

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 464**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011 PCT/US2011/067481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 11813853 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2659000**

54 Título: **Deposición potenciada de cromógenos utilizando análogos de pirimidina**

30 Prioridad:

30.12.2010 US 201061460349 P

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

09.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MAY, ERIC, J.;
MURILLO, ADRIAN, E. y
KOSMEDER, JEROME, W.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 593 464 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

Deposición potenciada de cromógenos utilizando análogos de pirimidina

5 Campo

Esta descripción se refiere a novedosas composiciones que contienen análogos de pirimidina para su uso en el aumento de la deposición de restos detectables sobre moléculas diana en un tejido.

10 Antecedentes

Los métodos de tinción celular, incluyendo inmunohistoquímica (IHC) y análisis de hibridación *in situ* (ISH), son herramientas útiles en diagnóstico histológico y el estudio de la morfología tisular. IHC emplea agentes o restos de unión específica, tales como anticuerpos, para detectar un antígeno de interés que puede estar presente en una muestra tisular. IHC se usa ampliamente en aplicaciones clínicas y de diagnóstico, tales como para diagnosticar patologías o afecciones particulares. Por ejemplo, pueden diagnosticarse tipos particulares de cáncer basándose en la presencia de una molécula marcadora particular en una muestra obtenida de un sujeto. IHC se usa también ampliamente en investigación básica para comprender la distribución y localización de biomarcadores en diferentes tejidos. Las muestras biológicas también pueden examinarse usando técnicas de hibridación *in situ*, tales como hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH) e hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), colectivamente mencionadas como ISH. ISH es distinta de IHC, en que ISH detecta ácidos nucleicos en tejido mientras que IHC detecta proteínas.

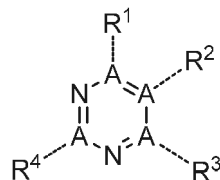
Para ensayos *in situ* tales como ensayos IHC y ensayos ISH de muestras tisulares y citológicas, especialmente ensayos combinados de dichas muestras, es muy deseable identificar y desarrollar métodos que proporcionen resultados deseables sin interferencia del fondo. Uno de dichos métodos implica el uso de amplificación de señal de tiramida (TSA), que se basa en la deposición de indicador catalizado (CARD), patentada. La patente de Estados Unidos n.º 6.593.100, titulada "Enhanced catalyzed reporter deposition" describe la potenciación de la catálisis de una enzima en un método CARD o TSA haciendo reaccionar un conjugado de fenol marcado con una enzima, donde la reacción se realiza en presencia de un reactivo potenciador.

Aunque se han empleado métodos, tales como los descritos anteriormente, para aumentar las señales obtenidas desde los ensayos, los resultados de estos métodos indican que la amplificación de la señal se altera por la amplificación correspondiente de la señal de fondo. Por tanto, existe la necesidad continuada de amplificación de señales que pueda producir resultados óptimos sin un aumento correspondiente en las señales de fondo.

Sumario

La presente descripción se refiere a un método para detectar una diana en una muestra depositando de forma proximal un marcador, que comprende: poner en contacto la muestra con una solución de reconocimiento, incluyendo la solución de reconocimiento un resto de unión específica que es específico para la diana; marcar el resto de unión específica con una enzima; poner en contacto la muestra con una solución de detección, comprendiendo la solución de detección un sustrato enzimático de modo que el marcador se deposite de forma proximal a la diana en presencia de un potenciador de deposición que tiene una fórmula

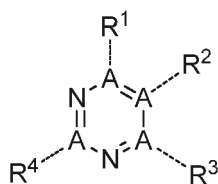
45



en la que R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo e hidrógeno; R¹ y/o R³ pueden estar unidos a R² para formar un sistema de anillo aromático condensado; A se selecciona de un átomo de carbono, un heteroátomo diferente de azufre y cualquier combinación de los mismos. Con referencia a este método, el contacto de la muestra con una solución de detección puede incluir oxidar enzimáticamente el sustrato enzimático usando un agente oxidante para formar el marcador. En realizaciones descritas particulares, la oxidación enzimática del sustrato enzimático usando un agente oxidante comprende reducir la solubilidad o estabilidad del sustrato enzimático de modo que el sustrato enzimático quede depositado como el marcador.

55

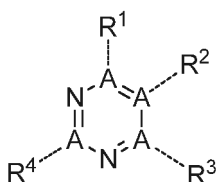
En realizaciones descritas particulares, el sustrato enzimático se selecciona del grupo que consiste en un cromógeno y un conjugado con tiramida y el potenciador de deposición puede tener una fórmula,



en la que R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan de hidrógeno e hidroxilo y cada A es un átomo de carbono. En ciertas realizaciones descritas R^1 , R^3 y R^4 son hidrógeno y R^2 es hidroxilo.

5

Otros ejemplos del potenciador de deposición incluyen aquellos que tienen una fórmula,



10 en la que R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno, alquino, hidrógeno, yodo, bromo, cloro, flúor y combinaciones de los mismos.

Realizaciones descritas particulares se refieren al uso de una enzima que puede ser una oxidorreductasa o una peroxidasa. Adicionalmente, la enzima puede seleccionarse de peroxidasa de rábano rusticano, glutatión peroxidasa y microoxidasa. El resto de unión específica descrito típicamente comprende un anticuerpo o un ácido nucleico.

15

Con referencia al método descrito, la deposición del marcador de forma proximal a la diana en presencia del potenciador de deposición incluye el potenciador de deposición a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

20

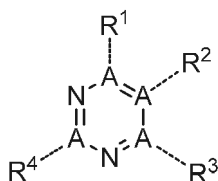
En realizaciones descritas particulares, el sustrato enzimático puede seleccionarse de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un colorante BODIPY, una resorufina, una rodamina, o un derivado de los mismos. Más típicamente, el sustrato enzimático es un derivado de tiramina.

25

Quando la muestra se pone en contacto con una solución de detección, típicamente se expone al sustrato enzimático a una concentración que varía de más de 0 mM a aproximadamente 8 mM. Además, la solución de detección puede comprender adicionalmente un acelerador seleccionado de un grupo heteroarilo, un ácido borónico, un compuesto fenólico o una combinación de los mismos. El compuesto heteroarilo puede seleccionarse de imidazol, L-histidina, *N*-óxido de piridina, *N*-óxido de pirimidina, óxido de *N*-metilmorfolina y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo. Además, la solución de detección puede comprender adicionalmente un tensioactivo no iónico seleccionado de un lauril éter de polioxietileno que tiene una fórmula $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$; monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, el monoalquilato que comprende entre 8 y 14 carbonos; un polioxietileno de alcohol secundario lineal que tiene una fórmula $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O)_x$, en la que x es igual a un número entero entre 2 y 12; y octil fenil éter de polioxietileno. En realizaciones descritas particulares, la solución de detección puede comprender adicionalmente un antioxidante seleccionado de bisulfato de sodio, estannato de sodio, metabisulfato de sodio y combinaciones de los mismos, y/o una sal que contiene un metal de Grupo I o Grupo II que tiene una fórmula MX_2 o MX donde M es un metal del Grupo I o Grupo II seleccionado de litio, sodio, potasio, cesio, calcio, magnesio, estroncio y bario; y X se selecciona de fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, hidróxido y fosfato.

30

También se contempla en la presente descripción una composición para detectar una diana en una muestra por deposición proximal de un marcador, que comprende un potenciador de deposición que tiene una fórmula,



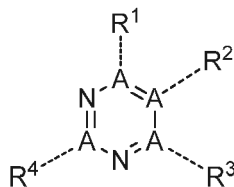
45

en la que R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de un resto alifático, arilo, halógeno, uno que contiene heteroátomo e hidrógeno; R^1 y/o R^3 puede estar unido a R^2 para formar un sistema de anillo aromático condensado;

A se selecciona de un átomo de carbono, un heteroátomo diferente de azufre y cualquier combinación de los mismos; y un sustrato enzimático.

En ciertas realizaciones descritas, el potenciador de deposición tiene la fórmula

5



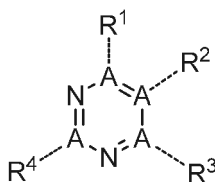
10 en la que R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan de un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo e hidrógeno; R^1 y/o R^3 pueden estar unidos a R^2 para formar un sistema de anillo aromático condensado; A se selecciona de heteroátomo, diferente de azufre, un átomo de carbono y combinaciones de los mismos. Típicamente, el potenciador de deposición puede tener una concentración que varía de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM y el sustrato enzimático tiene una concentración que varía de más de 0 mM a aproximadamente 8 mM, seleccionándose el sustrato enzimático de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un colorante BODIPY, una resorufina, una rodamina, una tiramida o un derivado de los mismos.

15

En realizaciones descritas particulares, la composición puede comprender adicionalmente un acelerador seleccionado de un compuesto heteroarilo, un ácido borónico, un compuesto fenólico o una combinación de los mismos; un tensioactivo no iónico seleccionado de Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™, y Triton™; y un antioxidante seleccionado de bisulfato de sodio, estannato de sodio, metabisulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

20

También se describió un kit, que comprende una solución de detección, que comprende un potenciador de deposición y un sustrato enzimático, teniendo el potenciador de deposición una fórmula,

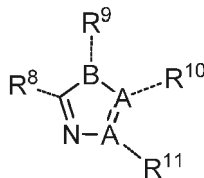


25

30 en la que R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo e hidrógeno; R^1 y/o R^3 pueden estar unidos a R^2 para formar un sistema de anillo aromático condensado; A se selecciona de un átomo de carbono, un heteroátomo diferente de azufre y cualquier combinación de los mismos.

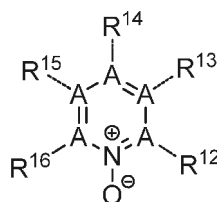
30

En realizaciones particulares, el compuesto de heteroarilo tiene una fórmula de acuerdo con

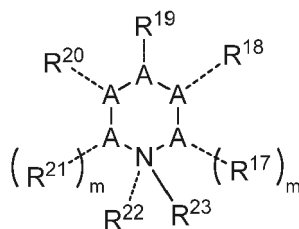


35

y/o una fórmula de acuerdo con

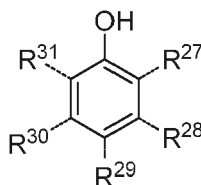


y/o una fórmula de acuerdo con



- 5 en la que $R^8 - R^{22}$ son independientemente un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo, hidrógeno o cualquier combinación de los mismos; R^{23} es $[O^-]$ u $[O^-]$; A es un átomo de carbono, un heteroátomo diferente de azufre o cualquier combinación de los mismos; B es oxígeno, carbono o nitrógeno; y m es 0-2. El halógeno puede seleccionarse de yodo, bromo, cloro y flúor, y el resto que contiene heteroátomo puede seleccionarse de hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida, NR^6R^7 donde R^6 y R^7 con independientemente hidrógeno, grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares, R^{17} y R^{21} comprenden cada uno un grupo metilo y m es 2. Compuestos heteroarilo ejemplares incluyen, aunque sin limitación, imidazol, L-histidina, N-óxido de piridina, N-óxido de pirimidina, óxido de N-metil morfolina y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo.
- 10
- 15 En realizaciones particulares, el potenciador opcional es un compuesto que contiene boro, tal como un ácido borónico orgánico. Ácidos borónicos orgánicos ejemplares incluyen, aunque sin limitación ácido bórico.

En realizaciones particulares, el potenciador opcional es un compuesto fenólico que tiene una fórmula



- 20 en la que R^{27} , R^{28} , R^{29} , R^{30} y R^{31} pueden seleccionarse independientemente de hidrógeno, alifático, arilo, un resto que contiene heteroátomo o cualquier combinación de los mismos. El resto que contiene heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida y NR^5R^6 donde R^5 y R^6 son independientemente hidrógeno, grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares, dos grupos adyacentes cualesquiera seleccionados de R^{27} , R^{28} , R^{29} , R^{30} y R^{31} pueden estar unidos para formar un sistema de anillo aromático o no aromático condensado. Compuestos fenólicos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, pirocatecol.
- 25
- 30 En realizaciones particulares, el presente método puede comprender adicionalmente: inmovilizar el conjugado de resto de unión específica-enzima sobre la diana en la muestra; poner en contacto la muestra con una solución que comprende un conjugado de tiramida-hapteno; poner en contacto la muestra con la solución potenciadora; poner en contacto la muestra con el oxidante; y localizar la diana en la muestra detectando el conjugado de tiramida-hapteno. En realizaciones particulares, la detección del conjugado de tiramida-hapteno comprende adicionalmente: poner en contacto la muestra con un anticuerpo antihapteno capaz de reconocer y unirse al conjugado de tiramida-hapteno y un resto detectable capaz de detectarse usando técnicas de deposición o fluorescentes; y detectar el resto detectable. En realizaciones particulares, el conjugado de tiramida-hapteno comprende un hapteno conjugado directamente a tiramida o mediante un enlazador. Típicamente, el enlazador es alifático o heteroalifático.
- 35
- 40 Lo anterior y las características y ventajas de esa descripción llegarán a ser más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que prosigue con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- 45 La FIG. 1 es una imagen digital que muestra la tinción IHC de bcl2 sobre tejido de amígdala usando un kit de detección convencional ultraView™.
- La FIG. 2 es una imagen digital que muestra el uso de imidazol 10 nM como tampón básico en la solución de tinción con diaminobencidina (DAB) para tinción IHC de bcl2 en tejido de amígdala.
- 50 La FIG. 3 es un gráfico que muestra la influencia de ácido 4-acetilamidofenil borónico sobre la $V_{máx}$ aparente para DAB oxidada por HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.
- La FIG. 4 es un gráfico que muestra la influencia de imidazol sobre la $V_{máx}$ aparente para DAB oxidada con

peroxidasa de rábano rusticano (HRP-) cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra la influencia de L-histidina sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la influencia de ácido bórico sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la influencia de pirimidina sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra la influencia de 2-hidroxipirimidina sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra la influencia de potenciadores potenciales sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade secuencialmente al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 10 es una imagen digital de tinción con DAB ultraView™ de tejido bcl2 (amígdala) usando una solución cromogénica de DAB basada en imidazol 10 mM.

La FIG. 11 es una imagen digital de tinción DAB ultraView™ de tejido bcl2 usando una solución cromogénica de DAB basada en L-histidina 10 mM.

La FIG. 12 es una imagen digital de tinción DAB ultraView™ de tejido bcl2 usando una solución cromogénica de DAB basada en *N*-óxido de pirimidina 10 mM en L-histidina 10 mM.

La FIG. 13 es una imagen digital de tinción DAB ultraView™ de tejido bcl2 usando una solución cromogénica de DAB basada en 2-hidroxipirimidina 10 mM en L-histidina 10 mM.

Las FIG. 14-17 son imágenes digitales de tinción IHC de bcl2 en tejido de amígdala usando un kit de detección convencional VMSI ultraView™ o sin "soluciones potenciadoras" de DAB. Soluciones potenciadoras de DAB: FIG. 14: sin potenciación; FIG. 15: imidazol 100 mM, ácido bórico 50 mM; FIG. 16: L-histidina 50 mM, pirimidina 10 mM; FIG. 17: L-histidina 10 mM, 2-hidroxipirimidina 10 mM, cloruro cálcico 10 mM, ácido bórico 10 mM. La valoración patológica para la señal/fondo fue: FIG. 14, 3,75/0,5; FIG. 15, 4,0/0,75; FIG. 16, 4+/0,5; FIG. 17, 4/0,5.

La FIG. 18 es un gráfico que muestra la influencia de soluciones cromogénicas de DAB de imidazol y L-histidina sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se combina con pirimidina 10 mM. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 19 es un gráfico que muestra la influencia de soluciones cromogénicas de DAB de imidazol y L-histidina sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se combina 2-hidroxipirimidina 10 mM, ácido bórico 10 mM y cloruro cálcico 10 mM. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 20 es un gráfico que muestra la influencia de potenciadores sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada con HRP cuando se combina con imidazol 50 mM, cloruro cálcico 10 mM y ácido bórico 10 mM. La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 21 es una imagen digital de tinción ISH de DAB de la sonda HER-2 sobre xenoinjertos de ratón 3 en 1 HER-2 de líneas celulares de carcinoma CaLu3 HER-2 positivas con el sistema de detección ultraView™.

La FIG. 22 es una imagen digital de tinción ISH de DAB de la sonda HER-2 sobre xenoinjertos de ratón 3 en 1 HER-2 de líneas celulares de carcinoma CaLu3 HER-2 positivas con una solución cromogénica de DAB y potenciación con L-histidina 10 mM.

Las FIG. 23-26 son imágenes digitales de la tinción IHC de bcl2 sobre tejido de amígdala usando el sistema de amplificación de tiramida con y sin potenciación de oxidación con HRP para la deposición tanto de tiramida como de DAB. FIG. 23: sin potenciación para deposición de tiramida o DAB; FIG. 24: sin potenciación de deposición de tiramida, deposición potenciada de DAB; FIG. 25: potenciador de deposición de tiramida, sin deposición potenciada de DAB; FIG. 26: potenciación de la deposición de tiramida y DAB.

Las FIG. 27-28 son imágenes digitales de tinción IHC de bcl2 sobre tejido de amígdala usando el sistema de amplificación de tiramida para deposición de tiramida con 2-hidroxipirimidina 10 mM (FIG. 27) y sin potenciación de oxidación con HRP (FIG. 28).

La FIG. 29 es una imagen digital de tinción ISH del ribosoma 18s sobre tejidos de xenoinjerto CaLu3 con ribosonda 18s y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10mM como con L-histidina 10 mM.

La FIG. 30 es una imagen digital de tinción ISH de ribosoma 18s sobre tejidos de xenoinjerto CaLu3 con ribosonda 18s y sin potenciación.

La FIG. 31 es una imagen digital de tinción IHC de HPV sobre tejidos de xenoinjerto CaSki con sonda HPV haptenilada y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10mM como con L-histidina 10 mM.

La FIG. 32 es una imagen digital de tinción IHC de HPV sobre tejidos de xenoinjerto CaSki con sonda HPV haptenilada y sin potenciación.

La FIG. 33 es una imagen digital de tinción IHC de HPV sobre tejidos de xenoinjerto HeLa con sonda HPV haptenilada y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10mM como con L-histidina 10 mM.

La FIG. 34 es una imagen digital de tinción IHC de HPV sobre tejidos de xenoinjerto HeLa con sonda HPV haptenilada y sin potenciación.

La FIG. 35 es una imagen digital de tinción IHC de HPV sobre tejidos de xenoinjerto C33 con sonda HPV haptenilada y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10mM como con L-histidina 10 mM.

La FIG. 36 es una imagen digital de tinción IHC de HPV sobre tejidos de xenoinjerto C33 con sonda HPV haptenilada y sin potenciación.

La FIG. 37 es una imagen digital de tinción IHC de CD20 sobre tejidos de amígdala con sonda anti-CD20 y DAB

potenciada tanto con 2-hidroxipiridina 10mM como con L-histidina 10 mM.

La FIG. 38 es una imagen digital de tinción IHC de CD20 sobre tejidos de amígdala con sonda anti-CD20 y sin potenciación.

La FIG. 39 es una imagen digital de tinción IHC de CD20 sobre tejidos de amígdala con sonda anti-CD20 y deposición de AEC potenciada con L-histidina 50 mM y 2-hidroxipiridina 10 mM.

La FIG. 40 es una imagen digital de tinción IHC de CD20 sobre tejidos de amígdala con sonda anti-CD20 y sin potenciación.

La FIG. 41 es una imagen digital de tinción IHC de Ki67 sobre tejidos de amígdala con sonda anti-Ki67 y deposición de AEC potenciada con L-histidina 50 mM y 2-hidroxipiridina 10 mM.

La FIG. 42 es una imagen digital de tinción IHC de Ki67 sobre tejidos de amígdala con sonda anti-Ki67 y sin potenciación.

Las FIG. 43-46 son imágenes digitales de la tinción IHC de bcl2 sobre tejido de amígdala usando sistema de amplificación de tiramida con y sin potenciación de oxidación con HRP para la deposición tanto de tiramida como de DAB. FIG. 43: sin potenciación para deposición de tiramida o DAB; FIG. 44: sin potenciación de la deposición de tiramida, deposición de DAB potenciada; FIG. 45: potenciación de la deposición de tiramida, sin deposición de DAB potenciada; FIG. 46: potenciación de la deposición de tiramida y DAB.

Descripción detallada

I. Introducción

Las enfermedades, tales como el cáncer, pueden diagnosticarse por varios métodos diferentes. Un método es identificar la presencia de un biomarcador, tal como un biomarcador de cáncer, en tejido o células, estando correlacionado el biomarcador, o creyéndose que está correlacionado, con un tipo de cáncer particular. A veces se usa inmunohistoquímica para abordar biomarcadores proteicos que están asociados con un tipo particular de cáncer, mientras que a veces se emplean técnicas de hibridación *in situ* para abordar secuencias de ácido nucleico que están asociadas con un tipo particular de cáncer.

Los métodos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para la identificación dirigida cada vez van siendo más importantes en aplicaciones de investigación y para los médicos, por ejemplo, con fines de diagnóstico y/o pronóstico. Sin embargo, estas técnicas pueden estar limitadas por la señal detectable emitida por un resto de detección que interacciona o se deposita sobre la molécula diana presente o que se cree que está presente en una muestra tisular, tal como una molécula diana proteica y/o de ácido nucleico. Teóricamente, un modo para aumentar la señal obtenida es aumentar la deposición de un resto detectable sobre la molécula diana, por ejemplo, aumentando la tasa de deposición, de modo que pudiera obtenerse una mayor señal en una cantidad más corta de tiempo.

Como se describe en este documento, una novedosa formulación de un cromógeno DAB actúa de forma sinérgica para proporcionar deposición maximizada de DAB durante tinción tisular IHC o ISH. La novedosa formulación del cromógeno DAB utiliza un potenciador orgánico como sal tamponante en combinación con una diversidad de potenciadores orgánicos/inorgánicos y tensioactivo para maximizar de forma sinérgica la deposición de DAB y, por lo tanto, la señal. También se describen en este documento métodos de uso de las formulaciones descritas para potenciar la tinción tisular IHC y/o ISH.

Los métodos descritos en este documento encuentran utilidad para diagnóstico, donde los resultados proporcionados por los métodos descritos se usan no solamente para el diagnóstico, sino también para determinar el tratamiento óptimo y rastrear la progresión y éxito de dicho tratamiento, en un entorno clínico.

II. Términos

Salvo que se aprecie de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000; Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Publishers, 1994; Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995; y George P. Rédei, *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics*, 2ª Edición, 2003.

Las formas singulares "uno", "una" y "el", "la", se refiere a uno o más de uno, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "que comprende una célula" incluye una única célula o múltiples células y se considera equivalente a la expresión "que comprende al menos una célula". El término "o" se refiere a un único elemento de elementos alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Una línea ondulada ("~~~~"), se usa para indicar una desconexión de enlace y una línea discontinua ("---") se usa para ilustrar que puede formarse un enlace en una posición particular.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento para poner en práctica o ensayar la tecnología descrita, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los

materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Se proporcionan las siguientes explicaciones de términos y métodos para describir mejor la presente descripción y guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente descripción.

5 Alifático: Restos que incluyen grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo halogenado y cicloalquilo. Un grupo "alifático inferior" es un grupo alifático ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Este término abarca compuestos alifáticos sustituidos, compuestos alifáticos saturados y compuestos alifáticos insaturados.

10 Alquilo: Un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Un grupo "alquilo inferior" es un hidrocarburo ramificado o no ramificado saturado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Las expresiones "alquilo halogenado" o "grupo haloalquilo" se refieren a un grupo alquilo definido anteriormente con uno o más átomos de hidrógeno presentes en estos grupos sustituidos con un halógeno (F, Cl, Br, I). El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo basado en carbono no aromático compuesto de al menos tres átomos de carbono. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, aunque sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

20 La expresión "grupo heterocicloalquilo" es un grupo cicloalquilo donde al menos uno de los átomos de carbono del anillo está sustituido con un heteroátomo tal como, aunque sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. Grupos opcionalmente sustituidos, tales como "alquilo sustituido", describe grupos, tales como un grupo alquilo, que tiene 1-5 sustituyentes, normalmente 1-3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, arilo, carboxialquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, cicloalquenilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, tiol y tioalcoxi.

25 Amplificación: Amplificación se refiere al acto o resultado de hacer más fuerte una señal. La amplificación puede ser un aumento en la magnitud de la señal y/o un aumento en la señal relativa al fondo, por ejemplo, relación aumentada de señal a ruido.

30 Anticuerpo: Se refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas tipo inmunoglobulina (incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y combinaciones de las mismas, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares) a la exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo 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).

40 Más particularmente, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos pueden estar compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, llamada la región pesada variable (V_H) y la región ligera variable (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

45 Anticuerpos incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y partes de las mismas bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos proteolíticos de anticuerpo [tales como fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab'_2 , fragmentos Fab' -SH y fragmentos Fab que son conocidos en la técnica], fragmentos recombinantes de anticuerpo (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos $F(ab')_2$, proteínas Fv de cadena sencilla ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas por disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (que son conocidos en la técnica), y anticuerpos de camélido (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.015.695; 6.005.079; 5.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina se unen mediante un enlazador, mientras que en dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas modificadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

60 Normalmente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas y cadenas ligeras interconectadas por enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda y kappa. Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

65

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable; las regiones también son conocidas como "dominios". En combinación, las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "flanqueante" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La extensión de la región flanqueante y las CDR se han definido (véase, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat ahora se mantiene en línea. Las secuencias de las regiones flanqueantes de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región flanqueante de un anticuerpo, es decir, las regiones flanqueantes combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena normalmente se mencionan como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente empezando desde el extremo N-terminal, y también se identifican normalmente por la cadena en que está localizada la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V_H está localizada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra.

Antígeno: Una molécula que estimula una respuesta inmunitaria. Los antígenos son habitualmente proteínas o polisacáridos. Un epítipo es un determinante antigénico compuesto de grupos químicos o secuencias peptídicas en una molécula que provoca una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un antígeno o epítipo particular. La unión de un anticuerpo a un antígeno o epítipo de un antígeno particular puede usarse para localizar la posición del antígeno, por ejemplo, en o sobre una muestra biológica, o para determinar si el antígeno particular está presente en una muestra biológica. Un antígeno de interés es un antígeno para detectar en un ensayo IHC diseñado en una muestra de ensayo. Por ejemplo, para detectar un antígeno de interés, el anticuerpo primario usado en el ensayo IHC se une específicamente al antígeno de interés.

Un epítipo es un sitio sobre una molécula diana (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína o molécula de ácido nucleico) al que se une una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, proteína estructural que contiene regiones de unión a anticuerpo, o aptámero). Los epítipos pueden formarse a partir de restos contiguos o no contiguos yuxtapuestos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de la molécula diana (por ejemplo, una superficie de contacto proteína-proteína). Los epítipos formados a partir de restos contiguos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) típicamente se retienen al exponerlos a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden al tratarlos con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3 y más habitualmente al menos 5 u 8, 10 restos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). Normalmente, un epítipo también es de menos de 20 restos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de longitud, tal como menos de 15 restos o menos de 12 restos.

Aromático: Un término que describe anillos conjugados que tienen enlaces insaturados, pares solitarios u orbitales vacíos, que muestran una estabilización más fuerte de lo que se esperaría por la estabilización de la conjugación en solitario. También puede considerarse una manifestación de deslocalización cíclica o de resonancia.

Arilo: Un compuesto aromático sustancialmente basado en hidrocarburo, o un radical del mismo (por ejemplo, C_6H_5) como un sustituyente unido a otro grupo, particularmente otros grupos orgánicos, que tiene una estructura de anillo ejemplificada por benceno, naftaleno, fenantreno, antraceno, etc. Este término también abarca compuestos arilo sustituidos.

Aril alquilo: Un compuesto, o un radical del mismo (C_7H_7 para tolueno) como un sustituyente unido a otro grupo, particularmente otros grupos orgánicos, que contiene estructuras tanto alifáticas como aromáticas.

Unión o unión estable: Una asociación entre dos sustancias o moléculas, tal como la asociación de un agente o resto de unión específica (por ejemplo, anticuerpo) con un antígeno.

Afinidad de unión: La tendencia de una molécula a unirse (normalmente de forma no covalente) con otra molécula, tal como la tendencia de un miembro de un par de unión específica por otro miembro de un par de unión específica. Una afinidad de unión puede medirse como una constante de unión, cuya afinidad de unión por un par de unión específica (tal como un par anticuerpo/antígeno o par sonda de ácido nucleico/secuencia de ácido nucleico) puede ser de al menos $1 \times 10^5 M^{-1}$, tal como al menos $1 \times 10^6 M^{-1}$, al menos $1 \times 10^7 M^{-1}$ o al menos $1 \times 10^8 M^{-1}$. En una realización, la afinidad de unión se calcula mediante una modificación del método de Scatchard descrito por Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979. En otra realización, la afinidad de unión se mide por una tasa de disociación de antígeno/anticuerpo. En otra realización más, una alta afinidad de unión se mide por un radioinmunoensayo de competición. En varios ejemplos, una alta afinidad de unión por un par de anticuerpo/antígeno es de al menos aproximadamente $1 \times 10^8 M^{-1}$. En otras realizaciones, una alta afinidad de unión es de al menos aproximadamente $1,5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $2,0 \times 10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $2,5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $3,0 \times 10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $3,5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $4,0 \times 10^8 M^{-1}$, al menos aproximadamente $4,5 \times 10^8 M^{-1}$, o de al menos aproximadamente $5,0 \times 10^8 M^{-1}$.

Cromógeno: Una sustancia capaz de convertirse en un producto coloreado, tal como un pigmento o colorante. Ciertos cromógenos son donantes de electrones que, cuando se oxidan, se convierten en un producto coloreado. La producción de un producto coloreado y la propiedad de volverse insoluble tras conversión química, tal como por oxidación, hace que los cromógenos sean útiles para IHC. Ejemplos particulares de compuestos cromogénicos, sin limitación, incluyen diaminobencidina (DAB), tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina] (ABTS), yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

DAB es un cromógeno que produce un producto final marrón que es muy insoluble en alcohol y otros disolventes orgánicos. En algunos ejemplos, DAB es el sustrato de una enzima, tal como HRP.

Condiciones suficientes para detección: Cualquier entorno que permita la actividad deseada, por ejemplo, que permita que una sonda se una a una diana y se detecte la interacción. Por ejemplo, dichas condiciones incluyen temperaturas apropiadas, soluciones tamponantes y medios de detección tales como microscopios y equipos de imágenes digitales.

Contacto: Colocación que permite la asociación entre dos o más restos, particularmente asociación física directa, por ejemplo, en forma sólida y/o en forma líquida (por ejemplo, la colocación de una muestra biológica, tal como una muestra biológica fijada a un portaobjetos, en contacto con una composición, tal como una solución que contiene las composiciones descritas en este documento).

Control: Una muestra o procedimiento realizado para evaluar la validez del ensayo. En un ejemplo, un control es un control de calidad, tal como un control positivo. Por ejemplo, un control positivo es un procedimiento o muestra, tal como un tejido o célula, que es similar a la muestra de ensayo real, pero que se sabe por la experiencia previa que da un resultado positivo. Un control positivo confirma que las condiciones básicas del ensayo producen un resultado positivo, incluso si ninguna de las muestras de ensayo reales produce dicho resultado. En un ejemplo particular, un control positivo es una muestra que se sabe por los ensayos previos que contiene el antígeno sospechoso.

En otros ejemplos, un control es un control negativo. Un control negativo es un procedimiento o muestra de ensayo que se sabe por la experiencia previa que da un resultado negativo. El control negativo demuestra el resultado basal obtenido cuando un ensayo no produce un resultado positivo medible; a menudo el valor del control negativo se trata como valor "de fondo" a sustraerse de los resultados de la muestra de ensayo. En un ejemplo particular, un control negativo es un reactivo que no incluye el anticuerpo primario específico. Otros ejemplos incluyen controles de calibración, que son muestras que contienen una cantidad conocida de un antígeno de control. Dichos controles de calibración tienen una intensidad de señal esperada y, por lo tanto, pueden usarse para corregir la variabilidad de tinción entre ejecuciones o dentro de la ejecución.

Conjugado: Una molécula que comprende dos moléculas independientes, que se ha unido a través de un enlace (normalmente un enlace covalente o iónico). En algunos ejemplos, se conjuga un agente o resto de unión específica a una enzima que actúa sobre un sustrato para producir un resto o marcador detectable.

Conjugación, unión, adhesión o enlace: Unión de una molécula a otra molécula para hacer una molécula más grande. Por ejemplo, hacer dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua, o fijar covalentemente un hapteno u otra molécula a un polipéptido, tal como un anticuerpo scFv. El enlace puede ser por medio químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora de modo que se forme un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

Acoplado: El término "acoplado" significa unido junto, directa o indirectamente. Un primer átomo o molécula puede acoplarse directamente o acoplarse indirectamente a un segundo átomo o molécula. Un anticuerpo secundario proporciona un ejemplo de acoplamiento indirecto. Un ejemplo específico de acoplamiento indirecto es un anticuerpo primario de conejo anti-hapteno que se une por un anticuerpo de ratón anti-IgG de conejo, que a su vez se une por un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón que está ligado covalentemente a un marcador detectable.

Derivado: En química, un derivado es un compuesto que se obtiene de un compuesto similar o un compuesto que puede imaginarse surgiendo de otro compuesto, por ejemplo, si un átomo se reemplaza con otro átomo o grupo de átomos. La última definición es habitual en química orgánica. En bioquímica, la palabra se usa para compuestos que pueden formarse al menos teóricamente a partir del compuesto precursor.

Marcado detectable: Una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visualmente, electrónicamente o de otro modo) que indica la presencia y/o concentración de una diana, tal como una molécula diana, en una muestra, tal como una muestra tisular. Cuando se conjuga a una molécula de unión específica, el marcador detectable puede usarse para localizar y/o cuantificar la diana a la que está dirigida la molécula de unión específica. De ese modo, la presencia y/o concentración de la diana en una muestra puede detectarse detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable puede detectarse directa o indirectamente, y pueden usarse varios marcadores detectables diferentes conjugados a diferentes moléculas de unión específica en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable, tal como un hapteno conjugado a un anticuerpo específico para una diana, puede detectarse indirectamente usando un segundo

marcador detectable que está conjugado a una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Pueden conjugarse múltiples marcadores detectables que pueden detectarse por separado a diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo combinado que puede proporcionar detección de las múltiples dianas en una muestra.

5 Los marcadores detectables incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra), haptenos que pueden detectarse a través de interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados de anticuerpo marcados de forma detectable y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen: enzimas, tales como peroxidasa de rábano rústico, glucosa oxidasa, β -galactosidasa o β -glucuronidasa; fluoróforos (pueden encontrarse muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes en The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR); nanopartículas, tales como puntos cuánticos (por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos de metales, tales como quelatos DOTA y DPTA de iones de metales radiactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} ; cromógenos; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas.

20 Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se usa una sustancia detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia diversidad de dichos compuestos está disponible en el mercado, por ejemplo, de Life Technologies, Carlsbad, CA).

25 Como alternativa, puede usarse una enzima en un esquema de detección metalográfica. Los métodos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato redox-inactivo de la enzima. El sustrato se convierte en un agente redox-activo por la enzima, y el agente redox-activo reduce el ion metálico, causando que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente con número de serie 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004, la publicación de PCT n.º 2005/003777 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0265922). Los métodos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima oxidorreductasa (tal como peroxidasa de rábano rústico (HRP)) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, de nuevo para formar un precipitado detectable (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.670.113).

35 Detergente o tensioactivo: Una sustancia que reduce la tensión superficial del agua. Específicamente, un detergente o tensioactivo es un agente activo en superficie, o tensioactivo, que se concentra en superficies de contacto aceite-agua y ejerce una acción emulsionante. Los detergentes se clasifican como aniónicos, catiónicos o no iónicos, dependiendo de su modo de acción química. Los detergentes no iónicos funcionan mediante un mecanismo de unión a hidrógeno. Además, los tensioactivos o detergentes reducen la tensión interfacial entre dos líquidos. Una molécula de tensioactivo normalmente tiene una "cabeza" polar o iónica y una "cola" de hidrocarburo no polar. Tras la disolución en agua, las moléculas de tensioactivo se agregan y forman micelas, en que las colas no polares están orientadas hacia dentro y las cabezas polares o iónicas están orientadas hacia afuera hacia el entorno acuoso. Las colas no polares crean un "bolsillo" no polar dentro de la micela. Los compuestos no polares en la solución se secuestran en los bolsillos formados por las moléculas tensioactivas, permitiendo de ese modo que los compuestos no polares permanezcan mezclados dentro de la solución acuosa.

50 Detección: Para determinar si un agente (tal como una señal o antígeno particular, proteína o ácido nucleico) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir adicionalmente cuantificación y/o localización, por ejemplo, localización dentro de una célula o compartimento celular particular. "Detección" se refiere a cualquier método de determinación de si existe algo, o no existe, tal como determinar si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, "detección" puede incluir el uso de un dispositivo visual o mecánico para determinar si una muestra presenta una característica específica. En ciertos ejemplos, detección se refiere a observar visualmente una sonda unida a una diana, u observar que una sonda no se une a una diana. Por ejemplo, habitualmente se usa microscopía óptica y otros medios microscópicos para detectar precipitados cromogénicos para métodos descritos en este documento.

60 Radiación electromagnética: Una serie de ondas electromagnéticas que se propagan por variaciones periódicas simultáneas de la intensidad del campo eléctrico y magnético, y que incluye ondas de radio, infrarrojos, luz visible, luz ultravioleta, rayos X y rayos gamma. En ejemplos particulares, se emite radiación electromagnética por un láser, que puede poseer propiedades de monocromaticidad, direccionalidad, coherencia, polarización e intensidad.

Emisión o señal de emisión: La luz de una longitud de onda particular generada desde una fuente. En ejemplos particulares, se emite una señal de emisión desde un fluoróforo después de que el fluoróforo absorba luz en su longitud o longitudes de onda de excitación.

65

- Potenciación: Un potenciador o reactivo de potenciación 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 compuesto o compuestos. El potenciador o potenciadores o reactivo o reactivos de potenciación también pueden definirse como un compuesto o combinación de compuestos que aumentan o aceleran la tasa de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. La potenciación es un proceso por el cual la actividad catalítica de una enzima se aumenta por un potenciador, en comparación con un proceso que no incluye dicho potenciador. La potenciación también puede definirse como el aumento o aceleración de la tasa de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. La potenciación puede medirse visualmente, tal como valorándola por un patólogo. En realizaciones particulares, los valores varían de más de 0 a más de 4, indicando el número superior una mejor detección visual. Más normalmente, los valores varían de más de 0 a aproximadamente 4++, tal como 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 3,75, 4, 4+, y 4++. Además, la potenciación puede medirse determinando la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de una enzima. En realizaciones particulares, el término abarca valores de $V_{m\acute{a}x}$ aparente (medidos como densidad óptica/minuto) que varían de más de 0 mDO/min a aproximadamente 400 mDO/min, tal como de aproximadamente 15 mDO/min, 18 mDO/min, a aproximadamente 20 mDO/min, a aproximadamente 40 mDO/min, a aproximadamente 60 mDO/min, a aproximadamente 80 mDO/min, a aproximadamente 100 mDO/min, a aproximadamente 120 mDO/min, a aproximadamente 140 mDO/min, a aproximadamente 160 mDO/min, a aproximadamente 200 mDO/min, a aproximadamente 250 mDO/min, a aproximadamente 300 mDO/min, a aproximadamente 350 mDO/min, y a aproximadamente 400 mDO/min. Más normalmente, la $V_{m\acute{a}x}$ varía de más de 0 mDO/min a aproximadamente 160 mDO/min, tal como de aproximadamente 20 mDO/min, a aproximadamente 40 mDO/min, a aproximadamente 60 mDO/min, a aproximadamente 80 mDO/min, a aproximadamente 100 mDO/min, a aproximadamente 120 mDO/min, a aproximadamente 140 mDO/min, y a aproximadamente 160 mDO/min. Además, la potenciación puede suceder usando cualquier concentración de un potenciador mayor de 0 mM. Normalmente, la potenciación sucede a concentraciones de potenciador que varían de más de 0 mM a aproximadamente 100 mM. Incluso más normalmente de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM, a aproximadamente 0,02 mM, a aproximadamente 0,05 mM, a aproximadamente 0,10 mM, a aproximadamente 0,20 mM, a aproximadamente 0,50 mM, a aproximadamente 1,0 mM, a aproximadamente 2,0 mM, a aproximadamente 3,0 mM, a aproximadamente 5,0 mM, a aproximadamente 10,0 mM, a aproximadamente 20,0 mM, a aproximadamente 30,0 mM, a aproximadamente 40,0 mM, a aproximadamente 50,0 mM, a aproximadamente 75,0 mM, o a aproximadamente 100,0 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,10 mM, a aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,50 mM, a aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 1,0 mM, a aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM, a aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM, a aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 50,0 mM, y a aproximadamente 20,0 mM a aproximadamente 100,0 mM.
- Excitación o señal de excitación: La luz de una longitud de onda particular necesaria y/o suficiente para excitar una transición electrónica a un nivel energético mayor. En ejemplos particulares, una excitación es la luz de una longitud de onda particular necesaria y/o suficiente para excitar un fluoróforo a un estado de modo que el fluoróforo emita una longitud de onda diferente (tal como más larga) de luz que la longitud de onda de luz de la señal de excitación.
- Fijación: Un proceso que conserva las células y constituyentes tisulares en un estado lo más cercano posible a la vida y les permite experimentar procedimientos preparativos sin cambios. La fijación detiene los procesos de autólisis y descomposición bacteriana que empiezan tras la muerte celular, y estabiliza los constituyentes celulares y tisulares de modo que resisten las fases posteriores de procesamiento tisular, tal como para IHC.
- Los tejidos pueden fijarse por perfusión con o inmersión en un fijador, tal como un aldehído (tal como formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído y similares). Otros fijadores incluyen agentes oxidantes (por ejemplo, iones y complejos metálicos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturalizantes de proteína (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercurico, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, methacarn, fluido de Bouin, fijador B5, fluido de Rossman y fluido de Gendre), microondas y diversos (por ejemplo, fijación por volumen excluido y fijación por vapor). También pueden incluirse aditivos en el fijador, tales como tamponantes, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (por ejemplo, cloruro de zinc, sulfato de zinc y sales de litio) y lantano.
- El fijador más habitualmente usado en la preparación de muestras para IHC es formaldehído, generalmente en forma de una solución en formalina (formaldehído al 4 % en una solución tamponante, mencionada como formalina tamponada al 10 %).
- Fluorescencia: Un tipo de luminiscencia en que un átomo o molécula absorbe energía y después emite luz visible según sufre una transición desde un estado electrónico superior a uno inferior. El término "fluorescencia" está restringido a fenómenos en que el intervalo de tiempo entre la absorción y emisión de energía es extremadamente corto.
- Hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH): FISH es una técnica usada para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN y/o ARN en cromosomas. FISH usa sondas marcadas de forma fluorescente que se unen solamente a aquellas partes del cromosoma con que muestran un alto grado de similitud de secuencia en condiciones definidas de reacción. FISH también puede usarse para detectar secuencias

particulares de ARNm dentro de muestras tisulares.

Fluoróforo: Un compuesto químico, que cuando se excita por exposición a un estímulo particular tal como una longitud de onda definida de luz, emite luz (emite fluorescencia), por ejemplo, a una longitud de onda diferente (tal como una longitud de onda más larga de luz).

Los fluoróforos son parte de la clase más grandes de compuestos luminiscentes. Los compuestos luminiscentes incluyen moléculas quimioluminiscentes, que no requieren una longitud de onda particular de luz para emitir luminiscencia, pero en su lugar usan una fuente química de energía. Por lo tanto, el uso de moléculas quimioluminiscentes (tales como aequorina) elimina la necesidad de una fuente de externa de radiación electromagnética, tal como un láser.

Ejemplos de fluoróforos particulares que pueden usarse en las sondas descritas en este documento se proporcionan en la patente de Estados Unidos n.º 5.866.366 de Nazarenko et al., tales como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, amarillo Brilliant, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcouluarina (Coumaran 151); cianosina; 4',6'-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirogalol-sulfoneftaleína (rojo de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato verde de Malaquita; 4-metilumbeliferona; orto cresolfaleína; nitrotirosina; pararosanilina; rojo Fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Rojo 4 reactivo (CIBACRON™ rojo Brilliant 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), sulfonil cloruro de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo sulforrodamina 101 (rojo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio; rojo LightCycler 640; Cy5.5; y Cy5.

Hapteno: Una molécula, normalmente una molécula pequeña, que puede combinarse específicamente con un anticuerpo, pero normalmente es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica excepto en combinación con una molécula de vehículo. Ejemplos de haptenos incluyen, aunque sin limitación, fluoresceína, biotina, nitroarilos incluyendo, aunque sin limitación, dinitrofenol (DNP), digoxigenina, oxazol, pirazol, tiazol, benzofurazano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y ciclolignano.

Heterobifuncional: Agentes de reticulación que contienen al menos dos grupos reactivos diferentes en cada extremo, que son reactivos hacia numerosos grupos, incluyendo, aunque sin limitación, sulfhidrilos y aminas, y crean enlaces covalentes químicos entre dos o más moléculas, por ejemplo, entre un agente o resto de unión específica (tal como un anticuerpo) y una enzima (tal como HRP).

Hibridación: Para formar pares de bases entre regiones complementarias de dos hebras de ADN, ARN o entre ADN y ARN, formando de ese modo una molécula dúplex. Las condiciones de hibridación que provocan grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. En líneas generales, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (tal como la concentración de Na⁺) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos respecto a las condiciones de hibridación para obtener grados particulares de rigurosidad se analizan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11).

Inmunohistoquímica (IHC): Un método de determinación de la presencia o distribución de un antígeno en una muestra detectando la interacción del antígeno con un agente o resto de unión específica, tal como un anticuerpo. Una muestra que incluye un antígeno (tal como un antígeno diana) se incuba con un anticuerpo en condiciones que permiten la unión a anticuerpo-antígeno. La unión de anticuerpo-antígeno puede detectarse mediante un marcador detectable conjugado al anticuerpo (detección directa) o mediante un marcador detectable conjugado a un anticuerpo secundario, que se genera contra el anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta). Los marcadores detectables incluyen, aunque sin limitación, isótopos radiactivos, fluorocromos (tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y rodamina), enzimas y moléculas cromogénicas.

Hibridación *in situ* (ISH): Un tipo de hibridación que usa una hebra de ADN o ARN complementaria marcada (es decir, sonda) para localizar una secuencia específica de ADN o ARN en una parte o sección de tejido (*in situ*) o, si el tejido es suficientemente pequeño (por ejemplo, semillas de plantas, embriones de *Drosophila*), en el tejido completo

(ISH de montaje completo). Esto es distinto de la inmunohistoquímica, que localiza proteínas en secciones tisulares. Puede usarse ISH de ADN para determinar la estructura de los cromosomas, tal como para su uso en diagnóstico médico para evaluar la integridad cromosómica. Se usa ISH de ARN (histoquímica de hibridación) para medir y localizar ARNm u otros transcritos dentro de secciones tisulares o montajes completos.

Para histoquímica de hibridación, habitualmente se tratan células y tejidos de muestra para fijar los transcritos diana en su lugar y para aumentar el acceso de la sonda a la molécula diana. Como se ha indicado anteriormente, la sonda es un ADN complementario o un ARN complementario marcado (Ribosonda). La sonda hibrida con la secuencia diana a temperatura elevada, y después se retira por lavado el exceso de sonda (después de la hidrólisis previa usando RNasa en el caso de sonda de ARN en exceso no hibridada). Los parámetros de solución, tales como temperatura, concentración salina y/o detergente, pueden manipularse para retirar cualquier interacción no idéntica (es decir, solamente las coincidencias exactas de secuencias permanecerán unidas). Después, la sonda marcada que se ha marcado de forma eficaz, tal como con bases radiomarcadas, marcadas con fluorescencia o marcadas con antígeno (por ejemplo, digoxigenina), se localiza y cuantifica potencialmente en el tejido usando autorradiografía, microscopia de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente.

Enlazador: Como se usa en este documento, un enlazador es una molécula o grupo de átomos posicionado entre dos restos. Normalmente, los enlazadores son bifuncionales, es decir, el enlazador incluye un grupo funcional en cada extremo, donde los grupos funcionales se usan para acoplar el enlazador a los dos restos. Los dos grupos funcionales pueden ser iguales, es decir, un enlazador homobifuncional, o diferentes, es decir, un enlazador heterobifuncional.

Péptido enlazador: Un péptido dentro de un fragmento de unión a anticuerpo (tal como un fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable. "Enlazador" también puede hacer referencia a un péptido que sirve para unir un resto de direccionamiento, tal como un scFv, a una molécula efectora, tal como una citotoxina o un marcador detectable.

Molécula de interés o molécula diana: Una molécula para la cual tiene que determinarse la presencia, localización y/o concentración. Ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácido nucleico presentes en muestras tisulares.

Combinación: Realizaciones de la presente descripción permiten detectar múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea, o secuencialmente, según se desee, usando múltiples conjugados diferentes. La combinación puede incluir identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos, generalmente ADN, ARN, péptidos, proteínas, de forma tanto individual como en todas y cada una de las combinaciones. La combinación también puede incluir detectar dos o más de un gen, un mensajero y una proteína en una célula en su contexto anatómico.

Neoplasia y tumor: El proceso de crecimiento celular anormal e incontrolado. La neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo.

El producto de la neoplasia es un neoplasma (un tumor), que es un crecimiento anormal de tejidos que resulta de una división celular excesiva. Un tumor que no metastatiza se menciona como "benigno". Un tumor que invade el tejido adyacente y/o puede metastatizar se menciona como "maligno". Ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielogénica aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielogénica crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células ciliadas y mielodisplasia.

Ejemplos de tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfoide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres pulmonares, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Oligonucleótido: Una pluralidad de nucleótidos unidos que están unidos por enlaces fosfodiéster nativos, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Un análogo oligonucleotídico se refiere a restos que funcionan de forma similar a los oligonucleótidos pero que tienen partes de origen no natural. Por ejemplo, los análogos oligonucleotídicos pueden contener partes de origen no natural, tales como restos de azúcar

alterados o enlaces entre azúcares, tales como un oligodesoxinucleótido fosforotioato. Los análogos funcionales de polinucleótidos de origen natural pueden unirse a ARN o ADN, e incluyen moléculas de ácido peptidonucleico.

5 Oligonucleótidos y análogos oligonucleotídicos particulares pueden incluir secuencias lineales de hasta aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, por ejemplo, una secuencia (tal como ADN o ARN) que es de al menos 6 bases, por ejemplo, de al menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 o incluso 200 bases de longitud, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 50 bases, por ejemplo, de aproximadamente 10-25 bases, tal como de 12, 15, o 20 bases.

10 Sonda: Un ácido nucleico aislado, un oligonucleótido sintético aislado, unido a un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores típicos incluyen isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzima. Los métodos para marcar y las directrices en la elección de los marcadores apropiados para diversos propósitos se analizan, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (En Current Protocols in
15 Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. y Wiley-Intersciences, 1992).

Un experto en la materia apreciará que la especificidad de una sonda particular aumenta con su longitud. Por tanto, puede seleccionarse sondas para proporcionar una especificidad deseada, y pueden comprender al menos 17, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de la secuencia deseada de nucleótidos. En ejemplos
20 particulares, las sondas pueden ser de al menos 100, 250, 500, 600 o 1000 ácidos nucleicos consecutivo de una secuencia deseada de nucleótidos.

Polipéptido: Un polímero en que los monómeros son restos de aminoácido que están unidos juntos a través de enlaces amida. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, puede usarse el isómero óptico L o el isómero óptico
25 D. Los términos "polipéptido" o "proteína", como se usan en este documento, pretenden abarcar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término "polipéptido" pretende cubrir específicamente proteínas de origen natural, así como aquellas que se producen de forma recombinante o sintética.

30 El término "resto" o "resto de aminoácido" incluye referencias a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido.

Muestra: El término "muestra" se refiere a cualquier sustancia (o material) líquida, semisólida o sólida en o sobre la cual puede estar presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra
35 obtenida de un material biológico. Ejemplos de muestras biológicas incluyen muestras tisulares y muestras de citología. En algunos ejemplos, la muestra biológica se obtiene de un sujeto animal, tal como un sujeto humano. Una muestra biológica es cualquier muestra sólida o fluida obtenida de, excretada o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo sin limitación organismos unicelulares, tales como bacterias, levaduras, protozoos y amebas entre otros, organismos multicelulares (tales como plantas o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o
40 aparentemente sano o un paciente humano afectado por una afección o enfermedad a diagnosticar o investigar, tal como cáncer). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un fluido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, fluido ascítico, saliva, fluido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, fluido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o fluido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido
45 (incluyendo una muestra de biopsia o autopsia, tal como una biopsia de tumor) o puede incluir una célula (sea una célula primaria o célula cultivada) o medio condicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un extracto nuclear. En algunos ejemplos, una muestra biológica es citoplasma bacteriano. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo es una célula, un
50 tejido o sección de sedimento celular preparado a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es uno que está en riesgo o ha adquirido una afección o enfermedad particular.

Se une específicamente: Una expresión que se refiere a la unión de un agente que se une preferentemente a una diana definida (tal como un anticuerpo a un antígeno específico o una sonda de ácido nucleico a una secuencia
55 específica de ácido nucleico). Con respecto a un antígeno, "se une específicamente" se refiere a la asociación preferente de un anticuerpo u otro ligando, en su totalidad o en parte, con un polipéptido específico. Con respecto a una secuencia de ácido nucleico, "se une específicamente" se refiere a la asociación preferente de una sonda de ácido nucleico, en su totalidad o en parte, con una secuencia específica de ácido nucleico.

60 Un agente o resto de unión específica se une sustancialmente solo a una diana definida. Se reconoce que un grado minoritario de interacción no específica puede aparecer entre una molécula, tal como un agente o resto de unión específica, y un polipéptido no diana o secuencia de ácido nucleico no diana. Aunque un anticuerpo selectivamente reactivo se une a un antígeno, puede hacerlo con baja afinidad. La unión específica de un anticuerpo a un antígeno típicamente provoca un aumento de más de 2 veces, tal como de más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100
65 veces en la cantidad del anticuerpo unido u otro ligando (por unidad de tiempo) a un polipéptido diana, en comparación con un polipéptido no diana. Una diversidad de formatos de inmunoensayo son apropiados para

seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica.

La unión específica de secuencia de la sonda de ácido nucleico al ácido nucleico normalmente provoca un aumento de más de 2 veces, tal como de más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100 veces en la cantidad de sonda de ácido nucleico unida a una secuencia de ácido nucleico diana, en comparación con un ácido nucleico no diana. Una diversidad de condiciones de ISH, son apropiadas para seleccionar sondas de ácido nucleico que se unen específicamente con una secuencia particular de ácido nucleico.

Resto de unión específica o agente de unión específica: 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 unión a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es de al menos 10^3 M^{-1} mayor, 10^4 M^{-1} mayor o 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión por 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 ácido nucleico y ácidos nucleicos de proteína. Los restos de unión específica también pueden incluir las moléculas (o partes de las mismas) que se unen específicamente por dichas proteínas de unión específica.

Sustrato: Una molécula sobre la que actúa un catalizador, tal como una enzima. En un ejemplo, un sustrato es 4-cloro-1-naftol (4-CN) o diaminobencidina (DAB).

Tejido: Una colección de células interconectadas que realizan una función similar dentro de un organismo.

Tiramina: Un compuesto que tiene la fórmula $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$, también conocida como 4-(2-aminoetil)fenol.

Tiramida: Un derivado de tiramina, donde el grupo funcional amina de una molécula de tiramina ha formado un enlace amida con un grupo funcional que contiene carbonilo.

III. Visión global de varias realizaciones

A. Composiciones

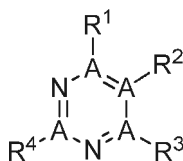
Aspectos de esta descripción se refieren a composiciones que potencian la deposición de restos detectables sobre muestras tisulares, por ejemplo, secciones tisulares tales como las que se ensayan para la presencia de marcadores, tales como marcadores para enfermedades. Por tanto, se describen en este documento composiciones para potenciar la deposición de restos detectables sobre muestras tisulares, por ejemplo, secciones tisulares. La deposición potenciada proporciona una capacidad mejorada para detectar fácilmente e identificar dianas en una muestra tisular, por ejemplo, mejorando la calidad, cantidad y/o relación de señal a ruido de los restos detectables en muestras tisulares. En ciertas realizaciones, las composiciones y métodos descritos proporcionados en este documento aumentan y/o mejoran el recambio enzimático aumentando las tasas de oxidación enzimática aparente, y de ese modo potencian la capacidad de la enzima para reaccionar con componentes de la composición y aumentar la deposición de restos detectables en el sitio diana específico, tal como el sitio de una molécula diana en una muestra. En dichas realizaciones, los productos enzimáticos son restos detectables que se depositan sobre muestras tisulares. Los componentes ejemplares de la composición se detallan adicionalmente en las siguientes secciones.

1. Potenciadores

Las realizaciones descritas utilizan potenciadores o soluciones de potenciación para mejorar la actividad enzimática hacia la deposición de restos detectables, por ejemplo, en el caso de HRP aumentando la cinética de reacción aparente de la enzima y aumentando de ese modo la tasa de deposición del sustrato enzimático, tal como el producto de reacción cromogénica de DAB y HRP. Los potenciadores descritos pueden usarse en soluciones que comprenden otros componentes de la composición, o pueden comprender una solución diferente, donde la solución se añade por separado a otros componentes de la composición. La solución puede ser una solución acuosa, una solución orgánica miscible en agua o cualquier combinación de las mismas. Las soluciones orgánicas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, glicoles, tales como propilenglicol, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, dimetilformamida y cualquier combinación de los mismos.

i. Análogos de pirimidina

Realizaciones particulares de las composiciones descritas incluyen como potenciadores análogos de pirimidina que tienen las siguientes fórmulas generales (Fórmula 1):



Fórmula 1

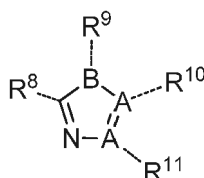
Con referencia a la Fórmula 1, R¹, R², R³, y R⁴ pueden ser independientemente un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo e hidrógeno. En algunos ejemplos, el halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En algunos ejemplos, el resto que contiene heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o NR⁶R⁷ donde R⁶ y R⁷ son independientemente hidrógeno, grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, R¹ y/o R³ están unidos a R² para formar un sistema de anillo condensado. Con referencia a la Fórmula 1, en algunos ejemplos, "A" es un heteroátomo (diferente de azufre), un átomo de carbono o cualquier combinación de los mismos. Con referencia a la Fórmula 2, n es de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4, o 5, por ejemplo 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 1-3, 2-4, 3-5, 1-4, 2-5, o 1-5. En ejemplos específicos, A es un átomo de carbono y n es 1. Análogos ejemplares de pirimidina para su inclusión en las composiciones descritas son pirimidina y 2-hidroxipirimidina.

En algunos ejemplos, los potenciadores están presentes en una solución, por ejemplo, para facilitar la distribución desde máquinas automatizadas. En algunos ejemplos, los potenciadores están presentes en la solución a una concentración de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM, aproximadamente 0,02 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,10 mM, aproximadamente 0,20 mM, aproximadamente 0,50 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 5,0 mM, aproximadamente 10,0 mM, aproximadamente 20,0 mM, aproximadamente 30,0 mM, aproximadamente 40,0 mM, aproximadamente 50,0 mM, aproximadamente 75,0 mM, o aproximadamente 100,0 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,10 mM, aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,50 mM, aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM, aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 50,0 mM, y de aproximadamente 20,0 mM a aproximadamente 100,0 mM.

ii. Potenciadores opcionales

En realizaciones particulares, los potenciadores de análogos de pirimidina se usan junto con potenciadores opcionales adicionales. En algunas realizaciones, los potenciadores opcionales se incluyen en la misma solución que los potenciadores de análogo de pirimidina, y por tanto pueden ponerse en contacto con una muestra tisular como una única composición, tal como una única solución. En algunos casos podría ser deseable incluir los potenciadores opcionales en una solución diferente, por ejemplo, para evitar la reactividad y/o solubilidad reducida. Por tanto, en algunas realizaciones, los potenciadores opcionales se incluyen en una solución diferente de los potenciadores de análogo de pirimidina, y por tanto pueden ponerse en contacto con una muestra tisular desde una solución diferente, por ejemplo, un suministro por etapas o suministro simultáneo.

Realizaciones particulares de las composiciones descritas contienen potenciadores opcionales que pueden usarse o no en combinación con el análogo de pirimidina, dependiendo de factores tales como la aplicación particular o restos detectables o enzimas, entre otros. En realizaciones particulares, una composición descrita contiene, como potenciadores opcionales, potenciadores de heteroarilo que tienen la siguiente fórmula general (Fórmula 2):

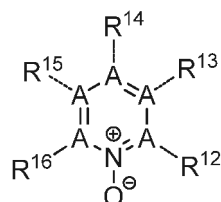


Fórmula 2

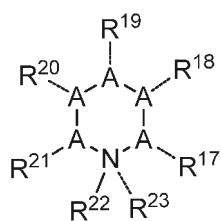
Con referencia a la Fórmula 2, R⁸, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ son independientemente un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo, hidrógeno o cualquier combinación de los mismos. En ciertos ejemplos, el halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En ciertos ejemplos el resto que contiene heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o NR⁶R⁷ donde R⁶ y R⁷ son independientemente hidrógeno, grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. Con referencia a la Fórmula 2 "A" es un heteroátomo (diferente de azufre), un átomo de carbono o cualquier combinación de los mismos. Con referencia a la Fórmula 3 "B" es oxígeno, carbono o nitrógeno. En ejemplos específicos, A es un átomo de carbono y B es un átomo de nitrógeno. En ciertas realizaciones, los potenciadores de heteroarilo para su uso en las composiciones descritas se seleccionan de imidazol, L-histidina, tiazol, oxazol o cualquier combinación de los

mismos. En algunos ejemplos, los potenciadores están presentes en una solución, por ejemplo, para facilitar la distribución desde máquinas automatizadas.

5 En algunas realizaciones, las composiciones descritas contienen, como potenciadores opcionales, potenciadores de heteroarilo que tienen las siguientes fórmulas generales (Fórmula 3 y Fórmula 4):



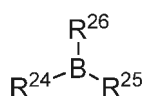
Fórmula 3



Fórmula 4

10 Con referencia a las Fórmulas 3 y 4, R¹²-R²³ son independientemente un grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo, hidrógeno o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el resto halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En algunos ejemplos, el resto que contiene heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o NR⁶R⁷ donde R⁶ y R⁷ son independientemente hidrógeno, grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, R²² es una especie radical, tal como [O], o una especie cargada negativamente, tal como [O]⁻. Con referencia a la Fórmula 4, en realizaciones particulares, R²¹ y R¹⁷ comprenden un grupo dimetilo geminal. Con referencia a la Fórmula 4 y/o 5 "A" es un heteroátomo (diferente de azufre), un átomo de carbono o cualquier combinación de los mismos. En ejemplos específicos, A es un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de carbono o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas, los potenciadores de heteroarilo incluyen, aunque sin limitación, N-óxido de pirimidina, N-óxido de piridina, N-metil morfolina (NMO), y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO).

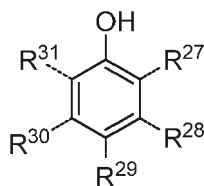
25 En algunas realizaciones, las composiciones descritas contienen, como potenciadores opcionales, ácidos borónicos orgánicos e inorgánicos. En algunas realizaciones, los ácidos borónicos orgánicos tienen la siguiente fórmula general (Fórmula 5):



Fórmula 5

30 Con referencia a la Fórmula 5, R²⁴, R²⁵ y R²⁶ son independientemente un grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En ejemplos específicos, dos o más, tal como 2 o 3, de R²⁴, R²⁵ y R²⁶ son hidroxilo, siendo los restantes R²⁴, R²⁵ o R²⁶ un grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático o heteroarilo. En realizaciones particulares, R²⁴, R²⁵ y R²⁶ son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo y fenilo. En ciertas realizaciones de la composición descrita, los ácidos borónicos orgánicos son ácido bórico, ácido fenilborónico, ácido 4-AcHN-fenilborónico o cualquier combinación de los mismos.

40 En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen compuestos fenólicos como potenciadores opcionales. En algunas realizaciones, los compuestos fenólicos tienen la siguiente fórmula general (Fórmula 6):



Fórmula 6

Con referencia a la Fórmula 6, R²⁷, R²⁸, R²⁹, R³⁰ y R³¹ son independientemente hidrógeno, un grupo alifático, arilo, un resto que contiene heteroátomo, halógeno o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el resto halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En algunos ejemplos, el resto que contiene heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o NR⁶R⁷ donde R⁶ y R⁷ son independientemente hidrógeno, grupo alifático, arilo, grupo heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares, dos grupos adyacentes cualesquiera seleccionados de R²⁷, R²⁸, R²⁹, R³⁰ y R³¹ pueden estar unidos para formar un sistema de anillo aromático o no aromático condensado. En realizaciones particulares adicionales, al menos uno de R²⁷, R²⁸, R²⁹, R³⁰ y R³¹ se selecciona de hidroxilo. Realizaciones de trabajo particulares se refieren a compuestos fenólicos como potenciadores opcionales, tales como pirocatecol.

2. Restos detectables

Las composiciones descritas permiten una detección aumentada de restos detectables. Estos restos detectables pueden seleccionarse de cualquier resto que sea capaz de usarse con muestras tisulares. Realizaciones particulares emplean restos detectables seleccionados de cromógenos, fluoróforos, conjugados de tiramida, que se forman entre tiramina y haptenos, nanopartículas, fluoróforos y proteínas, o cualquier combinación de los mismos.

Realizaciones particulares utilizan cromógenos como restos detectables. Los cromógenos pueden seleccionarse de cualquier compuesto capaz de producir un cambio de color detectable tras la deposición sobre el tejido, por ejemplo, una muestra tisular tal como una sección tisular típicamente empleada para examen patológico. En algunos ejemplos, el resto detectable se deposita en el tejido de muestra después de que haya actuado una enzima sobre el mismo. A modo de ejemplo, la enzima se dirige a una molécula diana en una muestra tisular, la enzima actúa sobre el resto detectable, que a su vez se deposita sobre la muestra en la proximidad inmediata de la enzima, posibilitando de ese modo la detección, cuantificación y/o localización de la molécula diana en una muestra tisular. Los restos detectables pueden usarse en soluciones que comprenden otros componentes de la composición, o pueden comprender una solución diferente, donde la solución se añade por separado a otros componentes de la composición.

Pueden diseñarse restos de unión específica para conjugarse directamente a un marcador. Usado de este modo, el complejo de unión específica/marcador (es decir, la sonda) se pone en contacto con la muestra y se detecta la diana.

También pueden asociarse indirectamente restos de unión específica con un marcador. En algunos ejemplos, un primer resto de unión específica se pone en contacto con una muestra. Los restos de unión específica pueden estar basados en ácido nucleico o basados en proteína. El resto de unión específica puede conjugarse a otro resto que después se une, por ejemplo, por un anticuerpo secundario o un resto de unión no basado en péptido, tal como biotina. El anticuerpo secundario o par de unión no peptídico puede unirse después a un marcado, tal como una enzima. En otro ejemplo, puede asociarse indirectamente un resto de unión específica con un marcador conjugando un resto de unión específica, directa o indirectamente, a un péptido que tiene actividad enzimática. La actividad enzimática se elige de modo que, tras la adición de un sustrato o sustratos, el sustrato o sustratos se conviertan en un resto detectable, o se convierta en un marcador más activo.

Ejemplos no limitantes ejemplares de pares de enzima/sustrato incluyen los siguientes: HRP/DAB con un sustrato cromogénico o sustrato fluorogénico. Se conocen otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato por los expertos en la materia. Para una revisión general de estos, véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4.275.149, y 4.318.980. Cuando una sonda se prepara a partir de la asociación indirecta de una o más moléculas adicionales, las moléculas adicionales pueden mencionarse como componentes de la sonda.

En algunos ejemplos, el marcador se conjuga indirectamente con un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede conjugarse a biotina donde la biotina se une selectivamente a avidina para posterior detección. Como alternativa, un anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno y un marcador se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno. Por tanto, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcador con el resto de direccionamiento.

Cuando la sonda incluye una enzima que reacciona con un sustrato para generar el marcador de detección, el sustrato puede ser un compuesto cromogénico. Existen numerosos ejemplos de dichos sustratos. Por ejemplo, muchos de dichos compuestos pueden adquirirse de Invitrogen, Eugene OR. Ejemplos no limitantes particulares de compuestos cromogénicos incluyen nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-

galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido (X-Gluc), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (ADHP), diamino (DAB), tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina] (ABTS), o-dianisidina, 4- cloronaftol (4-CN) (usado junto con DMPDA/DEPDA/MBTH/ADET, de acuerdo con Kidwell, et al. Anal. Bio- chem., (1991), 192, 207), y o-fenilendiamina (OPD).

Realizaciones particulares utilizan fluoróforos como restos detectables. Los fluoróforos pueden seleccionarse de compuestos que muestran fluorescencia incluyendo, aunque sin limitación, fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas. Ejemplos de fluoróforos particulares que pueden usarse en las sondas descritas en este documento se proporcionan en la patente de Estados Unidos n.º 5.866.366 de Nazarenko et al., tales como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, amarillo Brilliant, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcouluarina (Coumaran 151); cianosina; 4',6'-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirogalol-sulfoneftaleína (rojo de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato verde de Malaquita; 4-metilumbeliferona; orto cresoltaleína; nitrotirosina; pararosanilina; rojo Fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Rojo 4 reactivo (CIBACRON™ rojo Brilliant 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), sulfonil cloruro de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo sulforrodamina 101 (rojo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio; rojo LightCycler 640; Cy5.5; y Cy5 (pueden encontrarse muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes en in *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Molecular Probes, Eugene, OR).

En otras realizaciones, el resto detectable puede comprender un conjugado de tiramida que comprende un compuesto de tiramina conjugado con un resto detectable seleccionado de nanopartículas, fluoróforos y proteínas. Ciertas realizaciones usan conjugados de tiramida que comprenden tiramina y un hapteno donde el hapteno se selecciona de oxazol, pirazol, tiazol, benzofurazano, triterpeno, urea, tiourea, nitroarilo, rotenoide, cumarina, ciclolignano, heterobiarilo, azoarilo, benzodiazepina, o combinaciones de los mismos.

Otras realizaciones contempladas por la presente descripción incluyen conjugados de tiramida que incluyen un compuesto de tiramina unido a una nanopartícula, tal como un punto cuántico. Otras realizaciones particulares incluyen un compuesto de tiramina unido a un fluoróforo, que puede seleccionarse de fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas. Otras realizaciones particulares más se refieren a un compuesto de tiramina unido a una proteína, que puede seleccionarse de una enzima, tal como peroxidasa de rábano rusticano, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa o β -lactamasa.

En realizaciones particulares, el marcador detectable o hapteno se une al compuesto de tiramina mediante un enlazador, tal como un enlazador alifático, un enlazador heteroalifático o cualquier otro resto de unión flexible con reactividades comparables. Por ejemplo, un compuesto de tiramina puede modificarse covalentemente con un marcador detectable mediante un enlazador heterobifuncional de polialquileneglicol tal como un enlazador heterobifuncional de polietilenglicol (PEG).

Una clase de enlazadores adecuada para formar conjugados descritos de tiramina-resto detectable y conjugados de tiramida-haptenos son compuestos alifáticos, tales como cadenas de hidrocarburo alifático que tienen uno o más sitios de insaturación o cadenas alquilo. La cadena alifática también incluye normalmente grupos funcionales terminales, incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, un grupo carbonilo reactivo, un grupo amina reactivo, un grupo tiol reactivo o un grupo foto-reactivo, que facilita el acoplamiento a restos detectables y a otros compuestos deseados. La longitud de la cadena puede variar, pero normalmente tiene un límite práctico superior de aproximadamente 30 átomos. Enlaces de cadena mayores de aproximadamente 30 átomos de carbono han demostrado ser menos eficaces que compuestos que tienen enlaces de cadena más pequeña. Por tanto, los enlazadores de cadena alifática normalmente tienen una longitud de cadena de aproximadamente 1 átomo de carbono a aproximadamente 30 átomos de carbono. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que, si un enlazador particular tiene más de 30 átomos, y aún funciona de forma eficaz uniendo el resto detectable a un compuesto de tiramina, y el conjugado aún funciona según lo deseado, entonces dichos enlaces de cadena aún están dentro del alcance de la presente invención. Las concentraciones típicas para conjugados de tiramida-hapteno que comprenden los enlazadores descritos varían de aproximadamente 500 pM a aproximadamente 100 μ M. Incluso concentraciones más típicas varían de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 55 μ M.

Otra clase de enlazadores útiles son óxidos de alquileo. Los óxidos de alquileo están representados en este documento por referencia a glicoles, tales como etilenglicoles. Un experto en la materia apreciará que, según aumenta la cantidad de átomos de oxígeno, puede aumentar también la hidrofiliidad del compuesto. Por tanto, los enlazadores de la presente descripción normalmente tienen una fórmula de $(-OCH_2CH_2O-)_n$ donde n es de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, pero más particularmente es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8. En algunos ejemplos, los restos detectables están presentes en la solución a una concentración de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 10,0 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM, de aproximadamente 0,02 mM, de aproximadamente 0,05 mM, de aproximadamente 0,10 mM, de aproximadamente 0,20 mM, de aproximadamente 0,50 mM, de aproximadamente 1,0 mM, de aproximadamente 2,0 mM, de aproximadamente 3,0 mM, de aproximadamente 5,0 mM, o de aproximadamente 10,0 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,10 mM, de aproximadamente 0,05 mM de aproximadamente 0,50 mM, de aproximadamente 0,4 mM de aproximadamente 1,0 mM, de aproximadamente 0,5 mM de aproximadamente 2,0 mM, y de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM.

3. Conjugados de resto de unión específica

Realizaciones particulares se refieren al uso de conjugados que comprenden un resto de unión específica y una enzima, donde el resto de unión específica es capaz de reconocer y unirse a una diana particular en una muestra. Los restos de unión específica pueden seleccionarse de oligonucleótidos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. Realizaciones particulares se refieren al uso de proteínas, tales como anticuerpos, como restos de unión específica.

En realizaciones particulares, el resto de unión específica se une a una enzima. Ejemplos de enzimas contempladas del método pueden incluir oxidoreductasas, tales como peroxidasas. Realizaciones particulares se refieren al uso de peroxidasa de rábano rústico, glutatión peroxidasa y cualquier otra peroxidasa que contenga un resto hemo.

En ciertas realizaciones, pueden usarse conjugados que comprenden un resto de unión específica y un hapteno junto con un segundo conjugado que comprende un anticuerpo anti-hapteno y una enzima. En estas realizaciones particulares, el resto de unión específica, normalmente un anticuerpo, puede reconocer una diana en una muestra y unirse a la misma. El resto de unión específica se une a un hapteno, que se reconocerá por el segundo conjugado que comprende el anticuerpo anti-hapteno y una enzima. Este segundo conjugado de anticuerpo se unirá con el primer conjugado, uniendo de ese modo la enzima a la diana. El hapteno puede seleccionarse de oxazol, pirazol, tiazol, benzofurazano, triterpeno, urea, tiourea, nitroarilo, rotenoide, cumarina, ciclolignano, heterobiarilo, azoarilo, benzodiazepina, o combinaciones de los mismos. Anticuerpos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, IgG de conejo, IgG de ratón, IgM de ratón, e IgG de cabra. Enzimas ejemplares son las descritas previamente. En algunos ejemplos, los conjugados del resto de unión específica y una enzima están presentes en la solución a una concentración de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 10,0 mM, tal como aproximadamente 0,01 mM, aproximadamente 0,02 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,10 mM, aproximadamente 0,20 mM, aproximadamente 0,50 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 5,0 mM, o aproximadamente 10,0 mM, tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,50, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,0, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0, y de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0.

4. Otros componentes

Realizaciones particulares se refieren a composiciones que comprenden adicionalmente sales que contienen metales del Grupo I o del Grupo II que tienen una fórmula MX_n o MX , donde M es un metal del Grupo I o del Grupo II, y X se selecciona de haluro, tal como fluoruro, bromuro, cloruro y yoduro; iones que contienen oxígeno, tales como carbonato, hidróxido y fosfato. Realizaciones particulares se refieren al uso de un metal del Grupo I seleccionado de sodio, litio, cesio y potasio. Otras realizaciones particulares se refieren al uso de metales del Grupo II seleccionados de magnesio, calcio, estroncio y bario. Realizaciones particulares utilizan potenciadores de sal de calcio y/o magnesio seleccionados de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y carbonato de calcio. En algunos ejemplos, los potenciadores opcionales están presentes en la solución a una concentración de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, tal como aproximadamente 0,01 mM, aproximadamente 0,02 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,10 mM, aproximadamente 0,20 mM, aproximadamente 0,50 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 5,0 mM, aproximadamente 10,0 mM, aproximadamente 20,0 mM, aproximadamente 30,0 mM, aproximadamente 40,0 mM, aproximadamente 50,0 mM, aproximadamente 75,0 mM, o aproximadamente 100,0 mM, tal como de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,10 mM, de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,50 mM, de aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 1,0 mM, de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM, de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 50,0 mM, y de aproximadamente 20,0 mM a aproximadamente 100,0 mM.

Realizaciones particulares se refieren a composiciones que comprenden adicionalmente oxidantes, inhibidores y tensioactivos como componentes que pueden usarse en cualquier combinación con cualquiera de los componentes descritos previamente. Los oxidantes pueden incluir cualquier compuesto capaz de activar de forma eficaz la enzima. Realizaciones particulares se refieren al uso de peróxidos, tales como peróxido de hidrógeno, como

oxidantes usados para activar la enzima. Normalmente, el oxidante es peróxido de hidrógeno al 0,03 %.

Puede seleccionarse un inhibidor de cualquier compuesto capaz de inhibir de forma eficaz la enzima después de haber reaccionado suficientemente de un modo que provoque la deposición del resto detectable. Realizaciones particulares se refieren a inhibidores seleccionados de peroxidasas. Normalmente, se usa peróxido de hidrógeno como inhibidor. Ciertas realizaciones se refieren al uso de peróxido de hidrógeno al 3 % como inhibidor. En realizaciones particulares, el inhibidor se añade a la muestra posterior a la adición de los otros componentes de la composición.

Realizaciones particulares de esta descripción se refieren a composiciones para su uso en la detección de una molécula diana en una muestra, tal como una muestra tisular. En algunas realizaciones, las composiciones comercialmente viables comprenden un análogo de pirimidina, un potenciador opcional, un resto detectable, un conjugado de resto de unión específica, una enzima, un oxidante y un tensioactivo. Estos componentes de la composición pueden añadirse en cualquier orden y cualquier combinación que provoque la deposición eficaz del resto detectable en la diana en la muestra. Las composiciones pueden usarse junto con un segundo anticuerpo, que se conjuga a una enzima, un oxidante y un colorante.

En realizaciones de trabajo particulares, el análogo de pirimidina es 2-hidroxipirimidina. En realizaciones de trabajo particulares, el conjugado de resto de unión específica es un conjugado de anticuerpo IgG con hapteno y el segundo anticuerpo comprende un conjugado multimérico de HRP anti-hapteno.

Realizaciones descritas particulares se refieren al uso de un tensioactivo. Los tensioactivos se clasifican como aniónicos, catiónicos o no iónicos, dependiendo de su modo de acción química. Los tensioactivos no iónicos funcionan mediante un mecanismo de unión de hidrógeno. Además, los tensioactivos reducen la tensión interfacial entre dos líquidos. Una molécula de tensioactivo normalmente tiene una "cabeza" polar o iónica y una "cola" de hidrocarburo no polar. Tras su disolución en agua, las moléculas de tensioactivo se agregan y forman micelas, en que las colas no polares están orientadas hacia adentro y las cabezas polares o iónicas están orientadas hacia afuera hacia el entorno acuoso. Las colas no polares crean un "bolsillo" no polar dentro de la micela. Los compuestos no polares en la solución se secuestran en los bolsillos formados por las moléculas de tensioactivo, permitiendo por tanto que los compuestos no polares permanezcan mezclados con la solución acuosa. En realizaciones descritas particulares, el tensioactivo puede usarse para producir propagación uniforme de reactivos a través de una sección tisular, así como disminución de la tinción de fondo.

Ejemplos de tensioactivos incluyen, aunque sin limitación, alquil éter de polioxietileno, donde el alquilo es $(\text{CH}_2)_M$ y el oxietileno es $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_N$, donde M un número entero de 5 a 16, de 8 a 14, o de 10 a 12 y N es un número entero de 10 a 40, de 15 a 30, o de 20 a 28. En una realización, el tensioactivo es lauril éter de polioxietileno que tiene la fórmula $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_23\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OH}$. En otra realización, el tensioactivo es un monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, comprendiendo el monoalquilato entre 8 y 14 carbonos. En otra realización, el tensioactivo es un polioxietileno de alcohol secundario lineal que tiene una fórmula $\text{C}_{12-14}\text{H}_{25-29}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x$, donde x es igual a un número entero entre 2 y 12. En otra realización más, el tensioactivo es un octil fenil éter de polioxietileno. Se venden tensioactivos ejemplares con los nombres: Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™, Triton™, Ecosurf™, Dowfax™, polisorbato 80™, BigCHAP, Deoxy BigCHAP, IGEPAL®, Saponina, Thesit®, Nonidet®, Pluronic F-68, digitonina, desoxicolato, y similares. Realizaciones particulares de trabajo descritas se refieren al uso de tensioactivos seleccionados de Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™, Triton™.

B. Método de detección de una molécula diana

Las composiciones descritas son particularmente útiles para la detección de moléculas diana en muestras porque actúan de forma sinérgica para proporcionar deposición maximizada durante tinción tisular IHC o ISH. Por tanto, la presente descripción proporciona un método de detección de una molécula diana en una muestra, tal como una muestra tisular. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto una muestra con una solución de potenciación que incluye un análogo de pirimidina como se describe en la sección precedente (Sección A), poner en contacto la muestra con una enzima y poner en contacto la muestra con un resto detectable capaz de detectarse usando técnicas de deposición o fluorescentes. En algunos ejemplos, la enzima actúa sobre un sustrato para catalizar la producción del resto detectable, que se deposita sobre la muestra en la localización de la molécula diana, posibilitando de ese modo la detección de la molécula diana. El resto detectable se detecta detectando de ese modo la molécula diana en una muestra. En algunos ejemplos, se mide la intensidad y/o la localización de una señal producida por el resto detectable, por ejemplo, para determinar la cantidad y/o la localización de la molécula diana en la muestra tisular. La diana puede ser cualquier molécula de interés para la que tiene que determinarse la presencia, la localización y/o la concentración. Ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el análogo de pirimidina es pirimidina y/o 2-hidroxipirimidina.

En algunas realizaciones, la enzima se inmoviliza sobre la diana incubando la muestra con un conjugado enzimático que se une a la diana. La enzima puede conjugarse a cualquier resto capaz de unirse a la diana, por ejemplo, puede conjugarse un anticuerpo o ácido nucleico que reconozca específicamente la molécula diana. Los restos adecuados incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos, nucleótidos, oligonucleótidos, proteínas, péptidos o aminoácidos.

En otras realizaciones, la inmovilización de la enzima es un proceso de múltiples etapas. Por ejemplo, la muestra puede incubarse con un primer resto (por ejemplo, un anticuerpo, un nucleótido, un oligonucleótido, una proteína, un oligopéptido, un péptido o un aminoácido) que se une a la diana. La muestra después puede incubarse con un conjugado enzimático que comprende un resto que es capaz de unirse al primer resto. En algunas realizaciones, cuando el primer resto es un anticuerpo contra la diana, el proceso de dos etapas puede ser más versátil porque permite al usuario emplear un conjugado "universal" de enzima-anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de conejo, el conjugado de enzima-anticuerpo puede incluir un anticuerpo que es capaz de unirse a cualquier anticuerpo monoclonal de conejo, por ejemplo, un anticuerpo secundario. El proceso de múltiples etapas puede eliminar la necesidad de generar un conjugado de enzima-anticuerpo que sea adecuado para cada diana.

En algunas realizaciones, el primer resto puede ser una sonda marcada, tal como un oligonucleótido marcado. Después de que la sonda haya hibridado con la muestra, se introduce un primer anticuerpo que reconoce el marcador y se une a la sonda marcada. El primer anticuerpo puede ser un conjugado de enzima-anticuerpo. Sin embargo, si el primer anticuerpo no está conjugado a una enzima, se introduce un conjugado de enzima-anticuerpo donde el resto de anticuerpo del conjugado reconoce y se une al primer anticuerpo.

En algunas realizaciones, la enzima es una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano rústico o glutatión peroxidasa o una oxidoreductasa. Por tanto, se seleccionan condiciones adecuadas para la reacción enzimática tal como una concentración salina y pH que posibiliten que la enzima realice su función deseada, por ejemplo, para convertir el sustrato en un resto detectable que se deposite sobre la muestra tisular en el sitio de la molécula diana. La reacción se realiza a una temperatura que es adecuada para la enzima. Por ejemplo, si la enzima es peroxidasa de rábano rústico, la reacción puede realizarse a aproximadamente 35-40 °C.

En algunos ejemplos, un resto detectable es un cromógeno, un fluoróforo, un hapteno o una proteína. En ejemplos específicos, el resto detectable es 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol o tetrametilbencidina o un producto de reacción de los mismos. Ejemplos adicionales de cromógenos para su uso en los métodos descritos se dan en la sección precedente (Sección A).

En otros ejemplos, un resto detectable es un fluoróforo, tal como una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un colorante BODIPY, una resorufina o una rodamina. Ejemplos adicionales de fluoróforos para su uso en las realizaciones del método descrito se dan en la sección precedente (Sección A).

En otros ejemplos, un resto detectable es un hapteno, tal como un oxazol, pirazol, un tiazol, un benzofurazano, un triterpeno, una urea, una tiourea, un nitroarilo, un rotenoide, una cumarina, un ciclogignano, un heterobiarilo, un azoarilo, o benzodiazepina.

En realizaciones específicas, el resto detectable se conjuga a tiramina, por ejemplo, mediante un enlazador, tal como un enlazador alifático o heteroalifático de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono en una cadena. En realizaciones específicas, el enlazador es un óxido de alquileo, tal como etilenglicol o un polímero del mismo, por ejemplo, un polímero con 1 a aproximadamente 15 unidades de etilenglicol. Cuando se usan tiraminas con los métodos descritos, puede usarse amplificación de la señal de tiramida para amplificar adicionalmente la señal generada. La amplificación de señal de tiramida utiliza la actividad catalítica de una enzima peroxidasa para unir covalentemente un resto de tiramina o un derivado de tiramina a una fase sólida. La fase sólida puede ser, por ejemplo, componentes proteicos de células o estructuras celulares que se inmovilizan sobre un sustrato tal como un portaobjetos de microscopio. Algunas enzimas peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano rústico), en presencia de un peróxido, pueden catalizar la dimerización de compuestos fenólicos. Por tanto, si se añade tiramina a una muestra que contiene proteínas en presencia de peroxidasa de rábano rústico y peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), el grupo fenol de tiramina puede formar un dímero con el grupo fenol de un aminoácido tirosina.

Solamente las moléculas de tiramina en cercana proximidad a la enzima inmovilizada reaccionarán y formarán dímeros con restos de tirosina en las cercanías de, o proximales a, la enzima inmovilizada, incluyendo restos de tirosina en la propia enzima, restos de tirosina en el anticuerpo con el que está conjugada la enzima y/o restos de tirosina en la muestra que están proximales a la enzima inmovilizada, tal como dentro de aproximadamente 100 nm, dentro de aproximadamente 50 nm, dentro de aproximadamente 10 nm o dentro de aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Por ejemplo, el resto de tirosina puede estar dentro de una distancia de aproximadamente 10 angstrom a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 10 angstrom a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 10 angstrom a aproximadamente 10 nm o de aproximadamente 10 angstrom a aproximadamente 5 nm desde la enzima inmovilizada. Dicha unión proximal permite que la diana se detecte con al menos algún grado de especificidad como los métodos convencionales de tinción usados con IHS y/o ISH. Por ejemplo, realizaciones del método descrito permiten distinguir estructuras subcelulares, por ejemplo, membrana nuclear frente a la región nuclear, membrana celular frente a la región citoplasmática, etc.

Una vez la enzima está inmovilizada sobre la muestra, se introduce el conjugado de tiramida en condiciones adecuadas para posibilitar que la enzima reaccione con la tiramida. Normalmente, la enzima es una peroxidasa, tal

como peroxidasa de rábano rusticano. En dichas condiciones, la tiramida reacciona con el peróxido y la enzima, convirtiendo la tiramida en una forma activa que se une covalentemente a la muestra, normalmente por unión a un resto de tirosina proximal a la enzima inmovilizada, incluyendo restos de tirosina dentro de la propia enzima inmovilizada. Después de que el conjugado de tiramida se haya unido a la muestra, su presencia se detecta por medios adecuados, por ejemplo, en virtud de un resto detectable unido a la tiramida.

En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto adicionalmente con al menos un potenciador opcional, tal como uno o más de un grupo heteroarilo, una sal que contiene metal del Grupo I o del Grupo II, un compuesto que contiene boro, un compuesto de fenol. Potenciadores opcionales ejemplares se describen en la sección precedente (Sección A). En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un oxidante, tal como una peroxidasa, por ejemplo, hidrógeno peroxidasa. En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un tensioactivo, tal como Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™, y Triton™. En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un antioxidante, tal como estannato de sodio, metabisulfato de sodio y bisulfato de sodio.

Las realizaciones del método descrito en este documento pueden realizarse de forma manual o automática, por ejemplo, en un instrumento automatizado de procesamiento de tejidos. Los sistemas automatizados normalmente están al menos parcialmente, sino de forma sustancialmente completa, bajo el control de un ordenador. Como los sistemas automatizados normalmente están al menos parcialmente controlados por ordenador, ciertas realizaciones de la presente descripción también se refieren a uno o más medios tangibles legibles en ordenador que almacenan instrucciones ejecutables por ordenador para hacer que un ordenador realice realizaciones descritas del método.

C. Muestras y dianas

Las muestras incluyen componentes biológicos y generalmente se sospecha que incluyen una o más moléculas diana de interés. Las moléculas diana pueden estar sobre la superficie de células y las células pueden estar en una suspensión o en una sección tisular. Las moléculas diana también pueden ser intracelulares y detectarse tras lisis celular o penetración de la célula por una sonda. Los expertos en la materia apreciarán que el método de detección de moléculas diana en una muestra variará dependiendo del tipo de muestra y sonda que se esté usando. Los métodos de recogida y preparación de muestras son conocidos en la técnica.

Las muestras para su uso en las realizaciones del método y con la composición descrita en este documento, tal como una muestra tisular u otra muestra biológica, pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica por los expertos en la materia. Las muestras pueden obtenerse de un sujeto para exploración rutinaria o de un sujeto que se sospecha un trastorno, tal como una anomalía genética, infección o una neoplasia. Las realizaciones descritas del método descrito también pueden aplicarse a muestras que no tienen anomalías genéticas, enfermedades, trastornos, etc., mencionadas como muestras "normales". Dichas muestras normales son útiles, entre otras cosas, como controles para comparación con otras muestras. Las muestras pueden analizarse para muchos propósitos diferentes. Por ejemplo, las muestras pueden usarse en un estudio científico o para el diagnóstico de una enfermedad sospechosa, o como indicadores de pronóstico para el éxito del tratamiento, supervivencia, etc.

Las muestras pueden incluir múltiples dianas que pueden unirse específicamente a una sonda o molécula indicadora. Las dianas pueden ser secuencias de ácido nucleico o proteínas. Durante toda esta descripción cuando se hace referencia a una proteína diana se entiende que las secuencias de ácido nucleico asociadas con esa proteína también pueden usarse como diana. En algunos ejemplos, la diana es una proteína o molécula de ácido nucleico de un patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito intracelular, tal como de un genoma vírico. Por ejemplo, una proteína diana puede producirse a partir de una secuencia de ácido nucleico diana asociada con (por ejemplo, correlacionada con, implicada de forma causal en, etc.) una enfermedad.

Una secuencia de ácido nucleico diana puede variar sustancialmente en tamaño. Sin limitación, la secuencia de ácido nucleico puede tener una cantidad variable de restos de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana puede tener al menos aproximadamente 10 restos de ácido nucleico o al menos aproximadamente 20, 30, 50, 100, 150, 500, 1000 restos. Asimismo, un polipéptido diana puede variar sustancialmente en tamaño. Sin limitación, el polipéptido diana incluirá al menos un epítipo que se une a un anticuerpo específico de péptido o fragmento del mismo. En algunas realizaciones ese polipéptido puede incluir al menos dos epítipos que se unen a un anticuerpo específico de péptido, o fragmento del mismo.

En ejemplos no limitantes específicos, se produce una proteína diana por una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia genómica de ácido nucleico diana) asociada con una neoplasia (por ejemplo, un cáncer). Se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluyendo translocaciones y otros reordenamientos, amplificación o delección) en células neoplásicas, especialmente en células cancerosas, tales como leucemias de células B y células T, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon, cánceres neurológicos y similares. Por lo tanto, en algunos ejemplos, al menos una parte de la molécula diana se produce por una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia genómica de ácido nucleico diana) amplificada o delecionada en al menos un subconjunto de células en una muestra.

Se sabe que los oncogenes son responsables de varias neoplasias humanas. Por ejemplo, los reordenamientos cromosómicos que implican el gen SYT localizado en la región de rotura del cromosoma 18q11.2 son comunes entre tumores de tejido blando de sarcoma sinovial. La translocación t(18q11.2) puede identificarse, por ejemplo, usando sondas con diferentes marcadores: la primera sonda incluye moléculas de ácido nucleico FPC generadas a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende de forma distal desde el gen SYT, y la segunda sonda incluye el ácido nucleico FPC generado a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende 3' o proximal al gen SYT. Cuando se usan sondas correspondientes a estas secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias genómicas de ácidos nucleico diana) en un procedimiento de hibridación *in situ*, las células normales, que carecen de un t(18q11.2) en la región génica SYT, muestran dos señales de fusión (generadas por los dos marcadores en cercana proximidad), lo que refleja las dos copias intactas de SYT. Células anormales con un t(18q11.2) muestran una única señal de fusión.

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

Los ejemplos mencionados anteriormente se proporcionan únicamente con fines de ilustración y no pretenden ser limitantes. Los expertos en la materia conocen otras numerosas anomalías citogenéticas que se correlacionan con transformación y/o crecimiento neoplásico. Las proteínas diana que se producen por secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias genómicas de ácido nucleico diana), que se han correlacionado con transformación neoplásica y que son útiles en los métodos descritos, también incluyen el gen EGFR (7p12; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000007, nucleótidos 55054219-55242525), el gen C-MYC (8q24.21; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000008, nucleótidos 128817498-128822856), D5S271 (5p15.2), gen de lipoproteína lipasa (LPL) (8p22; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000008, nucleótidos 19841058-19869049), RB1 (13q14; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ C_000013, nucleótidos 47775912-47954023), p53 (17p13.1; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000017, complemento, nucleótidos 7512464-7531642), N-MYC (2p24; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000002, complemento, nucleótidos 151835231-151854620), CHOP (12q13; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000012, complemento, nucleótidos 56196638-56200567), FUS (16p11.2; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000016, nucleótidos 31098954-31110601), FKHR (13p14; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000013, complemento, nucleótidos 40027817-40138734), así como, por ejemplo: ALK (2p23; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000002, complemento, nucleótidos 29269144-29997936), cadena pesada de Ig, CCND1 (11q13; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000011, nucleótidos 69165054..69178423), BCL2 (18q21.3; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000018, complemento, nucleótidos 58941559-59137593), BCL6 (3q27; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000003, complemento, nucleótidos 188921859-188946169), MALF1, AP1 (1p32-p31; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000001, complemento, nucleótidos 59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000017, complemento, nucleótidos 35798321-35827695), Tmprss (21q22.3; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000021, complemento, nucleótidos 41758351-41801948), ERG (21q22.3; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000021, complemento, nucleótidos 38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000007, complemento, nucleótidos 13897379-13995289), EWS (22q12.2; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000022, nucleótidos 27994271-28026505); FLI1 (11q24.1-q24.3; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ C_000011, nucleótidos 128069199-128187521), PAX3 (2q35-q37; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000002, complemento, nucleótidos 222772851-222871944), PAX7 (1p36.2-p36.12; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000001, nucleótidos 18830087-18935219), PTEN (10q23.3; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000010, nucleótidos 89613175-89716382), AKT2 (19q13.1-q13.2; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000019, complemento, nucleótidos 45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000001, complemento, nucleótidos 40133685-40140274), REL (2p13-p12; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000002, nucleótidos 60962256-61003682) y CSF1R (5q33-q35; por ejemplo, n.º de acceso a GENBANK™ NC_000005, complemento, nucleótidos 149413051-149473128).

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

En algunos ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia genómica de ácido nucleico diana) de un genoma vírico. Virus ejemplares y las secuencias genómicas

correspondientes (n.º de acceso de la secuencia de referencia de GENBANK™ en paréntesis) incluyen adenovirus humano A (NC_001460), adenovirus humano B (NC_004001), adenovirus humano C (NC_001405), adenovirus humano D (NC_002067), adenovirus humano E (NC_003266), adenovirus humano F (NC_001454), astrovirus humano (NC_001943), poliomavirus BK humano (V01109; GI:60851) bocavirus humano (NC_007455), coronavirus 229E humano (NC_002645), coronavirus HKU1 humano (NC_006577), coronavirus NL63 humano (NC_005831), coronavirus OC43 humano (NC_005147), enterovirus humano A (NC_001612), enterovirus humano B (NC_001472), enterovirus humano C (NC_001428), enterovirus humano D (NC_001430), eritrovirus humano V9 (NC_004295), virus espumoso humano (NC_001736), herpesvirus humano 1 (virus del Herpes simple tipo 1) (NC_001806), herpesvirus humano 2 (virus del Herpes simple tipo 2) (NC_001798), herpesvirus humano 3 (virus Varicela zoster) (NC_001348), herpesvirus humano 4 tipo 1 (virus de Epstein-Barr tipo 1) (NC_007605), herpesvirus humano 4 tipo 2 (virus de Epstein-Barr tipo 2) (NC_009334), herpesvirus humano 5 cepa AD 169 (NC_001347), herpesvirus humano 5 cepa Merlin Strain (NC_006273), herpesvirus humano 6A (NC_001664), herpesvirus humano 6B (NC_000898), herpesvirus humano 7 (NC_001716), herpesvirus humano 8 tipo M (NC_003409), herpesvirus humano 8 tipo P (NC_009333), virus de la inmunodeficiencia humana 1 (NC_001802), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (NC_001722), metapneumovirus humano (NC_004148), papilomavirus humano 1 (NC_001356), papilomavirus humano 18 (NC_001357), papilomavirus humano 2 (NC_001352), papilomavirus humano 54 (NC_001676), papilomavirus humano 61 (NC_001694), papilomavirus humano-cand90 (NC_004104), papilomavirus humano RTRX7 (NC_004761), papilomavirus humano tipo 10 (NC_001576), papilomavirus humano tipo 101 (NC_008189), papilomavirus humano tipo 103 (NC_008188), papilomavirus humano tipo 107 (NC_009239), papilomavirus humano tipo 16 (NC_001526), papilomavirus humano tipo 24 (NC_001683), papilomavirus humano tipo 26 (C_001583), papilomavirus humano tipo 32 (C_001586), papilomavirus humano tipo 34 (NC_001587), papilomavirus humano tipo 4 (NC_001457), papilomavirus humano tipo 41 (NC_001354), papilomavirus humano tipo 48 (NC_001690), papilomavirus humano tipo 49 (NC_001591), papilomavirus humano tipo 5 (NC_001531), papilomavirus humano tipo 50 (NC_001691), papilomavirus humano tipo 53 (NC_001593), papilomavirus humano tipo 60 (NC_001693), papilomavirus humano tipo 63 (NC_001458), papilomavirus humano tipo 6b (NC_001355), papilomavirus humano tipo 7 (NC_001595), papilomavirus humano tipo 71 (NC_002644), papilomavirus humano tipo 9 (NC_001596), papilomavirus humano tipo 92 (NC_004500), papilomavirus humano tipo 96 (NC_005134), virus de la parainfluenza humana 1 (NC_003461), virus de la parainfluenza humana 2 (NC_003443), virus de la parainfluenza humana 3 (NC_001796), parechovirus humano (NC_001897), parvovirus humano 4 (NC_007018), parvovirus humano B 19 (NC_000883), virus sincitial respiratorio humano (NC_001781), rinovirus A humano (NC_001617), rinovirus B humano (NC_001490), retrovirus espuma humano (NC_001795), virus linfotrópico-T humano 1 (NC_001436), virus linfotrópico-T humano 2 (NC_001488).

En ciertos ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia genómica de ácido nucleico diana) a partir de un virus oncogénico, tal como virus de Epstein-Barr (EBV) o un virus del papiloma humano (HPV, por ejemplo, HPV16, HPV18). En otros ejemplos, la proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia genómica de ácido nucleico diana) es de un virus patógeno, tal como un virus sincitial respiratorio, un virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis C), un coronavirus (por ejemplo, virus SARS), un adenovirus, un poliomavirus, un citomegalovirus (CMV) o un virus del Herpes simple (HSV).

D. Preparación de muestras

Las muestras tisulares descritas en este documento pueden prepararse usando cualquier método ahora conocido o a partir de ahora desarrollado en la técnica. En líneas generales, se preparan muestras tisulares fijando e incrustando el tejido en un medio.

En algunos ejemplos, se usa un medio de incrustación. Un medio de incrustación es un material inerte en que se incrustan tejidos y/o células para ayudar a conservarlos para futuro análisis. La incrustación también posibilita que las muestras tisulares se corten en secciones delgadas. El medio de incrustación incluye, aunque sin limitación, parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plásticos o acrílicos.

Muchos medios de incrustación son hidrófobos; por lo tanto, puede que se necesite retirar el material inerte antes del análisis histológico o citológico, que utiliza reactivos principalmente hidrófilos. El término desparafinización o desparafinado se usa ampliamente en este documento para hacer referencia a la retirada parcial o completa de cualquier tipo de medio de incrustación de una muestra biológica. Por ejemplo, las secciones tisulares incrustadas en parafina se desparafinan por pase a través de disolventes orgánicos, tales como tolueno, xileno, limoneno u otros disolventes adecuados.

El proceso de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra tisular conserva las células y los constituyentes tisulares en un estado lo más cercano posible al estado vivo y les permite experimentar procedimientos preparativos sin cambio significativo. La fijación detiene los procesos de autólisis y descomposición bacteriana que empiezan tras la muerte celular, y estabiliza los constituyentes celulares y tisulares de modo que resisten las fases posteriores de procesamiento tisular, tal como para IHC o ISH.

65

Los tejidos pueden fijarse por cualquier proceso adecuado, incluyendo perfusión o por inmersión en un fijador. Los fijadores pueden clasificarse como agentes reticulantes (tales como aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de reticulación no de aldehído) agentes oxidantes (por ejemplo iones y complejos metálicos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturalizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercúrico, acetona y ácido pícrico, reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, methacarn, fluido de Bouin, fijador B5, fluido de Rossman y fluido de Gendre), microondas y fijadores diversos (por ejemplo, fijación de volumen excluido y fijación por vapor). También pueden incluirse aditivos en el fijador, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (tales como cloruro de zinc, sulfato de zinc y sales de litio), y lantano.

El fijador más habitualmente usado en la preparación de muestras para IHC es formaldehído, generalmente en forma de una solución de formalina (formaldehído al 4 % en una solución tamponante, mencionada como formalina tamponada al 10 %). En un ejemplo, el fijador es formalina tamponada neutra al 10 %.

15 *E. Tinción con contraste*

La tinción con contraste es un método de tratamiento posterior de las muestras después de que ya se hayan teñido con agentes para detectar una o más dianas, de modo que sus estructuras puedan visualizarse más fácilmente al microscopio. Por ejemplo, se usa opcionalmente un tinte de contraste antes de tapar con el cubreobjetos para hacer que el tinte inmunohistoquímico sea más distinto. El tinte de contraste difiere en color de un tinte primario. Son bien conocidos numerosos tintes de contraste, tales como hematoxilina, eosina, verde metilo, azul metileno, Giemsa, azul Alcian y rojo Nuclear Fast.

En algunos ejemplos, pueden mezclarse, más de un tinte juntos para producir el tinte de contraste. Esto proporciona flexibilidad y la capacidad de elegir tintes. Por ejemplo, un primer tinte, puede seleccionarse de la mezcla que tiene un atributo particular, pero aún no tiene un diferente atributo deseado. Puede añadirse un segundo tinte a la mezcla que presenta el atributo deseado perdido. Por ejemplo, puede mezclarse azul toluidina, DAPI y azul cielo pontamina juntos para formar un tinte de contraste.

30 *F. Imágenes*

Ciertos aspectos, o todos, de las realizaciones descritas pueden automatizarse y facilitarse por análisis informático y/o sistema de análisis de imágenes. En algunas aplicaciones, se miden relaciones precisas de color. En algunas realizaciones, se utiliza microscopía óptica para el análisis de imágenes, ciertas realizaciones descritas implican adquirir imágenes digitales. Esto puede hacerse acoplando una cámara digital a un microscopio. Las imágenes digitales obtenidas de muestras teñidas se analizan usando un software de análisis de imágenes. El color puede medirse de varios modos diferentes. Por ejemplo, puede medirse el color como valores de rojo, azul y verde; valores de matiz, saturación e intensidad; y/o midiendo una longitud de onda específica o intervalo de longitudes de onda usando una cámara espectral de imágenes.

Una realización descrita implica el uso de imágenes de campo claro con colorantes cromogénicos. La luz blanca en el espectro visible se transmite a través del colorante. El colorante absorbe 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 luz transmitida.

Las muestras también pueden evaluarse cualitativamente y semicuantitativamente. La evaluación cualitativa incluye evaluar la intensidad de tinción, identificar las células teñidas de forma positiva y los compartimentos intracelulares implicados en la tinción y evaluar la muestra global o calidad del portaobjetos. Se realizan evaluaciones diferentes sobre las muestras de ensayo y este análisis puede incluir una comparación de valores promedio conocidos para determinar si las muestras representan un estado anormal.

50 *G. Kits*

Las realizaciones descritas proporcionan, en parte, kits para realizar diversas realizaciones del método de la invención. Ejemplos de dichos kits incluyen aquellos útiles para análisis de colesterol, kits de embarazo, kits de diagnóstico del cáncer, etc. En algunas realizaciones, el kit incluye un análogo de pirimidina que tiene una fórmula descrita en la Sección A.

En algunas realizaciones, el kit incluye una enzima, tal como una oxidoreductasa o una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano rusticana o glutatión peroxidasa. En algunos ejemplos, el kit incluye un resto de unión específica, tal como un anticuerpo o un ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana. En algunos ejemplos, el resto de unión específica y la enzima se unen juntos.

En algunas realizaciones, el kit incluye un resto detectable capaz de detectarse usando técnicas de deposición o fluorescentes, o un sustrato enzimático que produce el resto detectable después de reacción con la enzima. En algunos ejemplos, el resto detectable es un fluoróforo (tal como una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un

5 colorante BODIPY, una resorufina, o una rodamina), un hapteno (tal como oxazol, pirazol, tiazol, benzofurazano, triterpeno, urea, tiourea, nitroarilo, rotenoide, cumarina, ciclolignano, heterobiarilo, azoarilo, benzodiazepina), una proteína o un cromógeno (tal como 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol o tetrametilbencidina). El kit puede incluir opcionalmente al menos un potenciador opcional, tal como un compuesto heteroarilo, una sal que contiene metal del Grupo I o Grupo II, un compuesto que contiene boro y un compuesto de fenol, por ejemplo, los descritos en la Sección A,

En algunas realizaciones, el kit incluye un oxidante, tal como un peróxido, por ejemplo, peróxido de hidrógeno.

10 En algunas realizaciones, el kit incluye un tensioactivo, tal como Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™, y Triton™.

En algunas realizaciones, el kit incluye un antioxidante seleccionado de estannato de sodio, metabisulfato de sodio y bisulfato de sodio.

15 En algunas realizaciones, el kit incluye mordiente de cobre. El kit puede incluir componentes adicionales, incluyendo anticuerpos, sondas marcadas con hapteno y otros reactivos necesarios para realizar IHC y/o ISH por detección cromogénica. Dichos kits pueden usarse, por ejemplo, por un clínico o médico como un auxiliar para seleccionar una terapia apropiada para un paciente particular o con fines de diagnóstico.

20 Realizaciones particulares se refieren al uso de kits que comprenden un inhibidor, tal como H₂O₂ al 3 %; una HRP multimérica universal, tal como anticuerpo de cabra anti-ratón/conejo conjugado con HRP; un peróxido, tal como H₂O₂ al 0,03 %; un cromógeno, tal como DAB; y un mordiente de cobre. Este kit se menciona como ultraView™ y puede usarse en combinación con los potenciadores descritos.

25 *H. Realizaciones automatizadas*

Los expertos en la materia apreciarán que realizaciones del método descrito en este documento para detección cromogénica de dos o más moléculas pueden automatizarse. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de varias patentes de Estados Unidos que describen sistemas y métodos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de Estados Unidos n.º 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y las solicitudes publicadas de Estados Unidos n.º 20030211630 y 20040052685. Se realizaron realizaciones particulares de los procedimientos usando diversos procesos automatizados.

35 *IV. Ejemplos de trabajo*

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características específicas de realizaciones de trabajo. El alcance de la presente invención no está limitado a esas características ejemplificadas por los siguientes ejemplos.

40 Ejemplo 1

Tinción tisular IHC con imidazol

45 La tinción IHC de bcl2 sobre amígdalas se realizó usando el cromógeno DAB universal ultraView™ potenciado con imidazol. El imidazol (10 mM - 100 mM) aumentaba significativamente la intensidad de la tinción DAB (véanse las FIG. 1 y 2). Sin embargo, según aumentaba la seña DAB deseada también lo hacía la señal de fondo observada. Concentraciones mayores de imidazol demostraron ser compatibles causando que DAB precipitara de la solución de cromógeno DAB reformulada.

50 Ejemplo 2

Detección cinética de potenciadores

55 Se desarrolló un ensayo de placa para detectar independientemente compuestos potenciales y comprender mejor la deposición potenciada observada de DAB como se demuestra en el Ejemplo 1. Los aditivos se añadieron directamente a un pocillo que contenía los reactivos necesarios del kit de detección ultraView™ (VMSI 760-500: 253-4290, 253-4292 y 253-4293) en tampón de reacción 1X (VMSI 950-300) y gelatina de pescado al 0,1 %. La gelatina de pescado se usó para ayudar a dispersar la DAB oxidada e inhibir su precipitación de la solución. El kit de detección ultraView™ se diluyó para medir la formación de DAB oxidada por UV-VIS a 455 nm. Los aditivos se ensayaron a concentraciones establecidas para determinar la potenciación en la reacción de oxidación de DAB. Los datos se representaron en gráfico y se calculó la velocidad máxima aparente ($V_{m\acute{a}x}$) a cada nivel de concentración de aditivo.

65 El ensayo inicial de ácido 4-acetilamidofenil borónico e imidazol demostró una velocidad de reacción aumentada para HRP según se aumentaba la concentración de cada aditivo (véanse las FIG. 3 y 4, respectivamente). La ($V_{m\acute{a}x}$) aparente para DAB oxidada con HRP era 18,5 mDO/minuto sin potenciación. La adición de imidazol 10 mM aumentó

la ($V_{m\acute{a}x}$) aparente en un 56 %, y 10 mM de ácido 4-acetilamidofenil borónico aumentó la ($V_{m\acute{a}x}$) aparente en un 77 %. (Porcentaje de aumento de $V_{m\acute{a}x}$ = $[(V_{m\acute{a}x}$ potenciada - $V_{m\acute{a}x}$ de uView)/ $V_{m\acute{a}x}$ de uView] x 100%).

5 Estimulados por los resultados anteriores, se examinaron otros tampones que podían usarse como potenciadores potenciales. Además del uso conceptual de análogos de imidazol, se exploraron reacciones de oxidación mediadas por peróxido facilitadas por L-histidina. 50 mM de L-histidina aumentaba la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de HRP en un 138 % (véase la FIG. 5). Como con concentraciones mayores de imidazol, L-histidina 50 mM también causaba la precipitación de DAB de la solución de cromógeno DAB reformulada. Se utilizó una concentración de L-histidina 10 mM con reformulaciones de DAB. La $V_{m\acute{a}x}$ aparente de HRP se aumentó al 18 % con L-histidina 10 mM. También se
10 ensayaron tampones borato. La capacidad tamponante del ácido bórico no está en el intervalo de pH deseado (intervalo de pH variable de aproximadamente 1 a aproximadamente 7,9, variando del pH final de aproximadamente 2 a aproximadamente 3) para la formulación de DAB porque el ácido bórico tiene un intervalo tamponante de pH eficaz de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10,2. La adición de 10 mM de ácido bórico potenciaba la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de HRP en un 265 %, sin embargo, a 50 mM, el ácido bórico potenciaba enormemente la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de
15 HRP en un 592 % (véase la FIG. 6).

Se examinaron otros compuestos heterocíclicos para encontrar una nueva clase de potenciadores que aumentara adicionalmente la velocidad aparente de HRP. Se descubrieron análogos de pirimidina como una novedosa clase de potenciadores. Puede encontrarse un resumen de los resultados de ensayo para todos los potenciadores de la oxidación de DAB mediada por HRP en la Tabla 1.
20

Tabla 1: Influencia de potenciadores sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada por HRP cuando se añaden al kit de detección ultraView™.

Potenciador	Concentración (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mDO/min)	Coef. reg
Sin potenciador	n/a	18,50	0,985
	10	67,47	0,989
Ácido bórico	50	128,00	0,935
	100	47,60 (sat)	0,999
	5	43,50	0,984
Cloruro de calcio	10	52,50	0,999
	20	57,00	0,998
	5	21,20	0,971
4-AcHNPhB(OH) ₂	10	32,80	0,975
	20	32,00	0,977
	10	28,80	0,982
Imidazol	50	38,80	0,967
	100	70,00	0,954
	10	66,40	0,993
Tiazol	50	27,00 (sat)	0,989
	100	27,05 (sat)	0,972
	10	24,00	0,995
Oxazol	50	40,00	0,961
	100	18,00 (sat)	0,998
	10	104,00	0,961
Pirimidina	50	124,00	0,968
	100	36,80 (sat)	0,983
	10	21,84	0,973
L-Histidina	50	44,00	0,999
	100	72,00	0,961
	10	144,00	2 pt.
2-Hidroxipirimidina	50	156,00	2 pt.
	100	148,00	2 pt.
	10	82,00	0,984
Timina	50 (sol)	86,00	0,896
	100 (sol)	74,00	0,990
	10	36,00	0,931
Citosina	50 (sol)	66,00	0,857
	100 (sol)	n/a (1)	n/a (1)
	10	52,00	0,942
Uracilo	50 (sol)	72,00	0,933
	100 (sol)	n/a (1)	n/a (1)
	10	54,00	0,964
Ácido 2-tiobarbitúrico	50	56,00	0,911
	100	76,00	0,920

Potenciador	Concentración (mM)	V _{máx} (mDO/min)	Coef. reg
N-óxido de pirimidina	10	104,00	2 pt.
	50	104,00	2 pt.
	100	36,00 (sat)	2 pt.
TEMPO	0,13 % (8 mM)	18,00	0,993
	0,25 % (16 mM)	24,80	0,914
	0,50 % (32 mM)	21,20	0,959
NMO	0,13 % (10,7 mM)	33,60	0,933
	0,25 % (21,3 mM)	43,60	0,988
	0,50 % (42,7 mM)	51,60	0,971
L-Triptófano	10	30,00	0,994
	50	52,00	0,825
	100	64,00	2 pt.
2-Hidroxipiridina	10	47,67	2 pt.
	50	18,19 (sat)	0,970
	100	15,98 (sat)	0,985

La densidad óptica total de DAB oxidada se controló a 455 nm. (Sat) = La velocidad de la reacción se saturaba por el inicio del análisis UV- VIS. (Sol) = Las cuestiones de solubilidad sucedían a temperatura ambiente. Se requirió calor para disolver el aditivo en tampón de reacción. (1) el aditivo no era soluble a temperatura ambiente.

5 La adición de 10 mM de pirimidina aumentaba enormemente la V_{máx} aparente de HRP en un 462 %. Este aumento aparente de la tasa de la oxidación de DAB era mayor que lo observado con otros potenciadores heterocíclicos (imidazol, tiazol y estructuras de núcleo oxazol). El aumento de la concentración de pirimidina hasta 50 mM proporcionaba un aumento moderado en la V_{máx} de HRP respecto a 10 mM (570 %) (véase la FIG. 7). Una reformulación del cromógeno DAB con pirimidina posee un problema potencial debido a la alta presión de vapor (bp ≈ 124 °C). Por tanto, se investigaron otros análogos de pirimidina para descubrir una alternativa adecuada que no tuviera problemas de volatilidad.

15 Las bases de nucleótido pirimidina (timina, uracilo y citosina) aumentaban la velocidad aparente de HRP, sin embargo, tenían problemas de solubilidad en tampones acuosos. Se descubrió que tanto 2-hidroxipiridina (véase la FIG. 8) como N-óxido de pirimidina proporcionaban velocidades aparentes similares o aumentadas respecto a pirimidina y no tenían problemas de solubilidad o volatilidad. Se ha demostrado previamente que N-óxidos heterocíclicos de cinco y seis miembros aumentan la velocidad aparente de la oxidación basada en HRP de oligosacáridos y también de polisacáridos, concretamente la oxidación de celulosa. Las reformulaciones de DAB con N-óxido de pirimidina perdían funcionalidad y detenían la tinción con el tiempo. Sin embargo, el N-óxido de pirimidina aún es de utilidad en una solución de potenciación si se añade a reacciones de oxidación mediadas por HRP sobre el tejido. Además de la pirimidina, 2-hidroxipiridina 10 mM aumentaba la V_{máx} aparente de HRP (157 %). El bencimidazol, azul metileno, fenotiazina y 4-dimetilaminopiridina no proporcionaban potenciación.

25 Ejemplo 3

Efectos sinérgicos y antagonistas para los potenciadores

30 El ensayo de placa del Ejemplo 2 se usó para examinar los efectos sinérgicos y antagonistas potenciales de cada aditivo sobre la velocidad aparente de la oxidación de DAB mediado por HRP. Se usó la misma concentración de reactivos del kit de detección ultraView™ (VMSI 760-500: 253-4290, 253- 4292 y 253-4293) en Reaction Buffer™ 1X que contenía gelatina de pescado al 0,1 % para cada ensayo. En cada ensayo, los potenciadores se añadieron juntos de una vez. Los resultados se resumieron en la FIG. 9 y en la Tabla 2.

35 Tabla 2: Se evaluó la influencia de potenciadores sobre la V_{máx} aparente para DAB oxidada por HRP cuando se añadían secuencialmente al kit de detección ultraView™.

Entrada	Potenciador	V _{máx} (mDO/min)	Coef. Reg
1	Sin Potenciador	18,50	0,985
2	Imidazol 10 mM	34,00	0,904
3	(2) + Cloruro de Calcio 10 mM	96,00	0,982
4	(3) + Ácido bórico 10 mM	138,00	0,915
5	(4) + NMO 10,7 mM	84,00	2 pt
6	(5) + L-Histidina 50 mM	92,00	2 pt
7	(5) + Pirimidina 10 mM	140,00	2 pt

La densidad óptica de DAB oxidada se controló a 455 nm. (NMO = N-óxido de 4-metilmorfolina).

40 Como se ha demostrado previamente en la Tabla 1, el ácido bórico 10 mM aumentaba la velocidad aparente de HRP en un 265 %. La adición de cloruro cálcico a ensayos de HRP demostró aumentar la estabilidad y velocidad

aparente de HRP. La adición de cloruro cálcico 10 mM y también de ácido bórico 10 mM al ensayo que contenía imidazol 10 mM aumentaba sinérgicamente la velocidad aparente de HRP.

El *N*-óxido de morfolina aumentaba la velocidad aparente de las reacciones de HRP (véase la Tabla 1); sin embargo, cuando se añadía a la mezcla de ensayo 4 (véase la Tabla, Entrada 5), se observaba un efecto antagonista. La adición de 50 mM de L-histidina o pirimidina 10 mM a la mezcla de reacción 5 (Tabla 2, Entradas 6 y 7) aumentaba la velocidad aparente de HRP. Estos datos apoyan la detección del uso de *N*-óxidos en una solución de potenciación. El *N*-óxido de pirimidina puede usarse en combinación con L-histidina para aumentar la deposición de DAB en tinción tisular IHC (véase la FIG. 11)

Ejemplo 4

Tinción tisular IHC con potenciadores

La tinción IHC se realizó para bcl2 sobre tejido de amígdala usando soluciones potenciadas de cromógeno DAB para examinar adicionalmente los efectos sinérgicos potenciadores sobre la deposición de DAB. Se muestra un sumario de valoración de patología para tinción IHC en la Tabla 3. El Lector 1 realizó todas las evaluaciones de patología durante el mismo periodo de tiempo. El Lector 2 realizó las evaluaciones en lotes cuando los portaobjetos se producían inicialmente y justifica alguna variabilidad en la valoración.

Tabla 3: Sumario de valoración de la patología para tinción IHC de bcl2 sobre tejido de amígdala usando tinción DAB ultraView™ y soluciones potenciadas de cromógeno DAB

Solución ensayada	Lector 1	BG 1	Lector 2	BG 2
DAB ultraView	3,75	0,25	3	0,25
Base 1	3,75	0,5	4++	0,5
Base 1 con pirimidina 10 mM	4	0,5	4++	0
Base 1 con CaCl ₂ 10 mM	4	0,5	3,5	0,5
Base 1 con fosfito 5 mM	3,75	0,25	4	0,5
Base 2	4	0,5	4	0,75
Base 2 con pirimidina 10 mM	4+	0,5	3,5	0,5
Base 2 con CaCl ₂ 10 mM	4	0,5	3,5	0,5
Base 2 con fosfito 5 mM	4+	0,5	3,75	0,5
Base 3	4+	0,75	3,5	0,5
Base 3 con CaCl ₂ 10 mM	4+	0,5	3,5	0,5
Base 3 con fosfito 5 mM	4+	0,75	3,75	0,5
Base 4	4	0,5	4	0,25
Base 4 con ácido bórico 10 mM	4	0,5	3,5	0
Base 2 con ácido bórico 10 mM	4	0,5	4	0,25
Base 4 con timina 10 mM	4	0,5	4	0,25
Base 4 con 2-OH pirimidina 10 mM	3,75	0,5	4	0,5
Base 4 con L-triptófano 10 mM	4	0,5	4	0,25
Base 4 con <i>N</i> -óxido de pirimidina 10 mM	4+	0,5	4	0,25
Base 4 con CaCl ₂ 10 mM	4	0,75	3,5	0,25
Base 4a	4+	0,75	3,5	0,5
Base 4a con pirimidina 10 mM	4+	0,75	3,5	0,25
Base 4a con 2-OH piridina 10 mM	4+	0,75	4++	0

Todas las composiciones de los nuevos tampones básicos contienen 5 mM de tetraclorhidrato de 3,3-diaminobencidina (DAB-4 HCl) y Brij® 35 (sin peroxidasa) al 0,05 % en peso. [Base 1: L-histidina 50 mM (pH = 6,5); Base 2: imidazol 10 mM (pH = 6,5); Base 3: ácido cítrico 2,43 mM, fosfato sódico 5,13 mM (pH = 5,3); Base 4: L-histidina 10 mM (pH = 6,5); Base 4a: L-histidina 10 mM (pH = 6,5), cloruro cálcico 10 mM, ácido bórico 10 mM.]

Se apreciaron dos observaciones generales. En primer lugar, se conseguía una potenciación de tasa máxima aparente para la deposición por HRP de DAB a través de la combinación de 2-3 componentes potenciadores. Los potenciadores adicionales no aumentaban la intensidad de la señal de la tinción más fuerte de DAB sobre el tejido; sin embargo, el porcentaje de células teñidas con la intensidad de señal más alta aumentaba en todo el tejido. Esta observación se debía en gran medida a la cantidad limitada de recambios observados por reacciones de oxidación HRP-DAB sobre el tejido. En segundo lugar, los potenciadores que aumentaban la oxidación de DAB mediada por HRP en el ensayo de placa proporcionaban una deposición más concreta de DAB sobre el tejido. La tinción de DAB era generalmente menos difusa.

La tinción IHC de bcl2 (amígdala) usando solución de DAB 5,5 mM formulada con imidazol 10 mM o L-histidina 10 mM y Brij® 35 al 0,05 % se muestra en las FIG. 10 y 11. La revisión patológica de la tinción DAB con la L-histidina 10 mM mostró una intensidad similar a la producida con imidazol 10 mM.

5 La tinción tisular con soluciones de DAB 5,5 mM formuladas con N-óxido de pirimidina 10 mM o 2-hidroxipirimidina 10 mM en L-histidina 10 mM y Brij® 35 al 0,05 % se muestra en las FIG. 12 y 13. La revisión patológica de la tinción DAB con ambas soluciones potenciadoras mostró que el N-óxido de pirimidina proporcionaba la mejor relación de señal DAB a ruido de fondo para los dos potenciadores.

10 La tinción IHC de bcl2 sobre tejido de amígdalas se evaluó usando la adición de una "solución de potenciación" a un kit de detección convencional ultraView™. No se hicieron correcciones a la concentración de los reactivos ultraView™ para compensar la dilución de la solución de potenciación (véanse las FIG. 14-17). Se seleccionó L-histidina 50 mM y pirimidina 10 mM (FIG. 16) para el Lector 1 de patología como tinción DAB preferida como se muestra en la Tabla 3. Imidazol 10 mM y ácido bórico 50 mM aumentaban la deposición de DAB, pero reducían el intervalo dinámico en la señal de DAB y aumentaban el fondo de suero. Una concentración inferior de potenciadores aumentaría el intervalo dinámico de la señal DAB. Una solución de L-histidina 10 mM, 2-hidroxipirimidina 10 mM, cloruro cálcico 10 mM, ácido bórico 10 mM mostró una señal DAB inferior cuando se reformulaba una solución de DAB (última fila de la Tabla 3). El N-óxido de pirimidina 10 mM es un candidato principal para una solución de potenciación.

20 Ejemplo 5

Cinética de Michaelis-Menton

25 Para estudiar adicionalmente el efecto sinérgico de la $V_{m\acute{a}x}$ aparente aumentada para DAB oxidada por HRP, se calculó la cinética de Michaelis-Menton para las mejores mezclas potenciadas de cromógeno DAB en la Tabla 3. Una dilución 1:32 del multímero HRP ultraView™ se hizo reaccionar con una concentración variable de peróxido de hidrogeno (0,015 mM - 0,514 mM) para saturar la velocidad aparente de HRP. Inicialmente, se examinó tanto imidazol como L-histidina con pirimidina 10 mM (véase la FIG. 18) y 2-hidroxipirimidina 10 mM (véase la FIG. 19). Se calcularon valores similares de K_m a $\frac{1}{2}V_{m\acute{a}x}$, pero el imidazol produjo una $V_{m\acute{a}x}$ aparente mayor que L-histidina (véase la Tabla 4). La definición de $V_{m\acute{a}x} = k_{cat} \cdot [E]_{total}$ cuando la concentración de sustrato enzimático estaba a niveles de saturación. Cuando la concentración de enzimas se mantenía constante, la $V_{m\acute{a}x}$ aparente es proporcional a k_{cat} (el recambio aparente para HRP o la constante de velocidad de primer orden). El imidazol aumentaba el recambio aparente de HRP mayor que L-histidina.

35 Tabla 4: Influencia de potenciadores sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada por HRP cuando se combinaban con imidazol 50 mM, cloruro cálcico 10 mM y ácido bórico 10 mM.

Potenciador	$V_{m\acute{a}x}$. (mDO/min)	K_m
Sin potenciador	228	0,073
Tampón con pirimidina 10 mM		
Imidazol 10 mM	330	0,085
L-histidina 10 mM		0,088
Tampón con 2-hidroxipirimidina 10 mM		
Imidazol 50 mM	320	0,081
L-histidina 50 mM	317	0,084
Potenciador en imidazol 50 mM, cloruro cálcico 10 mM, ácido bórico 10 mM		
Pirimidina 50 mM	326	0,082
10 mM	320	0,081
2-hidroxipirimidina 10 mM	383	1,001
N-Óxido de pirimidina	374	0,098

La K_m se determinó a $\frac{1}{2}V_{m\acute{a}x}$.

40 Se exploraron soluciones de cromógeno DAB con imidazol con potenciadores para la influencia sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de HRP (véase la FIG. 20 y la Tabla 4). Se usó imidazol 50 mM para una mayor potenciación de la oxidación de DAB. El efecto de potenciación sobre el recambio aparente de HRP era 2-hidroxipirimidina 10 mM > 10 mM N-óxido de pirimidina 10 mM > pirimidina 50 mM > 2-hidroxipirimidina 10 mM. Estos resultados equivalían a las intensidades de tinción observadas analizadas en la Tabla 3.

45 Usando las soluciones de cromógeno de DAB en la Tabla 4, se realizó un ensayo de placa usando concentraciones variables del multímero HRP ultraView™ (0,27 pg - 68,8 pg). La $V_{m\acute{a}x}$ aparente se controló y los datos se presentaron como un porcentaje del aumento o disminución en la $V_{m\acute{a}x}$ aparente en comparación con reacciones no potenciadas (véase la Tabla 5). Se observó un aumento en la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de HRP según se disminuía la concentración de HRP. La magnitud del cambio aumentaba a concentraciones inferiores de HRP. Estos datos confirmaron los resultados de la Tabla 1 donde el imidazol proporcionó una mayor $V_{m\acute{a}x}$ aparente respecto a L-histidina. Este efecto se observó para una mayoría de concentraciones.

50

Tabla 5: Influencia de sales tamponantes y potenciadores sobre la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para DAB oxidada por HRP cuando se a\~nadan al kit de detecci3n ultraView™

Sale b\~asica	Potenciador	Concentraci3n de HRP (pg)								
		68,8	34,4	17,2	8,59	4,3	2,15	1,07	0,54	0,27
Histidina 10 mM	A	-12	-9	-7	3	-3	-7	-6	27	9
Imidazol 10 mM	A	-22	-15	2	19	22	11	12	43	145
Histidina 50 mM	B	-3	-10	0	13	10	0	4	35	9
Imidazol 50 mM	B	-3	14	16	30	28	18	34	71	32
Imidazol 50 mM	C	-3	3	12	19	18	17	20	89	97
Imidazol 50 mM	D	-2	11	10	20	31	30	62	58	45

5 La densidad 3ptica de DAB oxidada se control3 a 450 nm. [Potenciadores: (A) = pirimidina 10 mM; (B) = 2-hidroxipirimidina 10 mM, cloruro c\~alstico 10 mM, \~acido b3rico 10 mM; (C) = 2-hidroxipirimidina 10 mM, cloruro c\~alstico 10 mM, \~acido b3rico 10 mM; (D) = N-\3xido de pirimidina 10 mM, cloruro c\~alstico 10 mM, \~acido b3rico 10 mM].

Ejemplo 6

10 Tinci3n tisular ISH con potenciadores

Se examin3 la tinci3n tisular ISH usando soluciones potenciadas de DAB. Se trataron xenoinjertos de rat3n 3-en-1 HER-2 de l\~neas celulares de carcinoma HER-2 positivas CaLu3, ZR-75-1 y MCF7 con son sonda de ADN de HER2 (VMSI 480-4495) y se ti\~naron con la soluci3n de crom3geno DAB ultraView™ o una soluci3n potenciada de crom3geno DAB que conten\~a L-histidina 10 mM (v3anse las FIG. 21-22). La L-histidina 10 mM aumentaba la deposici3n de DAB en la tinci3n ISH de c3lulas de carcinoma CaLu3 que ten\~an una sobreexpresi3n de HER2. La deposici3n aumentada de DAB era marginal para las se\~nales ISH m\~as fuertes, pero la intensidad de la se\~nal para las se\~nales DAB m\~as d3biles se elevaba en todo el tejido. Se hizo la misma observaci3n con deposici3n potenciada de DAB en IHC.

20

Ejemplo 7

Tinci3n tisular TSA con potenciadores

25 Se evalu3 la deposici3n potenciada de DAB sobre tinci3n tisular TSA-IHC de bcl2 en tejido de am\~gdala. El ant\~geno bcl2 se ti\~n3 con TSA usando deposici3n TA-HQ durante 4 minutos despu3s de una incubaci3n de 16 minutos del anticuerpo primario contra bcl2. Se realiz3 deposici3n de tiramida con y sin 2-hidroxipirimidina 10 mM. La deposici3n de DAB se realiz3 con la soluci3n de crom3geno DAB ultraView™ o con una soluci3n de crom3geno DAB que conten\~a L-histidina 10 mM (v3anse las FIG. 23-26).

30

La L-histidina 10 mM aumentaba la deposici3n de DAB sobre el tejido.

En un estudio paralelo, se ti\~n3 el ant\~geno bcl2 con TSA usando deposici3n TA-HQ durante 4 minutos despu3s de una incubaci3n de 8 minutos del Ab primario contra bcl2 (v3anse las FIG. 27 y 28). La 2-hidroxipirimidina 10 mM aumentaba la deposici3n de tiramida y por tanto aumentaba la deposici3n de DAB. El porcentaje de c3lulas te\~nidas con DAB aumentaba en \~areas con baja expresi3n de ant\~geno bcl2.

35

Ejemplo 8

40 Tinci3n de ribosonda 18s

Se montaron tejidos de xenoinjerto CaLu-3 incrustados en parafina fijados en formalina sobre portaobjetos Superfrost®, se desparafinizaron y se recuper3 el ant\~geno usando desnaturizante RiboClear™ (un componente del kit RiboMap®; Ventana® p/n 760-102) durante 12 minutos de incubaci3n, reactivo CC2 (Ventana® p/n 950-123), y proteasa 3 durante 8 minutos de incubaci3n (Ventana® p/n 760-2020). Despu3s de la recuperaci3n, se distribuyeron dos gotas (200 ml) de una sonda 18s de hebra antisentido o con sentido haptenilada NP sobre un portaobjetos, se desnaturizaron a 80 °C durante 8 minutos, y se hibridaron a 65 °C durante 6 horas. Despu3s de la hibridaci3n, los portaobjetos se lavaron 3 veces usando SSC 0,1x a 75 °C durante 8 minutos; cada sonda haptenilada NP se detect3 usando 5 mg de un conjugado de rat3n con HRP anti-NP seguido por 100 µl de cada uno 55 µl de conjugado de tiramida-HQ y H₂O₂ (componente del kit de DAB ultraView™ Ventana® p/n 760-500) y se incubaron durante 12 minutos. Se detect3 tiramida-HQ depositada usando 0,5 µg de un conjugado de rat3n con HRP

50

anti-HQ seguido por una gota de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 0,05 %; L- histidina 10 mM; 2-hidroxipiridina 10 mM) y H₂O₂ incubando el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de aclarar los portaobjetos en tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se cubrieron los portaobjetos y se visualizaron usando un microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestra en las FIG. 29 y 30, respectivamente.

Ejemplo 9

Tinción HPV

Se montaron tejidos de xenoinjerto C33, HeLa y CaSki incrustados en parafina fijados con formalina en portaobjetos Superfrost, se desparafinizaron y se recuperó el antígeno usando reactivo CC2 (Ventana® p/n 950-123), y proteasa 3 durante 8 minutos de incubación (Ventana® p/n 760-2020). Después de la recuperación, se distribuyeron 3 gotas (300 µl) de tampón SISH Hyb (un componente del kit de detección SISH ultraView™ p/n 780-001) y 3 gotas de sonda HPV haptenilada DIG sobre un portaobjetos, se desnaturalizaron a 75 °C durante 8 minutos y se hibridaron a 44 °C durante 6 horas. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron 3 veces usando SSC 0,1x a 64 °C durante 8 minutos. La sonda haptenilada DIG se detectó usando 3 µg de un conjugado de ratón con HRP^{anti-DIG} seguido por DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; L-histidina 10 mM; 2-hidroxipiridina 10 mM) y H₂O₂ (componente del kit de DAB ultraView™ Ventana p/n 760-500) incubando el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de aclarar los portaobjetos en tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se cubrieron los portaobjetos y se visualizaron usando microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestra en las FIG. 31 frente a 32, 33 frente a 34 y 35 frente a 36, respectivamente.

Ejemplo 10

Tinción DAB de CD20

Se montó tejido de amígdala incrustado en parafina fijado en formalina sobre portaobjetos Superfrost®, se desparafinizaron y se recuperó el antígeno usando reactivo a granel CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor UV (un componente del kit de DAB ultraView™) sobre un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó una gota del anticuerpo de ratón anti-CD20 (clon L-26; Ventana® p/n 760-2531) sobre el portaobjetos y se incubó durante 16 minutos. Después de 2 aclarados con tampón de reacción, se detectó el anticuerpo contra CD20 usando una gota del conjugado HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó sobre el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadió una gota de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; L-histidina 10 mM; 2-hidroxipiridina 10 mM) y H₂O₂ a los portaobjetos y se incubaron durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de aclarar los portaobjetos en tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se cubrieron los portaobjetos y se visualizaron usando microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestra en las FIG. 37 y 38, respectivamente.

Ejemplo 11

Tinción AEC de CD20 y Ki-67

Se montó tejido de amígdala incrustado en parafina fijado con formalina sobre portaobjetos Superfrost, se desparafinizaron y se recuperó el antígeno usando reactivo a granel CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor (un componente del kit de AEC Ventana® p/n 760-020) sobre un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó una gota del anticuerpo de ratón anti-CD20 (clon L-26; Ventana® p/n 760-2531) o anticuerpo de conejo anti-Ki67 (clon 30-9; Ventana® p/n 790-4286) sobre el portaobjetos y se incubó durante 16 minutos. Después de 2 aclarados con tampón de reacción, se detectó el anticuerpo usando una gota del conjugado HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubaron sobre el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadió una gota de una solución de potenciación que contenía L-histidina 50 mM pH 6,5 y 2-hidroxipiridina 10 mM y se co-incubó con una gota de AEC y H₂O₂ y se incubaron durante 8 minutos. Se usó un portaobjetos teñido con cromógeno AEC sin ninguna potenciación como referencia. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se dejaron secar al aire; se cubrieron los portaobjetos con un medio de montaje acuoso y se visualizaron usando un microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestra en las FIG. 39 frente a 40 y

42 frente a 42, respectivamente.

Ejemplo 12

5 Tinción DAB de bcl-2

Se montó tejido de amígdala incrustado en parafina fijado con formalina sobre portaobjetos Superfrost, se desparafinizaron y se recuperó el antígeno usando reactivo a granel CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor UV (un componente del kit de DAB ultraView™) sobre un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó una gota del anticuerpo de ratón anti-bcl2 (clon 124; Ventana® p/n 790-4464) sobre el portaobjetos y se incubó durante 16 minutos. Después de 2 aclarados con tampón de reacción, se detectó el anticuerpo contra bcl2 usando una gota del conjugado HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó sobre el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadió una gota de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; más cualquier combinación de potenciadores investigada en la Tabla 3) y H₂O₂ a los portaobjetos y se incubaron durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de aclarar los portaobjetos en tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se cubrieron los portaobjetos y se visualizaron usando microscopio de campo claro.

Ejemplo 13

25 Tinción TSA-HQ DAB de bcl-2

Se montó tejido de amígdala incrustado en parafina fijado con formalina sobre portaobjetos Superfrost, se desparafinizaron y se recuperó el antígeno usando reactivo a granel CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor UV (un componente del kit de DAB ultraView™) sobre un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó una gota del anticuerpo de ratón anti-bcl2 (clon 124; Ventana® p/n 790-4464) sobre el portaobjetos y se incubó durante 16 minutos. Después de 2 aclarados con tampón de reacción, se detectó el anticuerpo contra bcl2 usando una gota del conjugado HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó sobre el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadieron 100 µl de tiramida-HQ 50 uM con y sin 2-hidroxipiridina 10 mM y H₂O₂ (componente del kit de DAB ultraView™ Ventana® p/n 760-500) y se incubaron durante 12 minutos. Se detectó tiramida-HQ depositada usando 0,5 µg del conjugado de ratón con HRP anti-HQ seguido por una gota de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; L-histidina 10 mM) y H₂O₂ incubando el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de aclarar los portaobjetos en tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se cubrieron los portaobjetos y se visualizaron usando microscopio de campo claro (FIG. 23-26).

Ejemplo 14

45 Tinción TSA-NP DAB de bcl2

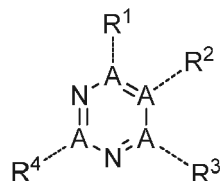
Se montó tejido de amígdala incrustado en parafina fijado con formalina sobre portaobjetos Superfrost, se desparafinizaron y se recuperó el antígeno usando reactivo a granel CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor UV (un componente del kit de DAB ultraView™) sobre un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó una gota del anticuerpo de ratón anti-bcl2 (clon 124; Ventana® p/n 790-4464) dilución 1:300, sobre el portaobjetos y se incubó durante 16 minutos. Después de 2 aclarados con tampón de reacción, se detectó el anticuerpo contra bcl2 usando una gota del conjugado HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó sobre el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadieron 100 µl de tiramida-NP 5 uM con y sin 2-hidroxipiridina 10 mM y H₂O₂ (componente del kit de DAB ultraView™ Ventana® p/n 760-500) y se incubaron durante 12 minutos. Se detectó tiramida-HQ depositada usando 0,5 µg del conjugado de ratón con HRP anti-NP seguido por una gota de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; L-histidina 10 mM; 2-hidroxipiridina 10 mM) y H₂O₂ incubando el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de aclarar los portaobjetos en tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste usando Hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo Bluing (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se cubrieron los portaobjetos y se visualizaron usando microscopio de campo claro (FIG. 43-46).

En vista de las muchas posibles realizaciones a las que pueden aplicarse los principios de la invención descrita, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son solamente ejemplos preferidos de la invención y no deben tomarse como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una diana en una muestra por deposición proximal de un marcador, que comprende:

- 5 poner en contacto la muestra con una solución de reconocimiento, incluyendo la solución de reconocimiento un resto de unión específica que es específico para la diana;
 marcar el resto de unión específica con una enzima;
 poner en contacto la muestra con una solución de detección, comprendiendo la solución de detección un sustrato enzimático de modo que el marcador se deposite de forma proximal a la diana en presencia de un potenciador
 10 de deposición que tiene una fórmula



- 15 en la que R1, R2, R3 y R4 se seleccionan independientemente de grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo e hidrógeno; R1 y/o R3 pueden estar unidos a R2 para formar un sistema de anillo aromático condensado; A se selecciona de un átomo de carbono, un heteroátomo diferente de azufre y cualquier combinación de los mismos; y detectar el marcador.

20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el contacto de la muestra con una solución de detección incluye oxidar enzimáticamente el sustrato enzimático usando un agente oxidante para formar el marcador, en el que la oxidación enzimática del sustrato enzimático usando un agente oxidante incluye reducir la solubilidad o estabilidad del sustrato enzimático de modo que el sustrato enzimático quede depositado como el marcador.

25 3. El método de la reivindicación 2, en el que el sustrato enzimático se selecciona del grupo que consiste en un cromógeno y un conjugado de tiramida.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R1, R2, R3 y R4 se seleccionan de hidrógeno e hidroxilo y cada A es un átomo de carbono, opcionalmente en el que R1, R3 y R4 son hidrógeno y R2 es hidroxilo.

30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno, alquino, hidrógeno, yodo, bromo, cloro, flúor y combinaciones de los mismos.

35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la enzima es una oxidorreductasa o una peroxidasa.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el resto de unión específica comprende un anticuerpo o un ácido nucleico.

40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el sustrato enzimático se selecciona de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un colorante BODIPY, una resorufina, una rodamina, o un derivado de los mismos, o en el que el sustrato enzimático es un derivado de tiramina.

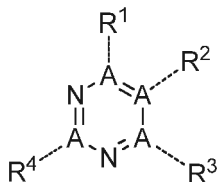
45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la solución de detección comprende adicionalmente un acelerador seleccionado de un compuesto heteroarilo, un ácido borónico, un compuesto fenólico o una combinación de los mismos, opcionalmente en el que el compuesto heteroarilo se selecciona de imidazol, L-histidina, N-óxido de piridina, N-óxido de pirimidina, óxido de N-metil morfolina y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo.

50 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la solución de detección comprende adicionalmente un tensioactivo no iónico seleccionado de un lauril éter de polioxietileno que tiene una fórmula (C₂H₄O)₂₃C₁₂H₂₅OH; monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, el monoalquilato que comprende entre 8 y 14 carbonos; un polioxietileno de alcohol secundario lineal que tiene una fórmula C₁₂₋₁₄H₂₅₋₂₉O(CH₂CH₂O)_x, en la que x es igual a un número entero entre 2 y 12; y octil fenil éter de polioxietileno, o en el que la solución de detección
 55 comprende adicionalmente un antioxidante seleccionado de bisulfato de sodio, estannato de sodio, metabisulfato de sodio y combinaciones de los mismos, o en el que la solución de detección comprende adicionalmente una sal que contiene metal del Grupo I o del Grupo II que tiene una fórmula MX₂ o MX donde M es un metal del Grupo I o del Grupo II seleccionado de litio, sodio, potasio, cesio, calcio, magnesio, estroncio y bario; y X se selecciona de fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, hidróxido y fosfato.

11. Uso de un kit en un método para detectar una diana, comprendiendo el kit

una enzima;

5 una solución de detección que comprende un potenciador de deposición y un sustrato enzimático que produce un resto detectable después de reacción con la enzima, teniendo el potenciador de deposición una fórmula,



10 en el que R1, R2, R3 y R4 se seleccionan independientemente de grupo alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene heteroátomo e hidrógeno; R1 y/o R3 pueden estar unidos a R2 para formar un sistema de anillo aromático condensado; A se selecciona de un átomo de carbono, un heteroátomo diferente de azufre y cualquier combinación de los mismos.

12. El uso de la reivindicación 11, en el que el kit comprende adicionalmente un resto de unión específica, 15 opcionalmente en el que el resto de unión específica es un anticuerpo o un ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana.

13. El uso de la reivindicación 12, en el que el resto de unión específica y la enzima están unidos juntos.

20 14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la enzima es una oxidorreductasa o una peroxidasa, opcionalmente en el que la peroxidasa es peroxidasa de rábano rústico o glutatión peroxidasa.

25 15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el sustrato enzimático se selecciona de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un colorante BODIPY, una resorufina, una rodamina, o un derivado de los mismos, o en el que el sustrato enzimático es un derivado de tiramina.

30 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que el potenciador de la deposición tiene una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM y el sustrato enzimático tiene una concentración que varía de más de 0 mM a aproximadamente 8 mM.

FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3

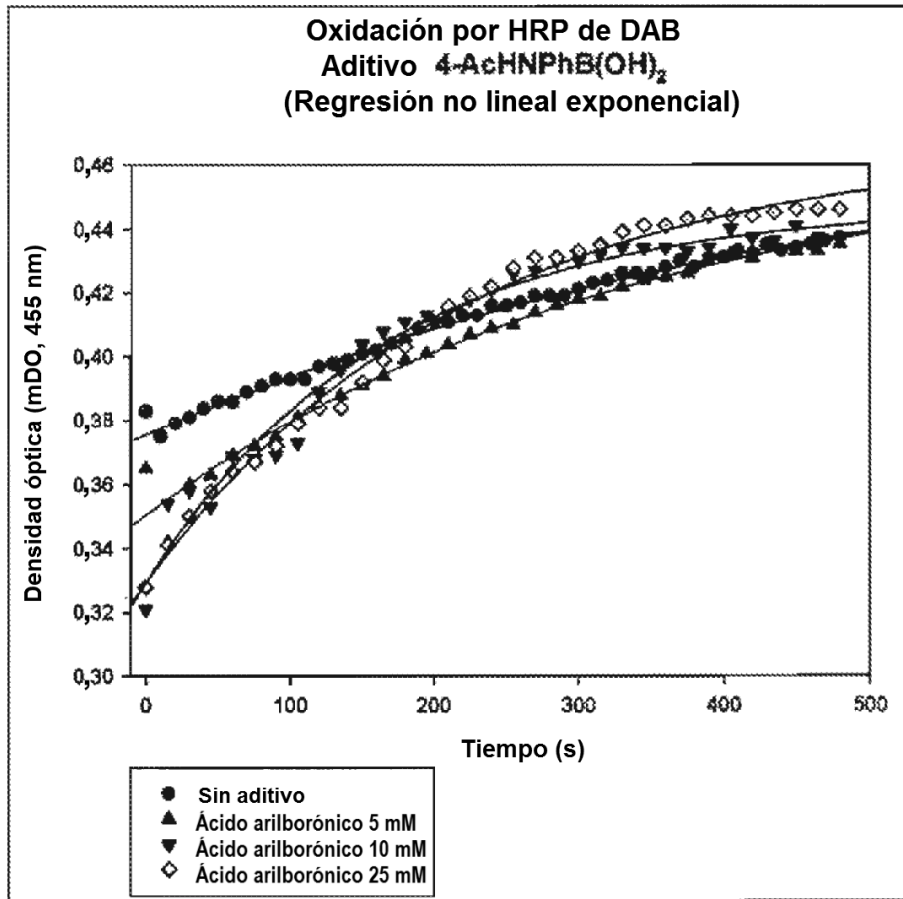
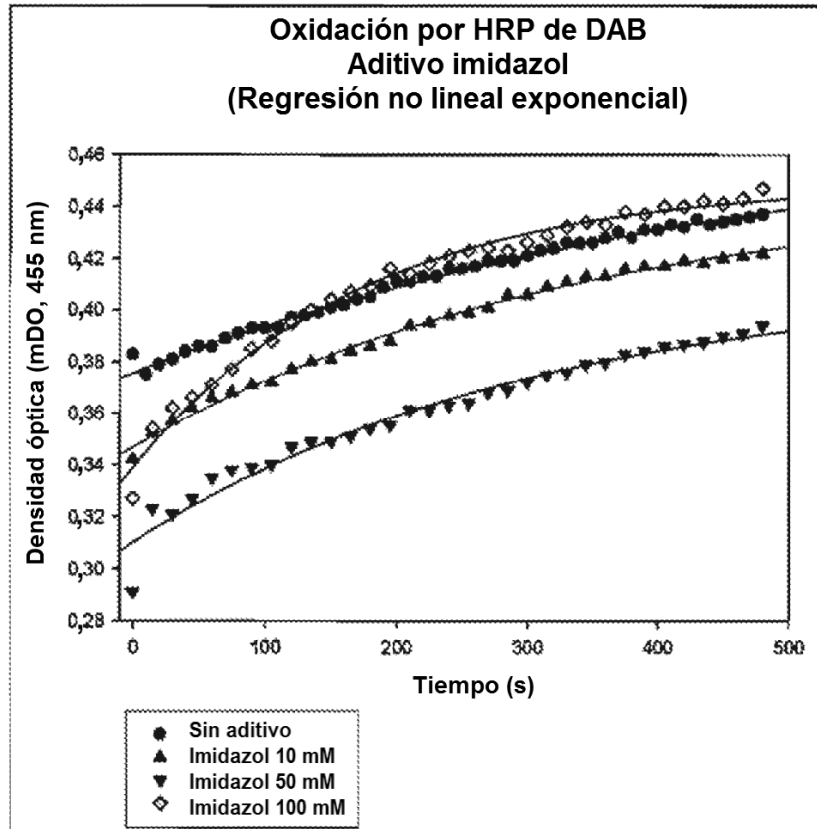


FIG. 4



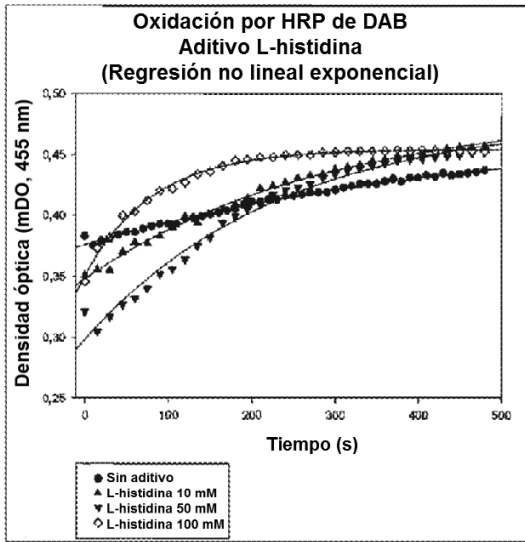


FIG. 5

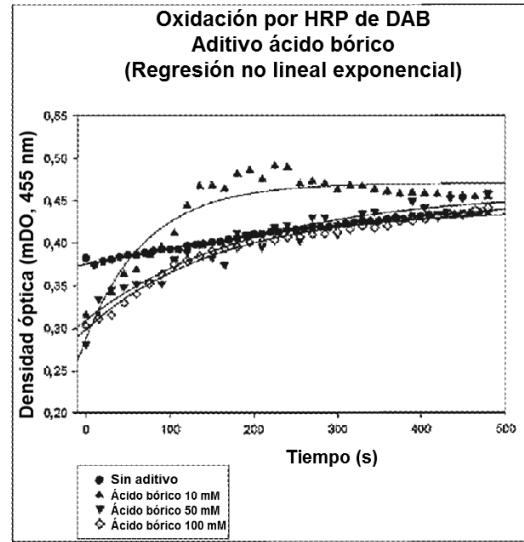


FIG. 6

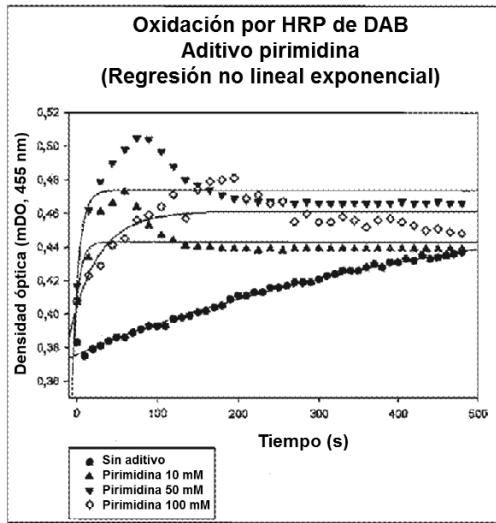


FIG. 7

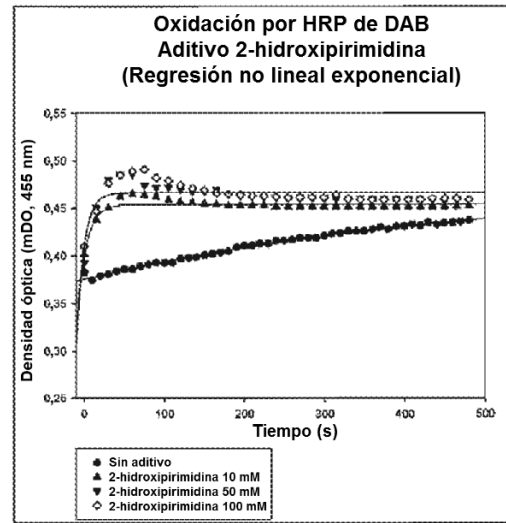


FIG. 8

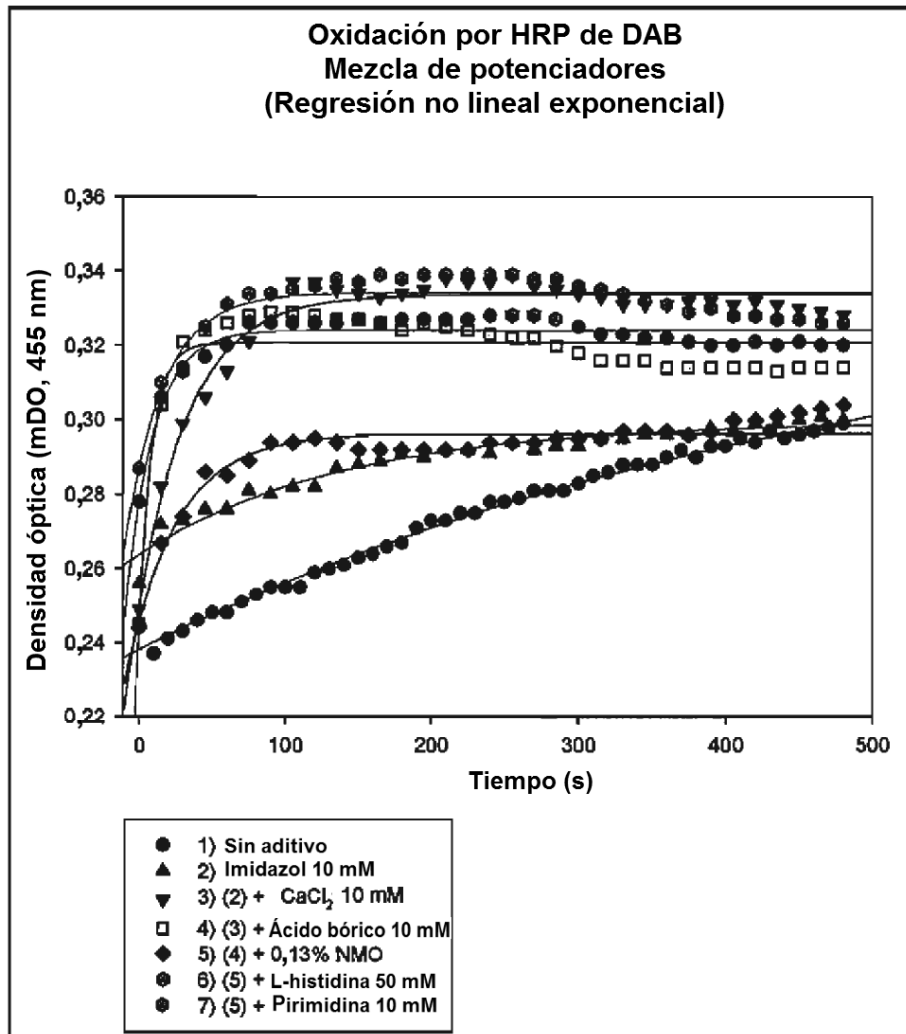


FIG. 9

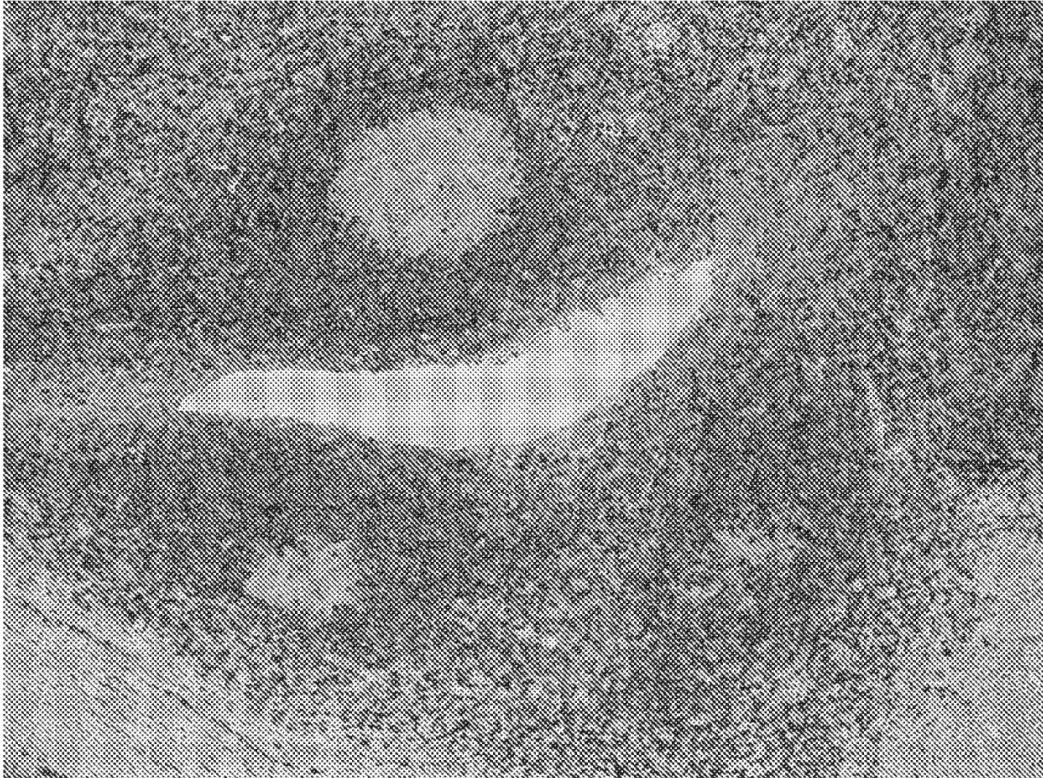


FIG. 10

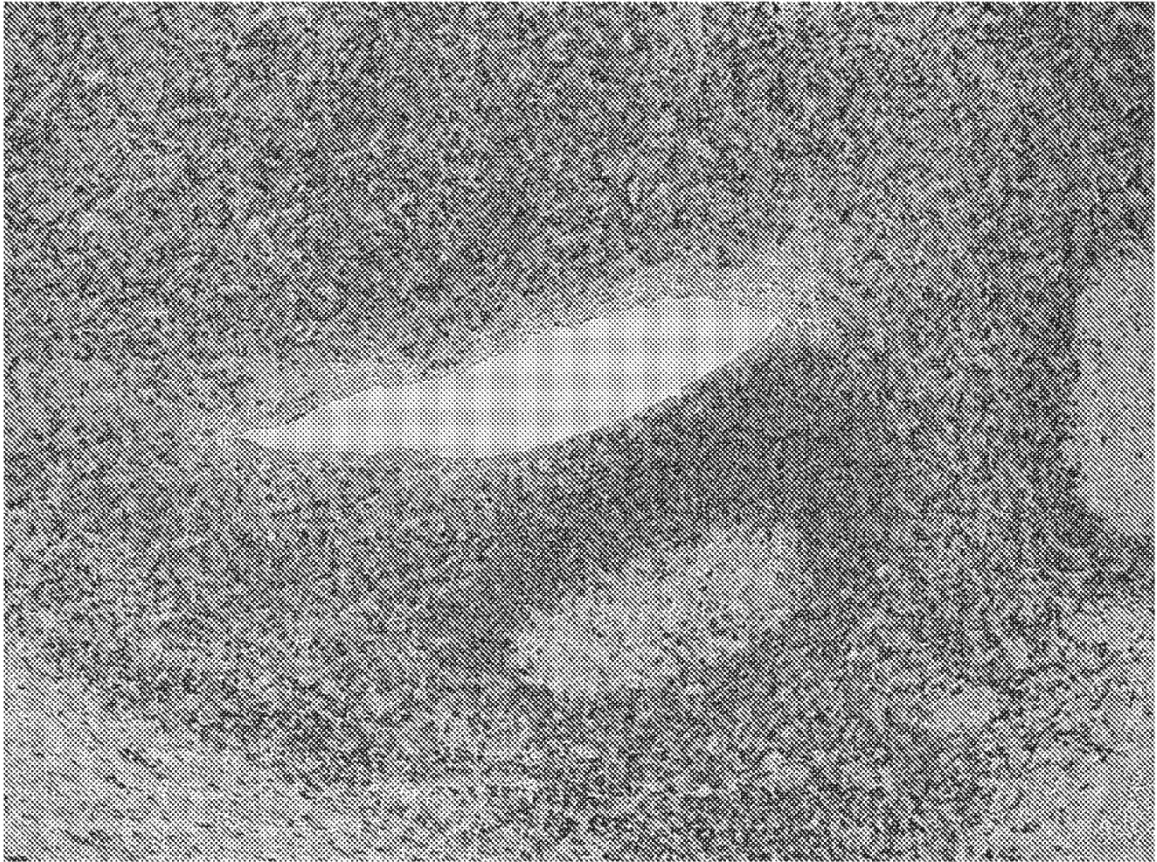


FIG. 11

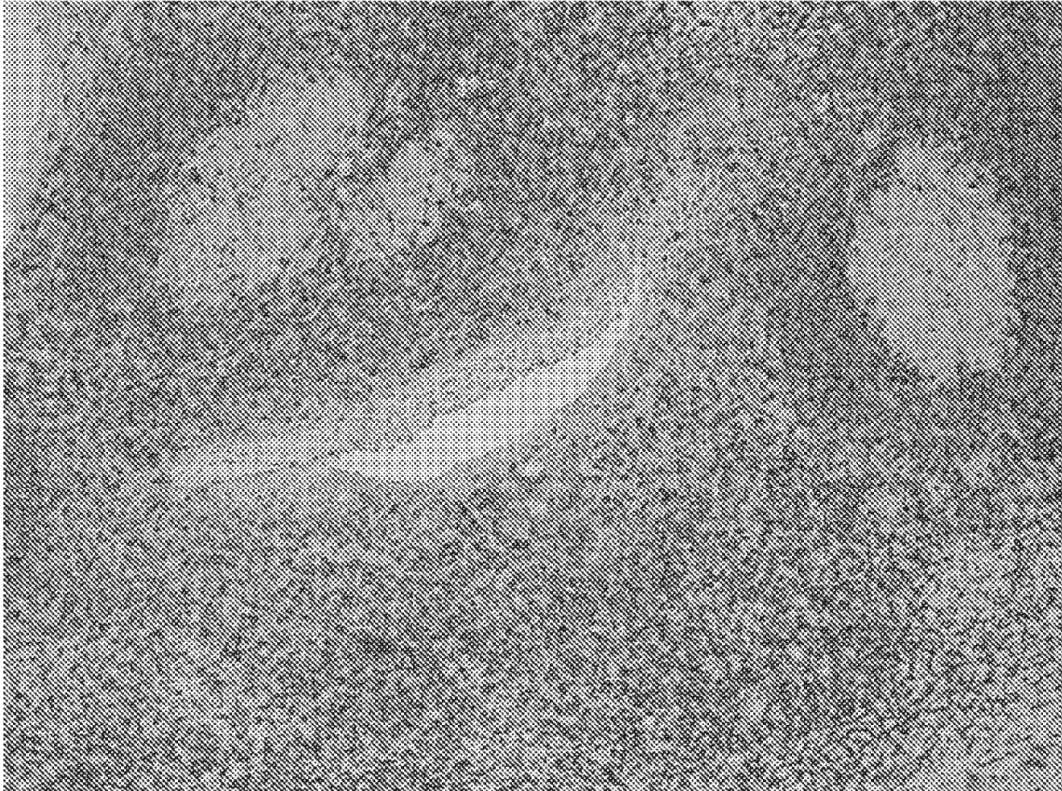


FIG. 12



FIG. 13

FIG. 14

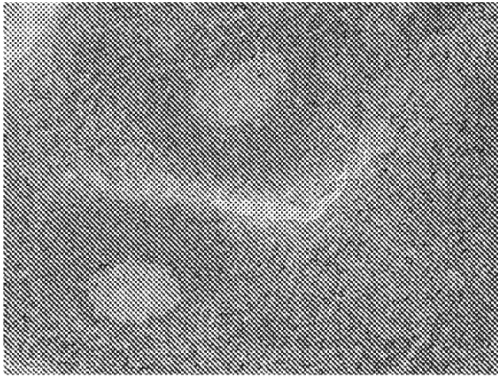


FIG. 15

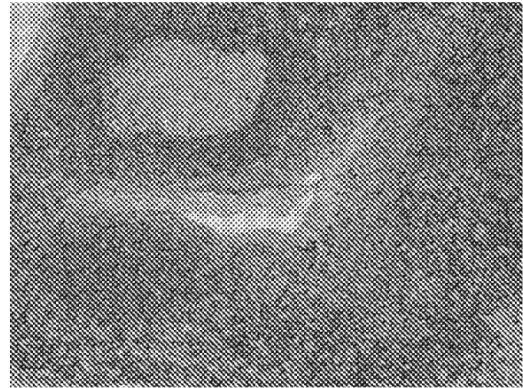


FIG. 16



FIG. 17

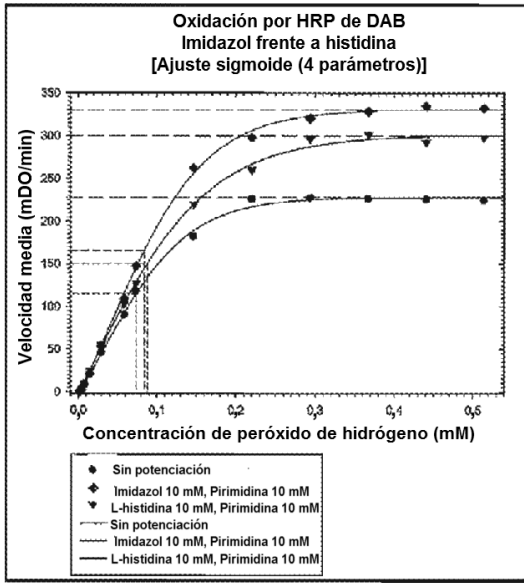


FIG. 18

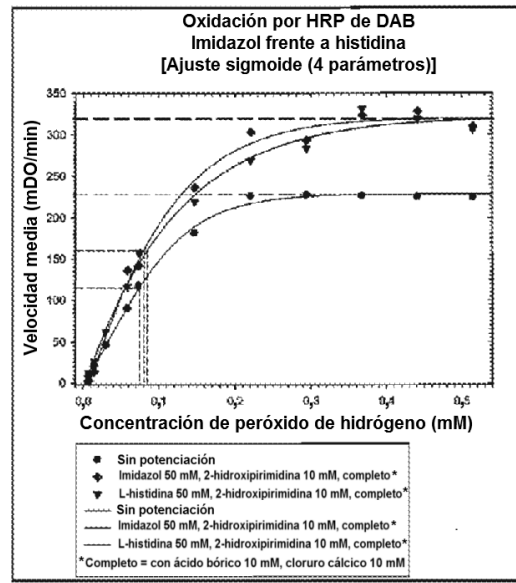


FIG. 19

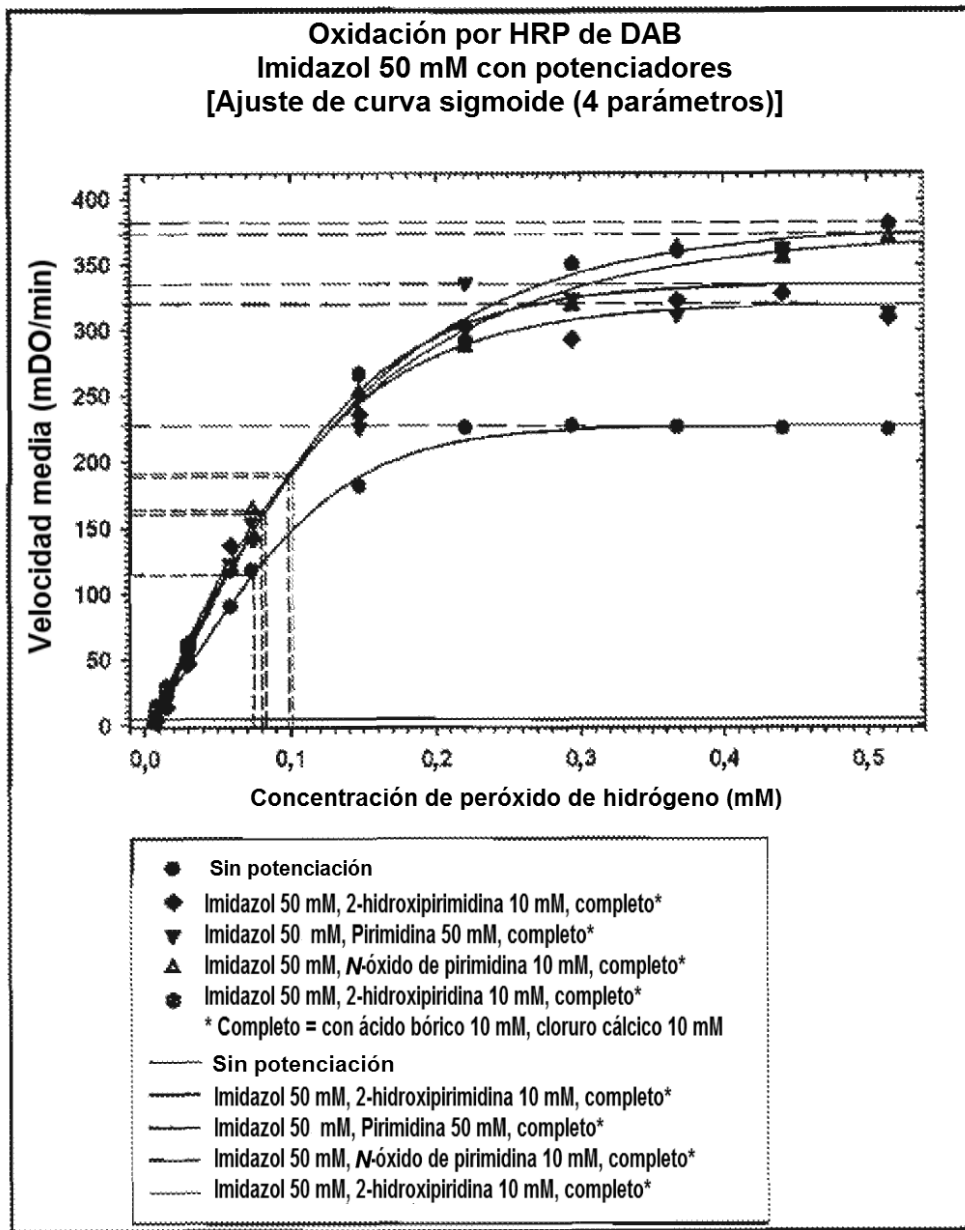


FIG. 20

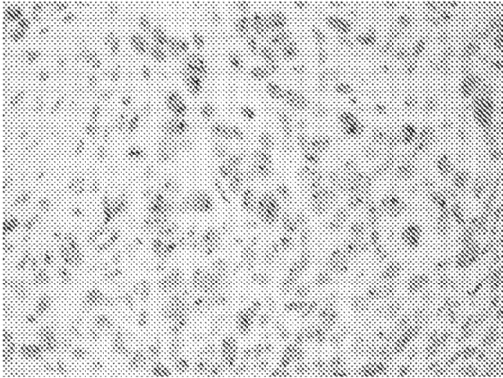


FIG. 21

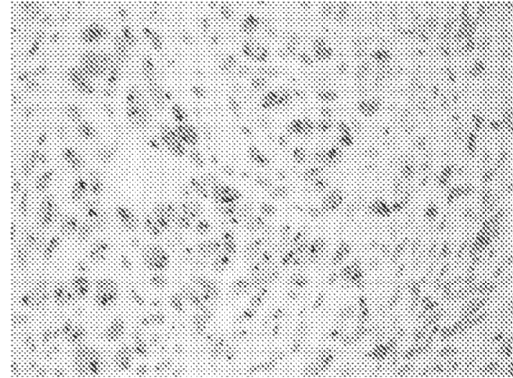


FIG. 22

FIG. 23

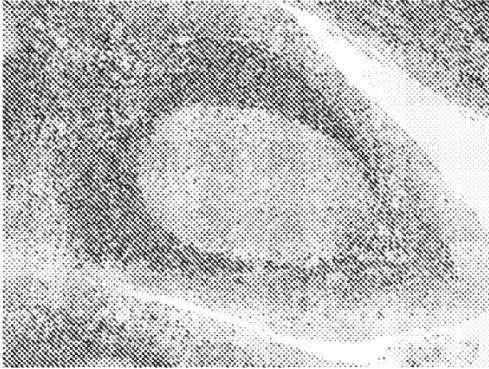


FIG. 24

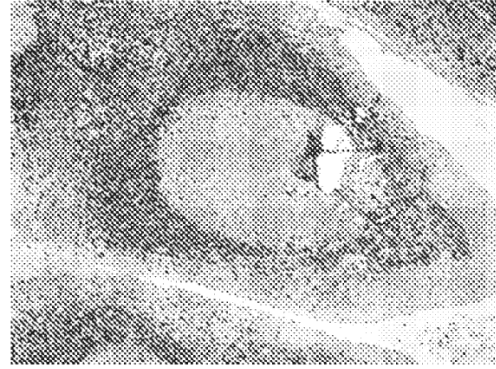


FIG. 25

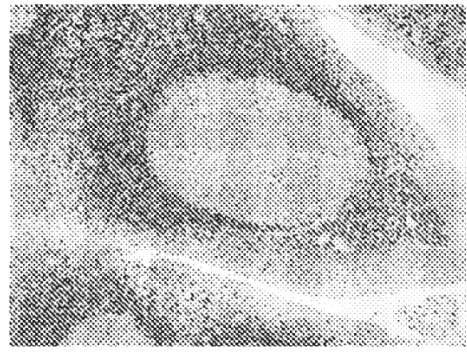


FIG. 26

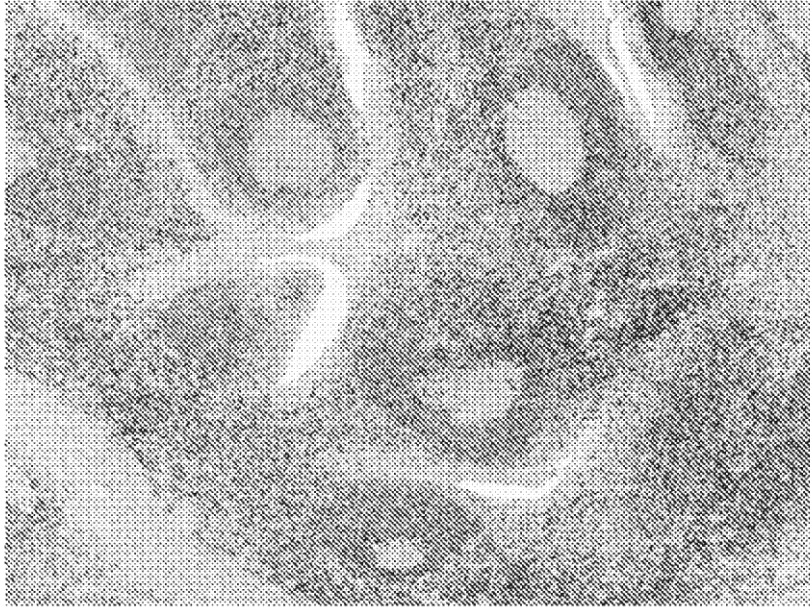


FIG. 27

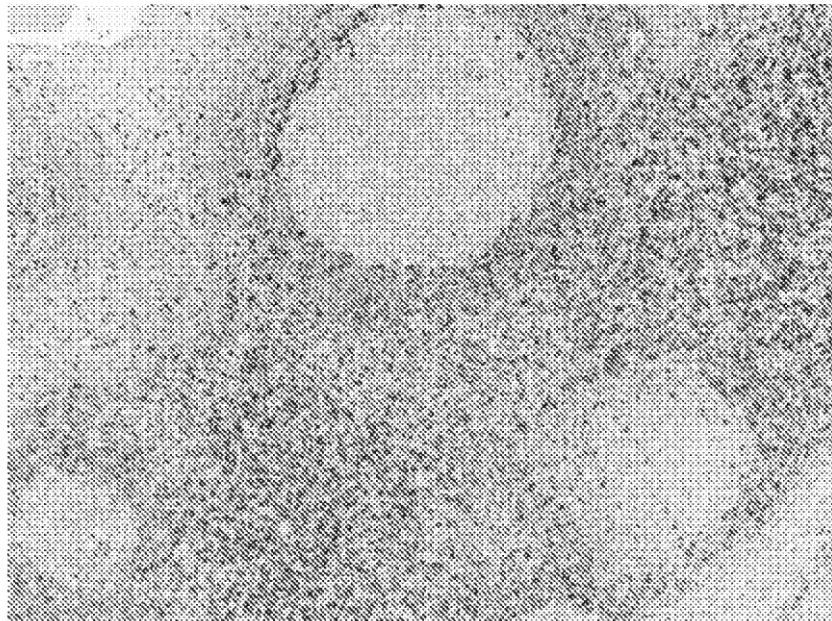


FIG. 28

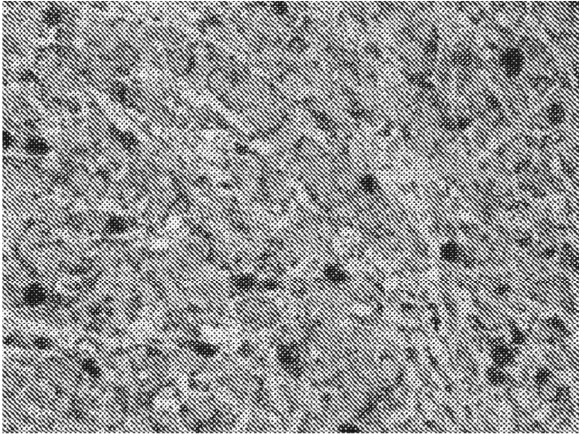


FIG. 29

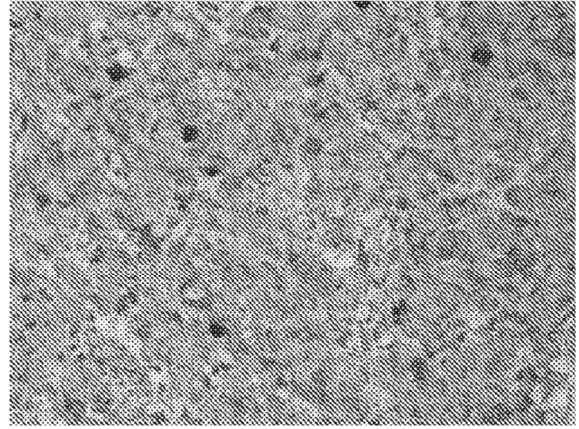


FIG. 30

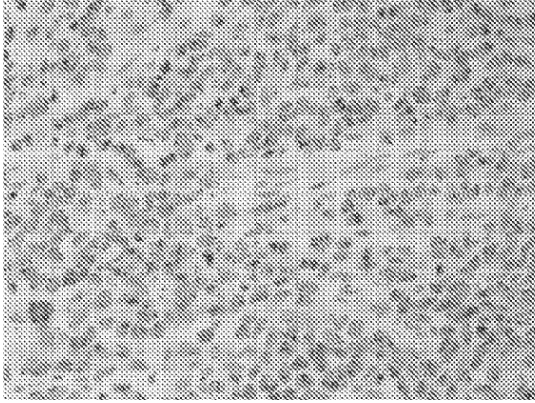


FIG. 31

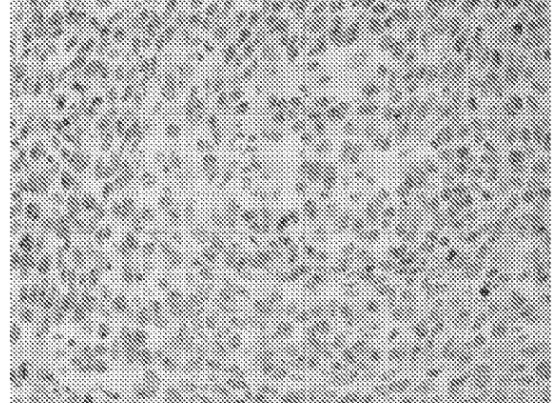


FIG. 32

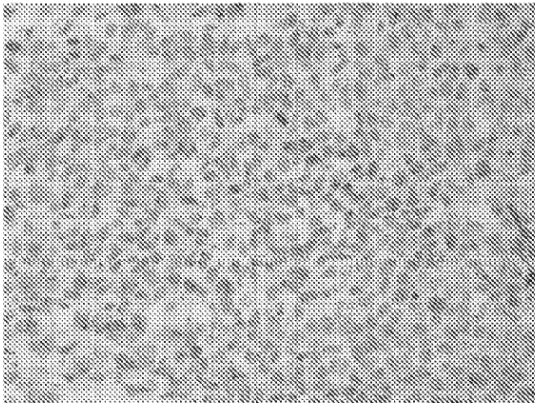


FIG. 33

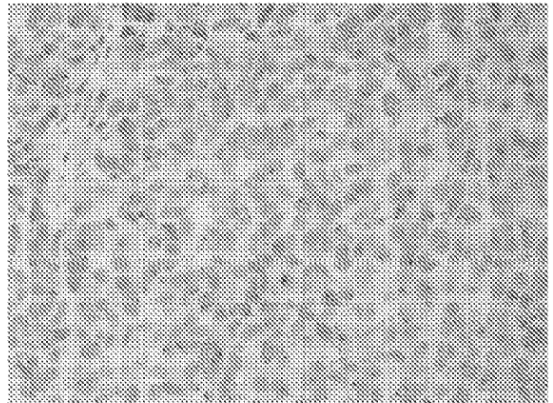


FIG. 34

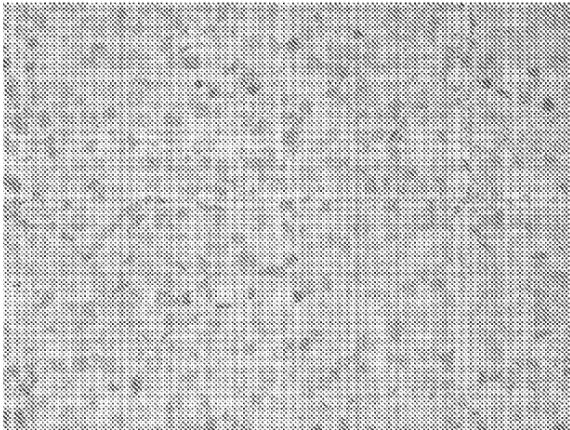


FIG. 35

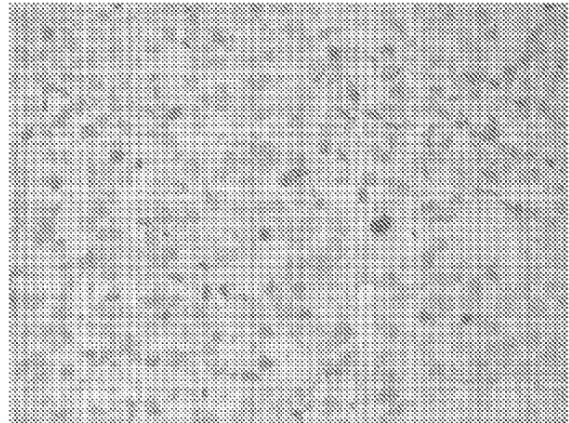


FIG. 36



FIG. 37



FIG. 38

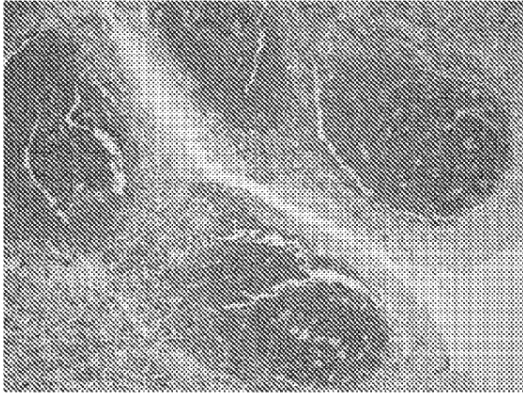


FIG. 39

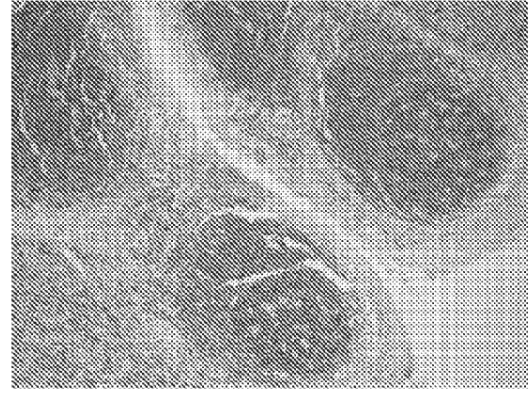


FIG. 40

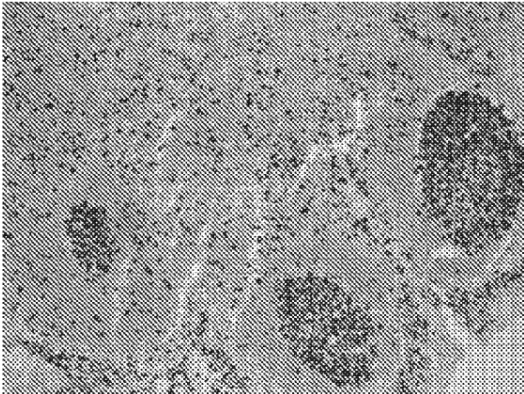


FIG. 41

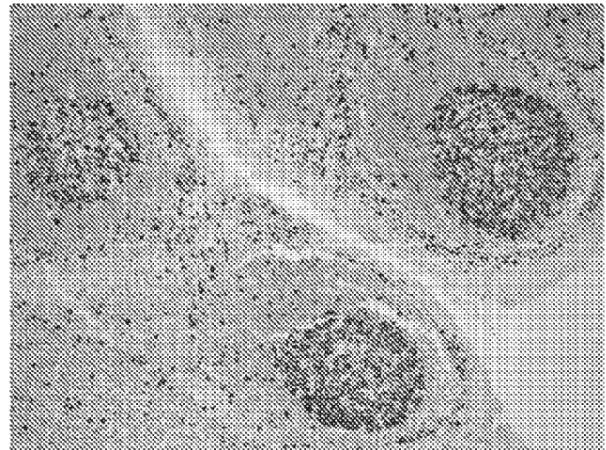


FIG. 42

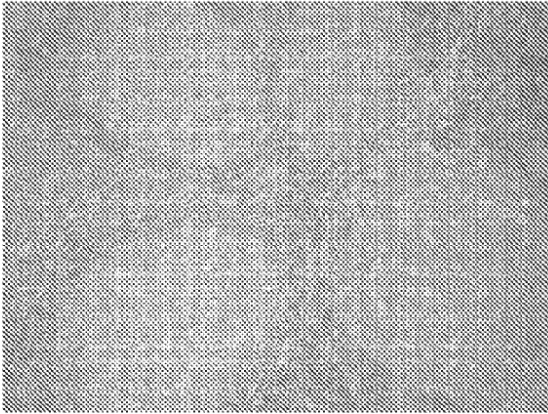


FIG. 43

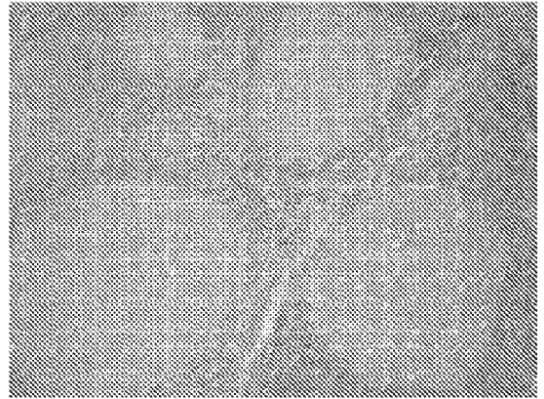


FIG. 44

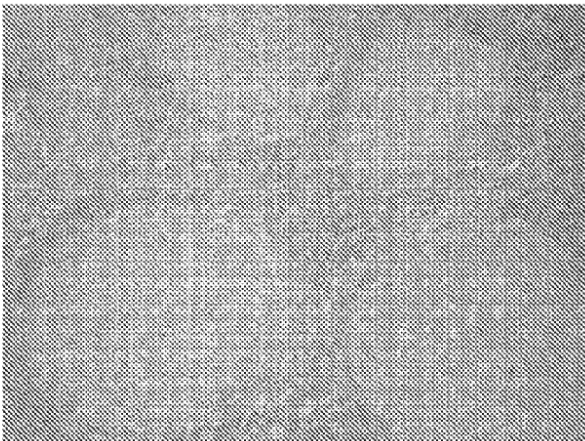


FIG. 45

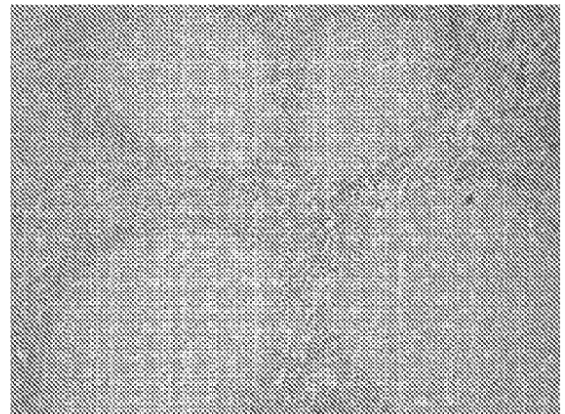


FIG. 46