de tejido embebido en parafina y fijado en formalina (FFPE) como se ilustra en la Figura 1.

a) Ejemplo de preparación de muestra

Pueden realizarse diferentes tipos de etapas de preparación de muestra dependiendo del tipo de muestra y la aplicación deseada. En el presente ejemplo, las etapas de preparación de muestra para muestras de tejido FFPE que se llevaron a cabo antes de los procedimientos de tinción múltiple se describen aquí como un ejemplo típico.

Las muestras biológicas primero se deshidratan a 65 °C durante 10 min. Después de 5 minutos de enfriamiento, las secciones de tejido se desparafinan durante 10 minutos en una solución Histoclear (por ejemplo, xilol), seguido de rehidratación en etanol al 100 %, 95 %, 70 % y 40 % (vol./vol.), respectivamente. Finalmente, el procedimiento de recuperación de antígeno inducido por calor se lleva a cabo con un tampón de citrato de sodio (aproximadamente pH 6) o un tampón EDTA (aproximadamente pH 9) en un baño de agua a 95 °C o una olla eléctrica a presión durante aproximadamente 20 minutos. El protocolo exacto depende de las sondas de marcado usadas. La muestra está entonces lista para realizar un procedimiento de la invención como se ilustra en el siguiente dispositivo ejemplar.

b) Ejemplo de dispositivo para implementar el procedimiento de la invención

La Figura 1 muestra la sección transversal de un dispositivo ejemplar (3) para implementar un procedimiento de la invención donde una muestra (1), por ejemplo, como se prepara en a), es inmovilizada en un soporte de muestra (2) en el que dicho soporte de muestra se mantiene en la pared de la cámara microfluidica (5b) orientado a la entrada de alimentación de fluido de dicha cámara microfluidica, de modo que la muestra (1) está orientada a la parte interior de la cámara microfluidica.

c) Ejemplo de secuencia de reactivos de obtención de imágenes

El ciclo inicial del procedimiento de multiplexación de la invención puede iniciarse después de la preparación de tejidos y reactivos. En la Figura 2A se esboza una secuencia de reactivos de obtención de imágenes (que comprende soluciones de lavado/elución, soluciones de bloqueo, soluciones de sonda de marcado, etc.) usada en un procedimiento de multiplexación según la invención utilizado para llevar a cabo ciclos sucesivos de marcado de muestras y obtención de imágenes. Tal secuencia de reactivos de obtención de imágenes se introduce sucesivamente en la cámara microfluidica (4) a través de la entrada de fluido (6) por el sistema de alimentación de fluido (8).

Etapa 0: Etapa de lavado

Cada ciclo comienza con el primer lavado de la muestra de tejido haciendo fluir un tampón a través del sistema, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) y solución salina tamponada con Tris (TBS).

Etapa 1: Etapa de elución

El tampón de lavado es seguido en la secuencia de los reactivos de obtención de imágenes por un tampón de elución, cuya composición y condiciones de pH pueden variar dependiendo de la muestra analizada para eliminar material no deseado (por ejemplo, sondas de marcado tales como anticuerpos o marcadores) que permanecen potencialmente en la muestra. Por ejemplo, puede usarse tampón de glicina 0,1M a pH 2 suplementado con 0,05 % de detergente TritonX como tampón de elución.

Etapa 2: Etapa de bloqueo de enlace no específico

A continuación, se hace fluir un tampón de bloqueo (por ejemplo, tampón de citrato de sodio o PBS-Tween con albúmina de suero bovino) en la secuencia de la secuencia de reactivos de obtención de imágenes a través de la cámara microfluidica para disminuir el enlace no específico de proteínas en las etapas posteriores.

Etapa 3 (3', 3" y 3'''): Etapa(s) de marcado de muestra

La(s) sonda(s) de obtención de imágenes o la(s) sonda(s) de marcado que conducen a la sonda de obtención de imágenes se introducen a continuación en la secuencia de los reactivos de obtención de imágenes que se han hecho fluir en el canal microfluídico. Por ejemplo, una secuencia de sondas de marcado que conduce a una sonda marcada incluye una secuencia en la que un anticuerpo primario y a continuación un anticuerpo secundario (sondas de marcado) se hacen fluir e incuban, mientras se lava la muestra con un tampón de lavado entre cada etapa. Las proporciones de dilución de las sondas de marcado se determinan dependiendo del protocolo optimizado o las instrucciones del vendedor. Alternativamente, otro ejemplo de etapa de marcado de muestra incluye inyectar una sonda marcada con ARN o ADN para hibridación *in situ*. En este caso, el procedimiento incluye además aplicar un ciclo de temperatura adecuado para asegurar la hibridación del material de ARN o ADN dentro de la muestra con las secuencias complementarias de las sondas marcadas con ARN o ADN.

Etapa 4: Etapa de obtención de imágenes

La obtención de imágenes se realiza después del final de este ciclo y, finalmente, después de que se haya hecho fluir un tampón de obtención de imágenes en el canal microfluídico.

Todo el procedimiento cíclico puede repetirse hasta aproximadamente 50 veces con diferentes sondas de obtención de imágenes. En el caso de un ciclo en el que se logra el marcado de muestra en vista de la hibridación *in situ*, el procedimiento puede incluir además aplicar un ciclo de temperatura para asegurar la eliminación de sondas o marcadores hibridados *in situ* no deseables que permanecen potencialmente en la muestra antes de repetir el procedimiento con otra etapa de marcado de muestra, por ejemplo, durante la etapa de elución.

La Figura 2B muestra un ejemplo de diagrama de flujo del marcado mutimuestra y el procedimiento de obtención de imágenes con anticuerpos primarios (a) y a continuación secundarios (b) como sondas de marcado dirigidas a diversas dianas (T1, T2, Tn) en una muestra que muestra la repetición de secuencia de las diferentes etapas de la secuencia de reactivos de obtención de imágenes esbozada en la Figura 2A y la repetición de la secuencia n veces. La Tabla 1 a continuación muestra un gráfico de tiempo de ejemplo de un ciclo de marcado de muestra para una aplicación típica. Cada ciclo puede reducirse a aproximadamente menos de 10 minutos, conduciendo así a un tiempo de marcado de muestra de aproximadamente 5 horas necesario para realizar aproximadamente 50 ciclos de marcado de muestra en este caso particular. El tiempo de obtención de imágenes depende del número de canales fluorescentes, el área de obtención de imágenes y la resolución requerida para cada ciclo, y varía de 1 minuto a 120 minutos por etapa. Por lo tanto, el tiempo total requerido para la obtención de imágenes y el marcado de muestra puede ser tan bajo como aproximadamente 6 horas para completar 50 ciclos de marcado de muestra junto con la obtención de imágenes.

Tabla 1

	Reactivo	Duración de flujo (s)	Tiempo de incubación (s)	Tiempo de etapa (s)
Ciclo (n)	Tampón de elución	12	60	72
	Tampón de lavado	20		20
	Tampón de bloqueo	12	60	72
	Tampón de lavado	20		20
	Ab primario (n)	12	120	132
	Tampón de lavado	20		20
	Ab secundario (n)	12	120	132
	Tampón de lavado	20		20
	Tampón de obtención de imágenes	20		20
	Total	148	360	508

d) Ejemplo de medición de muestra

Los resultados de la obtención de imágenes de ciclos de marcado de muestra sucesivos llevados a cabo con un procedimiento de la invención son como se describen a continuación.

Cultivo celular

Se cultivan células HeLa Kyoto en DMEM (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de la tripsinización y la resuspensión, la suspensión celular se pipetea en condiciones estériles en portaobjetos de vidrio de borosilicato ultrafino limpios para sala blanca (25 x 75 mm, 170 mm de grosor), se coloca dentro de una placa de Petri de 10 cm y se cultiva durante 2-3 días hasta que se ha alcanzado aproximadamente el 80 % de confluencia.

Fijación

El portaobjetos de vidrio con las células cultivadas en la parte superior se retira de la placa de Petri y se lava en un frasco de vidrio con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a continuación se sumerge en PBS suplementado con 4 % de paraformaldehído (PFA) durante 30 minutos.

Permeabilización

El portaobjetos de vidrio se lava nuevamente con PBS y a continuación se sumerge en PBS suplementado con 0,25 % de detergente Triton-X durante 15 minutos. Posteriormente, el portaobjetos se inserta en un dispositivo como se describe en esta invención para implementar un procedimiento de la invención.

Etapas de multiplexación

Se realizan ciclos iterativos de marcado de muestra, obtención de imágenes y elución en el dispositivo y se lleva a cabo la obtención de imágenes. **Lavado:** Se aplica PBS a un caudal de 25 µl/s durante 10 s. **(S0)**

Bloqueo: Se aplica PBS suplementado con 5 % de suero de cabra a un caudal de 15 µl/s durante 10 segundos y a continuación se incuba durante 2 minutos bajo un flujo continuo de 0,015 µl/s. **(S2)**

Enlace de anticuerpos primarios: PBS suplementado con 5 % de suero de cabra y anticuerpos primarios antihumano de ratón y antihumano de conejo específicos de antígeno (anticuerpos primarios para cualquier ensayo de inmunohistoquímica e inmunofluorescente como se describe en *Dabbs, 2014, supra*) (dilución de 1:10-1:1000, dependiendo de la concentración de la solución de anticuerpo primario y la afinidad del anticuerpo) se aplica a un caudal de 15 µl/s durante 10 segundos y a continuación se incuba durante 15 minutos bajo un flujo continuo de 0,015 µl/s. **(S3')**

Lavado: Se aplica PBS a un caudal de 25 ml/s durante 10 s. **(S3'')**

Enlace de anticuerpos secundarios: PBS suplementado con 5 % de suero de cabra, DAPI y anticuerpos secundarios anticonejo de cabra y antirratón de cabra (dilución de 1:250, 8 µg/ml) marcados con fluoróforos Alexa 568 y 647, respectivamente, se aplica a un caudal de 15 µl/s durante 10 segundos y a continuación se incubaron durante 15 minutos bajo flujo continuo de 0,015 µl/s. **(S3''')**

Lavado: Se aplica PBS a un caudal de 25 ml/s durante 10 s. **(S3a)**

Obtención de imágenes: Se aplica tampón de obtención de imágenes (PBS suplementado con 100 mM de ácido ascórbico) a un caudal de 25 µl/s durante 10 segundos y a continuación se aplica continuamente a 0,015 µl/s durante todo el procedimiento de obtención de imágenes. **(S4)**

A continuación, se adquieren imágenes en un microscopio confocal de disco giratorio con un aumento de 40x en tres canales separados para el tinte DAPI (4',6-Diamidín-2-fenilindol) (exposición a 405 nm) y los dos tintes de inmunofluorescencia, fluoróforos Alexa 488 y 568 (exposición a 488 y 561 nm, respectivamente). Se escanea un área grande de aproximadamente 500-1.000 sitios de adquisición y se adquieren 10 planos focales por canal en cada sitio. El canal DAPI se adquiere en cada ciclo y, por lo tanto, puede servir como referencia a través de los ciclos para la alineación computacional de imágenes adquiridas en diferentes ciclos en caso de un desplazamiento entre ciclos.

Lavado: Se aplica PBS a un caudal de 25 µl/s durante 10 s.

Elución: Se aplica tampón de elución (solución de glicina 0,1 M a pH 2 suplementada con 0,05 % de detergente TritonX) a un caudal de 15 µl/s durante 10 segundos y a continuación se incuba durante 1 minuto bajo un flujo continuo de 0,015 µl/s. Esta etapa se realiza dos veces.

Ejemplo 2: Ejemplo de uso de un tampón de obtención de imágenes de la invención en un procedimiento de la invención

El presente ejemplo ilustra el uso de un tampón de obtención de imágenes según la invención usado para mejorar la eficiencia de eliminación de moléculas fluorescentes de muestras bajo luz de alta intensidad, que es particularmente útil en un procedimiento según la invención.

Se aplicaron células HeLa fijadas con formalina a un ciclo de marcado de muestra según el protocolo de multiplexación como se describe en el Ejemplo 1. A continuación, se realizó la obtención de imágenes usando como tampón de obtención de imágenes solución salina tamponada con fosfato (PBS) sola o en combinación con un agente depurador de radicales. Posteriormente, se realizó la etapa de elución como se describe en el Ejemplo 1 y se realizó un segundo ciclo de marcado de muestra, omitiendo la etapa de enlace de anticuerpos primarios, y se escaneó un área de obtención de imágenes más grande en comparación con la primera ronda de obtención de imágenes, mientras que se dejan sin cambios todos los demás parámetros de obtención de imágenes tales como la intensidad del láser y el tiempo de exposición. En las imágenes mostradas, el recuadro contorneado indica el área de adquisición de la primera ronda de obtención de imágenes.

La Figura 3A muestra la reticulación fotoinducida entre antígenos y anticuerpos tras la obtención de imágenes en presencia de PBS únicamente.

La Figura 3B muestra una muestra similar expuesta a condiciones idénticas de premarcado y marcado tras la obtención de imágenes en presencia de PBS suplementado con Trolox 10 mM (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

Esos datos apoyan que la adición de antioxidantes y/o depuradores de radicales al tampón de obtención de imágenes impide la reticulación fotoinducida entre antígenos y anticuerpos usados en procedimientos de obtención de imágenes *in situ* de muestras y, por lo tanto, aumenta la eficiencia de la eliminación de moléculas fluorescentes de una muestra sometida a multiplexación cíclica y, por lo tanto, conduce a un mayor rendimiento de un procedimiento de la invención.

Ejemplo 3: Tinción colocalizada multiplexada de ER, CK, PR y HER2 en una muestra de tumor de mama

Los portaobjetos de tejido embebido en parafina y fijado con formalina (FFPE) pueden teñirse mientras que también se obtienen imágenes de la muestra entre cada etapa usando los procedimientos descritos en la presente invención. Como ejemplo ilustrativo, una sección de tumor de mama FFPE positiva al receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), la citoqueratina (CK) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), se ha teñido usando multiplexación secuencial según un procedimiento de la invención usando en secuencia una pluralidad de reactivos y etapas de obtención de imágenes determinadas según los datos derivados de los resultados preliminares de la prueba. La muestra ha sido preparada primero para la tinción a través de los procedimientos de desparafinado, rehidratación y recuperación de antígeno como se describe en los ejemplos anteriores y sometida a continuación a un procedimiento de obtención de imágenes *in situ* de la invención que se resumen en la Tabla 2 a continuación. Cada marcador ha sido detectado en la etapa de obtención de imágenes usando ensayos tipo sándwich con sondas de detección fluorescentes de diferentes longitudes de onda (Alexa Fluor). Para la elución eficiente de los anticuerpos, se ha usado una combinación de tampón de elución (EB) y dodecilsulfato de sodio (SDS) en las etapas de elución. Se han tomado imágenes de control después de cada tinción (etapas de obtención de imágenes 1 a 4), para verificar la detección específica del biomarcador dirigido (ER, PR, CK y HER2), y después de cada etapa de elución del siguiente ciclo, para verificar la eliminación completa del Abs antes de teñir el siguiente biomarcador del que han de obtenerse imágenes en la siguiente etapa de obtención de imágenes. Con el fin de obtener imágenes y volver a teñir el mismo portaobjetos, se ha empleado una solución de montaje basada en glicerol (SlowFade Gold). Las imágenes consecutivas obtenidas durante este procedimiento se presentan en la Figura 4 y se muestra la imagen de muestra después de cada tinción (A, C, E y G) y la etapa de elución (B, D y F) para demostrar tanto la tinción como la eficiencia de elución.

Tabla 2

	Etapas	Reactivo	Duración de flujo (s)	Tiempo de incubación (s)	Tiempo de etapa (s)
Preparación de muestra	Desparafinado	Histoclear™	-	-	600
	Rehidratación	Etanol de 100 % a 0 %			120
	Recuperación de antígenos	pH 9 Tris/EDTA			2400

ES 2 799 705 T3

	Etapas	Reactivo	Duración de flujo (s)	Tiempo de incubación (s)	Tiempo de etapa (s)
Multiplexación (n=4)	Ciclo 1				
	Etapas de marcado de muestra	Ab primario (1) Ratón anti-ER, dil 1/50	10	240	250
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
		Ab secundario (1) Alexa Fluor 546 antirratón de cabra IgG, dil. 1/40	10	240	250
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
	Etapas de obtención de imágenes 1	Contrateñido SlowFade Gold + DAPI	-	-	0
	Ciclo 2				
	Etapas de elución S1'	Tampón de elución EB+SDS 0,5 %	10	240	250
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
	Etapas de marcado de muestra 2	Ab primario (2) Ratón anti-CK, dil 1/100	10	120	130
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
		Ab secundario (2) Alexa Fluor 647 antirratón de cabra IgG, dil. 1/40	10	120	130
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
	Etapas de obtención de imágenes 2	= idéntica a la etapa de obtención de imágenes 1			
	Ciclo 3				
	Etapas de elución S1''	= idem que S1'			
	Etapas de marcado de muestra 3	Ab primario (3) Ratón anti-PR, dil 1/100	10	240	250
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
		Ab secundario (3) Alexa Fluor 647 antirratón de cabra IgG, dil. 1/40	10	240	250
		Tampón de lavado: PBS	10	-	10
	Etapas de obtención de imágenes 3	= idéntica a la etapa de obtención de imágenes 1			
	Ciclo 4				
	Etapas de elución S1'''	= idéntica a S1'			
	Etapas de marcado de muestra 4	Ab primario (4) Conejo anti-HER2, dil 1/250	10	120	130
Tampón de lavado: PBS		10	-	10	
Ab secundario (4) Alexa Fluor 594 antirratón de cabra IgG, dil. 1/40		10	120	130	
Tampón de lavado: PBS		10	-	10	
Etapas de obtención de imágenes 4	= idéntica a la etapa de obtención de imágenes 1				
	Multiplexación total	220	2160	2380	

5 Los resultados muestran que un procedimiento de multiplexación según la invención permite ventajosamente la obtención de tinciones colocalizadas multiplexadas para diversos biomarcadores en la misma muestra biológica con alta eficiencia de tinción y contrastes, en el que la tinción se lleva a cabo selectivamente en los biomarcadores de interés sin interacción entre los diferentes reactivos de obtención de imágenes para los diversos biomarcadores y en un tiempo de experimentación total limitado de aproximadamente 40 minutos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtención de imágenes *in situ* de muestras mediante multiplexación cíclica que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una muestra inmovilizada en un soporte de muestra;
- (ii) proporcionar un dispositivo microfluídico que comprende una cámara microfluídica, al menos una entrada de fluido en un extremo de dicha cámara microfluídica y al menos una salida de fluido en otro extremo de dicha cámara microfluídica configurada para conducir un fluido suministrado desde un sistema de alimentación de fluido a presión a través de la cámara microfluídica para el transporte advectivo de sustancias fluidicas y reactivos dentro de dicha cámara microfluídica de manera uniforme, en el que al menos una pared de la cámara microfluídica está formada por el soporte de muestra y en el que el volumen de la cámara microfluídica es de 2,5 μl y 200 μl ;
- (iii) montar dicho soporte de muestra sobre dicha cámara microfluídica con la muestra orientada al interior de la cámara microfluídica
- (iv) inyectar en secuencia una pluralidad de reactivos, incluyendo al menos una sonda de obtención de imágenes, a través de la entrada de fluido en la cámara microfluídica, a un caudal en un intervalo entre 1 $\mu\text{l/s}$ y 100 $\mu\text{l/s}$;
- (v) obtener imágenes de una señal emitida por componentes de la muestra que reaccionó con dicha al menos una sonda de obtención de imágenes;
- (vi) repetir las etapas (iv) y (v) con diferentes sondas de obtención de imágenes;

en el que dicha inyección en secuencia de una pluralidad de reactivos incluye:

- una etapa de elución en la que se inyecta un tampón de elución para eliminar material no deseable que permanece potencialmente en la muestra; (S1)
- una etapa de bloqueo de enlace no específico en la que se inyecta un tampón de bloqueo; (S2)
- una etapa de marcado de muestra en la que se inyecta una sonda de obtención de imágenes; (S3) y - una etapa de preobtención de imágenes opcional en la que se inyecta un tampón de obtención de imágenes, en la que cada una de estas etapas puede ir precedida y/o seguida de una etapa de lavado opcional en la que se inyecta un tampón de lavado, (S4)

en el que dicha al menos una sonda de obtención de imágenes resulta de la inyección de una secuencia de anticuerpos específicos como sondas de marcado y moléculas de detección cromógenas o fluorescentes, dirigidas a las entidades moleculares que han de ser analizadas dentro de dicha muestra.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada etapa en la secuencia de la pluralidad de reactivos inyectada comprende para cada reactivo, dos etapas de caudal:

- una primera etapa de caudal en la que el reactivo se inyecta a un caudal inicial en un intervalo entre 1 $\mu\text{l/s}$ y 100 $\mu\text{l/s}$;
- una segunda etapa de caudal en la que se inyecta el mismo reactivo a un flujo inferior (típicamente de 0,001 a 1,0 $\mu\text{l/s}$) para asegurar la incubación de dicho reactivo con la muestra, antes de inyectar el siguiente reactivo en la secuencia.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2 en el que la primera etapa de caudal dura de 1 s a 120 s.

4. Un procedimiento según la reivindicación 2 o 3 en el que la segunda etapa de caudal de un reactivo dura de 1 minuto a 30 minutos.

5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de marcado de muestra comprende una primera etapa en la que se inyecta un anticuerpo primario (S3'), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S3'') y una etapa adicional en la que se inyecta un anticuerpo secundario (S3''').

6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de inyectar en secuencia una pluralidad de reactivos incluye:

- una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S0);
- una etapa de bloqueo de enlace no específico (S2) en la que se inyecta un tampón de bloqueo; - una etapa de marcado de muestra en la que se inyecta una sonda de obtención de imágenes (S3);
- una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S3a);
- una etapa de preobtención de imágenes opcional (S4) en la que se inyecta un tampón de obtención de imágenes, en el que la etapa de marcado de muestra comprende una primera etapa en la que se inyecta un anticuerpo primario (S3'), una etapa de lavado en la que se inyecta un tampón de lavado (S3'') y una etapa adicional en la que se inyecta un anticuerpo secundario (S3''').

7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la etapa de marcado de muestra comprende inyectar al menos una sonda marcada, tal como para hibridación *in situ* con algo de material de ADN/ARN

dentro de la muestra, tal como una sonda de ARN o ADN marcada.

5 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa de marcado de muestra comprende además aplicar ciclos de temperatura dentro de la cámara microfluídica para hibridar material de ADN/ARN dentro de la muestra con las sondas de ARN o ADN.

9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de obtención de imágenes (v) se realiza mediante microscopía de fluorescencia o microscopía de campo claro.

10 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el procedimiento comprende al menos 2 a 80 ciclos de etapas (iv) a (v).

15 11. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que, en la etapa (vi), la etapa de elución se lleva a cabo mientras se aplica un ciclo de temperatura para asegurar la eliminación de sondas o marcadores hibridados *in situ* no deseables que permanecen potencialmente en la muestra antes de repetir el procedimiento con otra etapa de marcado de muestra.

20 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que está presente dicha etapa de preobtención de imágenes.

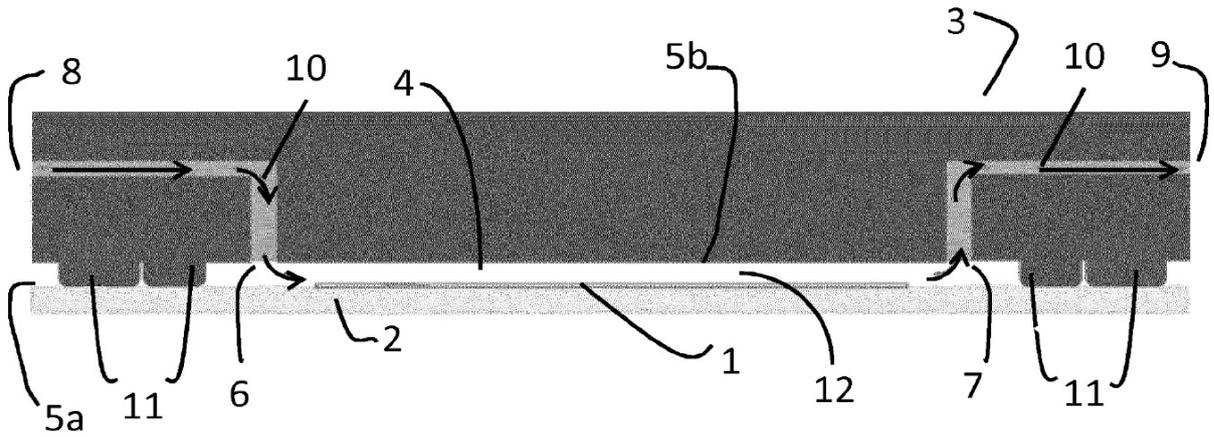


Figura 1

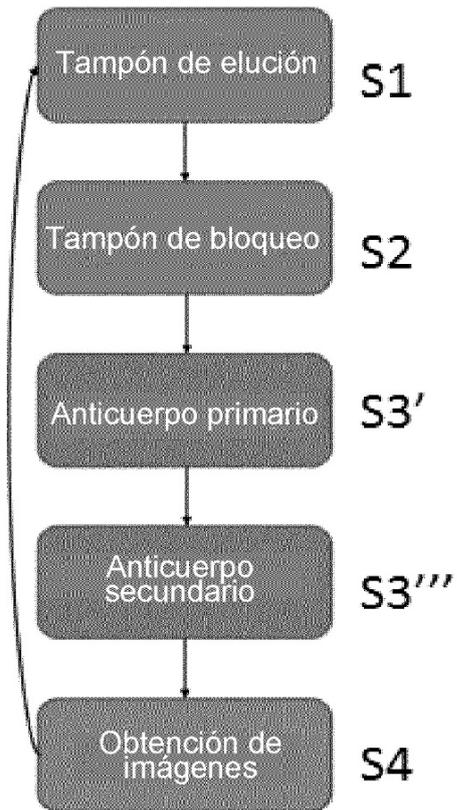


Figura 2A

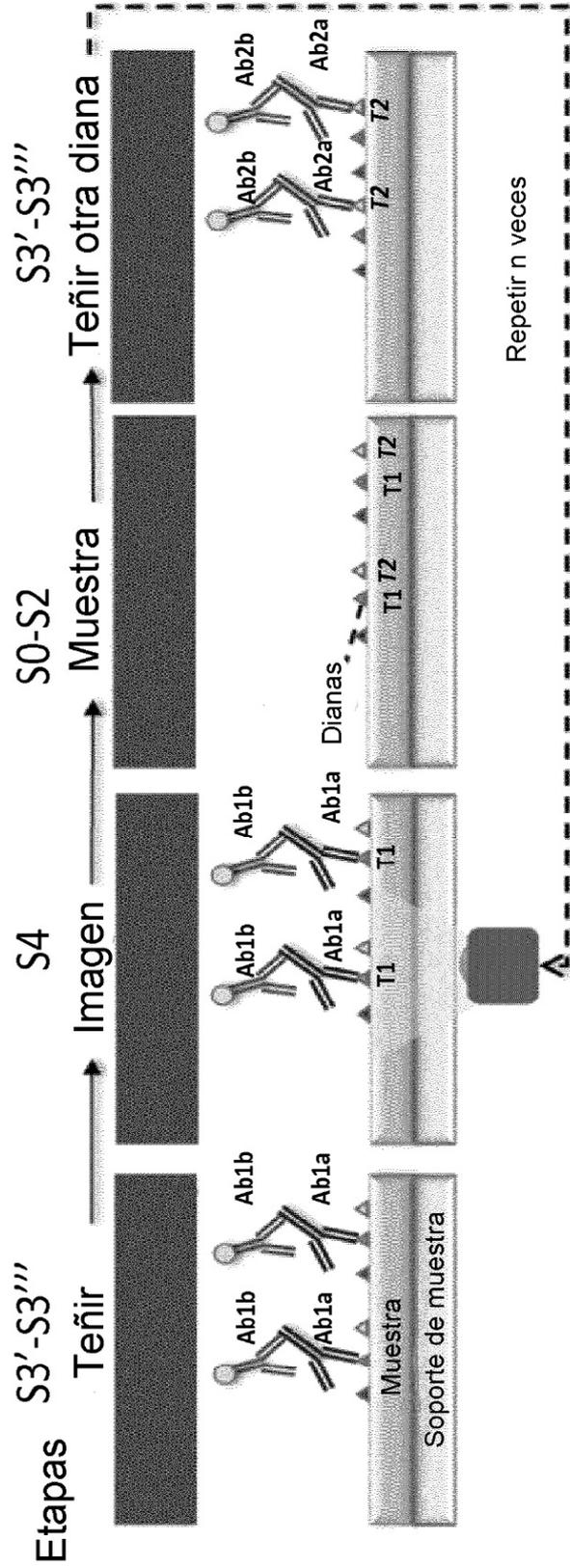
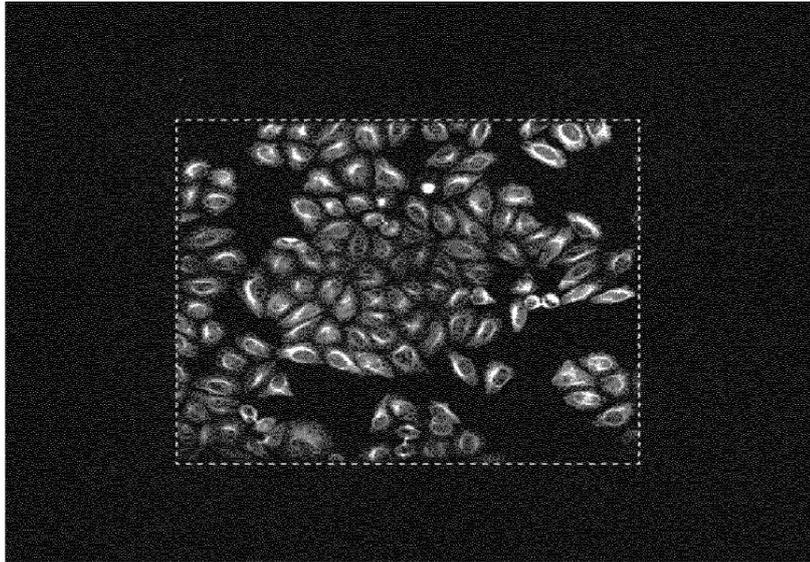


Figura 2B

A



B

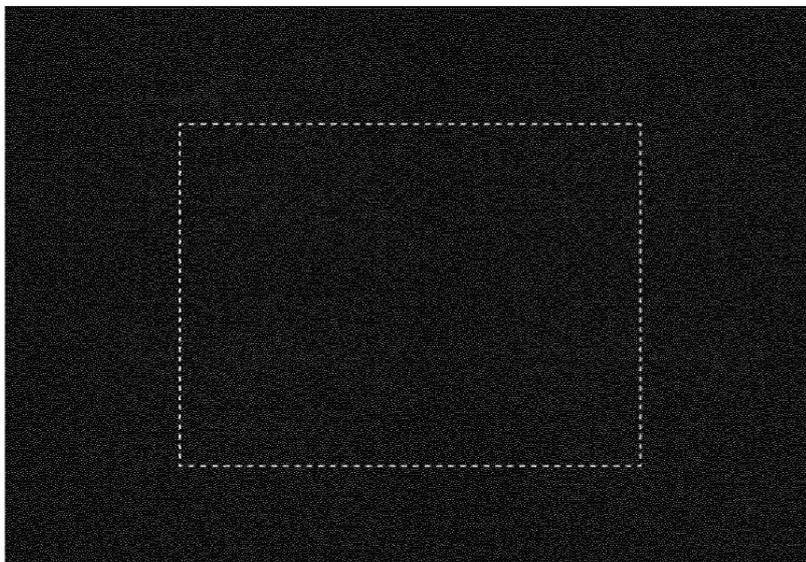


Figura 3

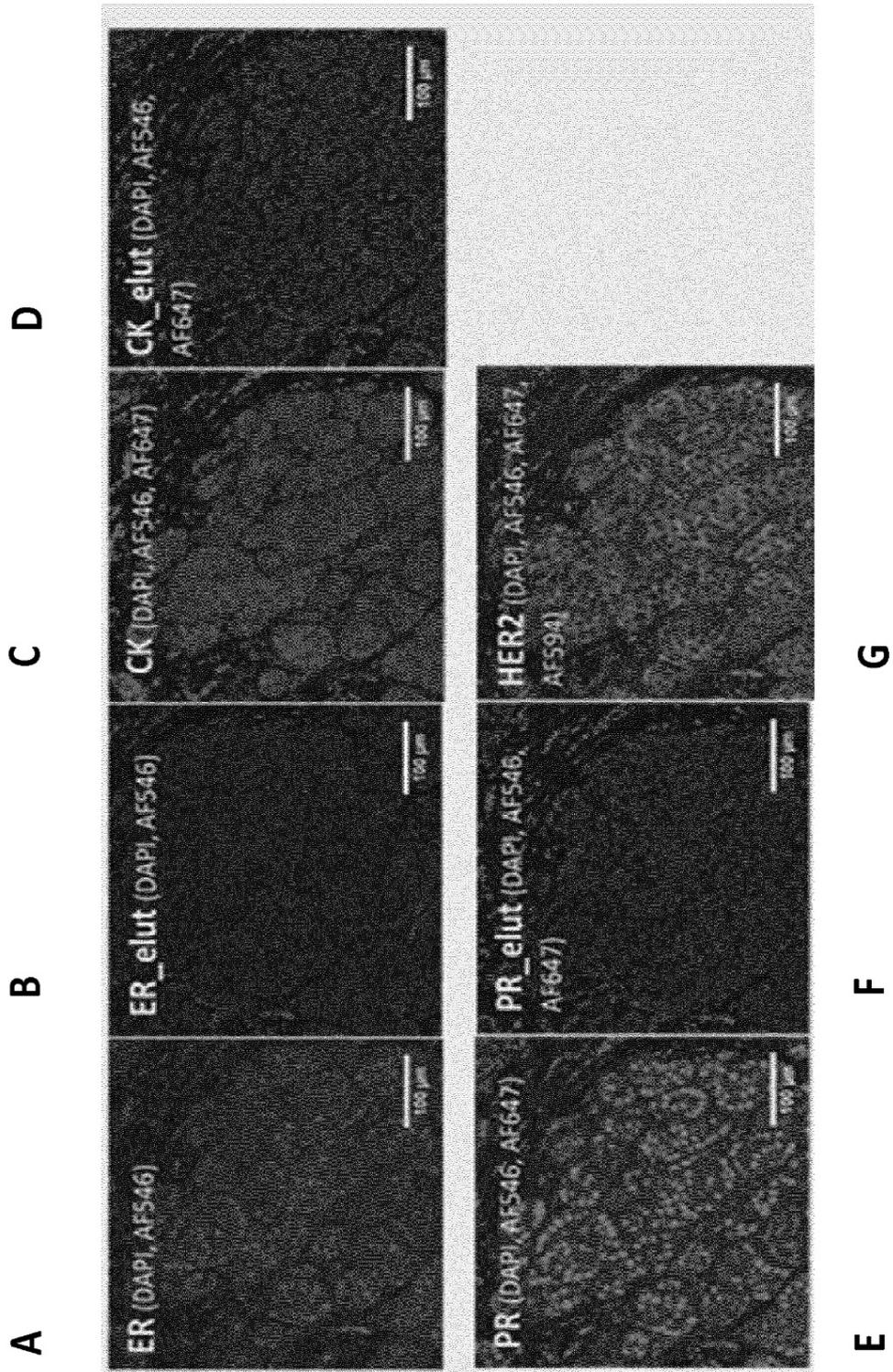


Figura 4