

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 593**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 16161377 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3088534**

54 Título: **Depósito potenciado de cromógenos que utilizan análogos de piridina**

30 Prioridad:

**30.12.2010 US 201061460349 P**

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

**14.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 689 593 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

Depósito potenciado de cromógenos que utilizan análogos de piridina

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a composiciones novedosas que contienen análogos de piridina para su uso en el aumento del depósito de restos detectables en moléculas diana en un tejido.

10 **Antecedentes**

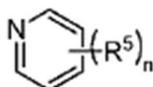
Los procedimientos de tinción celular, que incluyen la inmunohistoquímica (IHQ) y el análisis de hibridación *in situ* (ISH), son herramientas útiles en el diagnóstico histológico y en el estudio de la morfología tisular. La IHQ emplea agentes o restos de unión específica, tales como anticuerpos, para detectar un antígeno de interés que puede estar presente en una muestra de tejido. La IHQ se usa ampliamente en aplicaciones clínicas y de diagnóstico, tales como para el diagnóstico de enfermedades o trastornos particulares. Por ejemplo, tipos de cáncer particulares se pueden diagnosticar basándose en la presencia de una molécula marcadora particular en una muestra obtenida de un sujeto. La IHQ también se usa ampliamente en investigación básica para entender la distribución y localización de biomarcadores en diferentes tejidos. Las muestras biológicas también se pueden analizar usando técnicas de hibridación *in situ*, por ejemplo, hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación *in situ* cromógena (CISH) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), en conjunto denominadas ISH. La ISH se diferencia de la IHQ en que la ISH detecta ácidos nucleicos en tejido, mientras que la IHQ detecta proteínas.

Para ensayos *in situ*, tales como ensayos de IHQ y ensayos de ISH, de muestras tisulares y citológicas, especialmente ensayos combinados de dichas muestras, es muy deseable identificar y desarrollar procedimientos que proporcionen resultados deseables sin interferencia de fondo. Uno de dichos procedimientos implica el uso de la amplificación de la señal de tiramida (TSA), que se basa en el depósito de indicador catalizado (CARD) patentado. La patente de EE. UU. n.º 6.593.100, titulada "Enhanced catalyzed reporter deposition" divulga la potenciación de la catálisis de una enzima en un procedimiento CARD o TSA haciendo reaccionar un conjugado de fenol marcado con una enzima, en el que la reacción se lleva a cabo en presencia de un reactivo potenciador. El documento WO 00/55358 A1 describe un procedimiento para detectar una diana en una muestra que comprende usar el procedimiento CARD-FISH que implica peroxidasa de rábano picante y derivado de hidroxiestiril piridina para depositar el marcador en la proximidad de la acción de la enzima. El documento WO 03/002733 A2 describe un procedimiento para detectar la presencia de una diana en una muestra usando la técnica CARD-FISH y usando un derivado de fenil boro para potenciar el depósito del marcador de la reacción enzimática.

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

**Sumario**

La presente divulgación se refiere a un procedimiento 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 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 manera que el marcador se deposite de forma proximal a la diana en presencia de un potenciador del depósito que tiene una fórmula



en la que R<sup>5</sup> es un resto que contiene un heteroátomo; y detectar el marcador. Con referencia a este procedimiento, poner en contacto la muestra con una solución de detección puede incluir oxidar enzimáticamente el sustrato enzimático usando un agente oxidante para formar el marcador. En modos de realización divulgados particulares, oxidar enzimáticamente el sustrato enzimático usando un agente oxidante comprende reducir la solubilidad o estabilidad del sustrato enzimático de manera que el sustrato enzimático se deposite como el marcador.

En modos de realización divulgados particulares, el sustrato enzimático se selecciona del grupo que consiste en un cromógeno y un conjugado de tiramida.

Los modos de realización divulgados particulares se refieren al uso de una enzima, que puede ser una oxidoreductasa o una peroxidasa. Adicionalmente, la enzima se puede seleccionar de peroxidasa de rábano picante, glutatión peroxidasa y microoxidasa. El resto de unión específica divulgado típicamente comprende un anticuerpo o un ácido nucleico.

5 Con referencia al procedimiento divulgado, depositar el marcador de forma proximal a la diana en presencia del potenciador del depósito incluye el potenciador del depósito a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

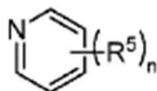
10 En modos de realización divulgados particulares, el sustrato enzimático se puede seleccionar de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un tinte BODIPY, una resorufina, una rodamina o un derivado de los mismos. Más típicamente, el sustrato enzimático es un derivado de tiramina.

15 Cuando la muestra se pone en contacto con una solución de detección, típicamente se expone al sustrato enzimático a una concentración que varía desde más de 0 mM hasta aproximadamente 8 mM. Además, la solución de detección puede comprender además un acelerador seleccionado de un compuesto de heteroarilo, un ácido borónico, un compuesto fenólico o una combinación de los mismos. El compuesto de heteroarilo se puede seleccionar de imidazol, L-histidina, *N*-óxido de piridina, *N*-óxido de pirimidina, óxido de *N*-metilmorfolina y 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo.

20 Además, la solución de detección puede comprender además un tensioactivo no iónico seleccionado de un éter laurílico de polioxietileno que tiene una fórmula  $(C_{2}H_{4}O)_{23}C_{12}H_{25}OH$ ; monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, comprendiendo el monoalquilato 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 éter octil fenílico de polioxietileno. En modos de realización divulgados particulares, la solución de detección puede comprender además

25 un antioxidante seleccionado de bisulfato de sodio, estannato de sodio, metabisulfato de sodio y combinaciones de los mismos, y/o una sal que contiene metal del grupo I o del grupo II que tiene una fórmula  $MX_2$  o  $MX$  en la que *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.

30 También se contempla en la presente divulgación una composición para detectar una diana en una muestra depositando de forma proximal un marcador, que comprende un potenciador del depósito que tiene una fórmula,



35 en la que  $R^5$  es un resto que contiene un heteroátomo; *n* es 1-5; y un sustrato enzimático.

Típicamente, el potenciador del depósito puede tener 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, seleccionándose el sustrato enzimático de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un tinte BODIPY, una resorufina, una rodamina, una tiramida o un derivado de los mismos.

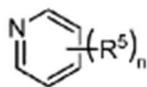
40

En modos de realización divulgados particulares, la composición puede comprender además un acelerador seleccionado de un compuesto de 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.

45

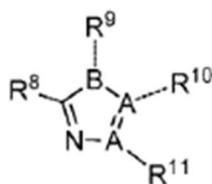
También se divulga un kit, que comprende una solución de detección, que comprende un potenciador del depósito y un sustrato enzimático, teniendo el potenciador del depósito una fórmula,

50

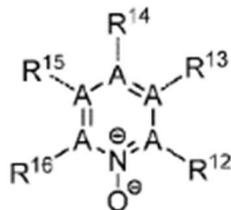


en la que  $R^5$  es un resto que contiene un heteroátomo; *n* es 1-5.

55 En modos de realización particulares, el compuesto de heteroarilo tiene una fórmula de acuerdo con

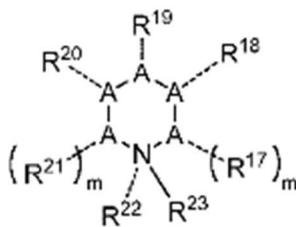


y/o una fórmula de acuerdo con



5

y/o una fórmula de acuerdo con



10

en la que R<sup>8</sup>-R<sup>22</sup> son independientemente un resto alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene un heteroátomo, hidrógeno o cualquier combinación de los mismos; R<sup>23</sup> es [O] u [O<sup>-</sup>]; A es un átomo de carbono, un heteroátomo, distinto de azufre, o cualquier combinación de los mismos; B es oxígeno, carbono o nitrógeno; y m es 0-2. El halógeno se puede seleccionar de yodo, bromo, cloro o flúor, y el resto que contiene un heteroátomo se puede seleccionar de hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida, NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup> en la que R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En modos de realización particulares, R<sup>17</sup> y R<sup>21</sup> comprenden cada uno un grupo metilo y m es 2. Los compuestos de heteroarilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a imidazol, L-histidina, N-óxido de piridina, N-óxido de pirimidina, óxido de N-metil morfolina y 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo.

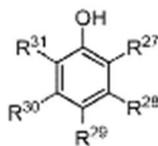
15

20

En modos de realización particulares, el potenciador opcional es un compuesto que contiene boro, tal como un ácido borónico orgánico. Los ejemplos de ácidos borónicos orgánicos incluyen, pero no se limitan a, ácido bórico.

25

En modos de realización particulares, el potenciador opcional es un compuesto fenólico que tiene una fórmula



30

en la que R<sup>27</sup>, R<sup>28</sup>, R<sup>29</sup>, R<sup>30</sup> y R<sup>31</sup> se pueden seleccionar independientemente de hidrógeno, un resto alifático, arilo, un resto que contiene un heteroátomo o cualquier combinación de los mismos. El resto que contiene un heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida y NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, en la que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo y cualquier combinación de los mismos. En modos de realización particulares, cualesquiera dos grupos adyacentes seleccionados de R<sup>27</sup>, R<sup>28</sup>, R<sup>29</sup>, R<sup>30</sup> y R<sup>31</sup> se pueden unir para formar un sistema cíclico condensado, aromático o no aromático. Los compuestos fenólicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, pirocatecol.

35

En modos de realización particulares, el procedimiento actual puede comprender además: inmovilizar el conjugado de resto de unión específica-enzima en 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 modos de realización particulares, la detección del conjugado de tiramida-hapteno comprende además: poner en contacto la muestra con un anticuerpo antihapteno que puede reconocer y se puede unir al conjugado de tiramida-hapteno y un resto detectable que se puede detectar usando técnicas de depósito o fluorescentes; y detectar el resto detectable. En modos de realización particulares, el conjugado de tiramida-hapteno comprende un hapteno conjugado directamente con tiramina o mediante un conector. Típicamente, el conector es alifático o heteroalifático.

Lo anterior y las características y ventajas de la presente divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que transcurre con referencia a las figuras adjuntas.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una imagen digital que muestra la tinción con IHQ de bcl2 en tejido de amígdala usando un kit de detección estándar ultraView™.

La FIG. 2 es una imagen digital que muestra el uso de imidazol 10 mM como tampón de base en la solución de tinción de diaminobencidina (DAB) para la tinción con IHQ de bcl2 en tejido de amígdala.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la influencia del ácido 4-acetilamidofenilborónico sobre la  $V_{máx}$  aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de la DAB oxidada se controló a 455 nm.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra la influencia del imidazol sobre la  $V_{máx}$  aparente para la DAB oxidada con peroxidasa de rábano picante (HRP) cuando se añade al kit de detección ultraView™. La densidad óptica de la DAB oxidada se controló a 455 nm.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las FIGS. 14-17 son imágenes digitales de la tinción con IHQ de bcl2 en tejido de amígdala usando un kit de detección VMSI ultraView™ estándar con o sin "soluciones de potenciación" de DAB. Soluciones de potenciación 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 de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM. La puntuación anatomopatológica 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 de cromógeno DAB en imidazol y L-histidina sobre la  $V_{máx}$  aparente para la DAB oxidada por HRP cuando se combina con pirimidina 10 mM. La densidad óptica de la DAB oxidada se controló a 455 nm.

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

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

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

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

15 Las FIGS. 23-26 son imágenes digitales de la tinción con IHQ de bcl2 en tejido de amígdala usando el sistema de amplificación de tiramida con y sin potenciación de la oxidación de HRP para el depósito tanto de tiramina como de DAB. FIG. 23: sin potenciación para el depósito de tiramida o DAB; FIG. 24: sin potenciación del depósito de tiramida, depósito de DAB potenciada; FIG. 25: potenciación del depósito de tiramida, sin depósito de DAB potenciada; FIG. 20 26: potenciación del depósito de tiramida y DAB.

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

25 La FIG. 29 es una imagen digital de la tinción con ISH del ribosoma 18s en tejidos de xenoinjerto CaLu-3 con ribosonda 18s, y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10 mM como con L-histidina 10 mM.

30 La FIG. 30 es una imagen digital de la tinción con ISH del ribosoma 18s en tejidos de xenoinjerto CaLu-3 con ribosonda 18s y sin potenciación.

La FIG. 31 es una imagen digital de la tinción con IHQ de VPH en tejidos de xenoinjerto CaSki con sonda de VPH haptenilada, y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10 mM como con L-histidina 10 mM.

35 La FIG. 32 es una imagen digital de la tinción con IHQ de VPH en tejidos de xenoinjerto CaSki con sonda de VPH haptenilada y sin potenciación.

La FIG. 33 es una imagen digital de la tinción con IHQ de VPH en tejidos de xenoinjerto HeLa con sonda de VPH haptenilada, y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10 mM como con L-histidina 10 mM.

40 La FIG. 34 es una imagen digital de la tinción con IHQ de VPH en tejidos de xenoinjerto HeLa con sonda de VPH haptenilada y sin potenciación.

45 La FIG. 35 es una imagen digital de la tinción con IHQ de VPH en tejidos de xenoinjerto C33 con sonda de VPH haptenilada, y una DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10 mM como con L-histidina 10 mM.

La FIG. 36 es una imagen digital de la tinción con IHQ de VPH en tejidos de xenoinjerto C33 con sonda de VPH haptenilada y sin potenciación.

50 La FIG. 37 es una imagen digital de la tinción con IHQ de CD20 en tejidos de amígdala con sonda anti-CD20, y DAB potenciada tanto con 2-hidroxipirimidina 10 mM como con L-histidina 10 mM.

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

55 La FIG. 39 es una imagen digital de la tinción con IHQ de CD20 en tejidos de amígdala con sonda anti-CD20, y el depósito de AEC potenciado con L-histidina 50 mM y 2-hidroxipirimidina 10 mM.

60 La FIG. 40 es una imagen digital de la tinción con IHQ de CD20 en tejidos de amígdala con sonda anti-CD20 y sin potenciación.

La FIG. 41 es una imagen digital de la tinción con IHQ de Ki67 en tejidos de amígdala con sonda anti-Ki67, y el depósito de AEC potenciado con L-histidina 50 mM y 2-hidroxipirimidina 10 mM.

65 La FIG. 42 es una imagen digital de la tinción con IHQ de Ki67 en tejidos de amígdala con sonda anti-Ki67 y sin potenciación.

Las FIGS. 43-46 son imágenes digitales de la tinción con IHQ de bcl2 en tejido de amígdala usando el sistema de amplificación de tiramida con y sin potenciación de la oxidación de HRP para el depósito tanto de tiramina como de DAB. FIG. 43: sin potenciación para el depósito de tiramida o DAB; FIG. 44: sin potenciación del depósito de tiramida, depósito de DAB potenciada; FIG. 45: potenciación del depósito de tiramida, sin depósito de DAB potenciada; FIG. 46: potenciación del depósito de tiramida y DAB.

## Descripción detallada

### I. Introducción

Las enfermedades, tales como el cáncer, se pueden diagnosticar mediante diferentes procedimientos. Un procedimiento es identificar la presencia de un biomarcador, tal como un biomarcador de cáncer, en tejido o células, estando el biomarcador correlacionado, o se piensa que está correlacionado, con un tipo de cáncer particular. La inmunohistoquímica a menudo se usa para seleccionar como dianas biomarcadores de proteínas que están asociados con un tipo particular de cáncer, mientras que las técnicas de hibridación *in situ* se emplean a menudo para seleccionar como dianas secuencias de ácido nucleico que están asociadas con un tipo particular de cáncer.

Los procedimientos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para la identificación de dianas son cada vez más importantes en aplicaciones de investigación y para 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 interactúa o se deposita en la molécula diana presente o que se cree que está presente en una muestra de tejido, tal como una proteína y/o una molécula diana de ácido nucleico. Teóricamente, una forma de aumentar la señal obtenida es aumentar el depósito de un resto detectable en la molécula diana, por ejemplo, aumentando la tasa de depósito, de modo que se pueda obtener una señal mayor en un periodo de tiempo más corto.

Como se divulga en el presente documento, una formulación novedosa de un cromógeno DAB actúa sinérgicamente para proporcionar un depósito de DAB maximizada durante la tinción de tejido con IHQ o ISH. La formulación novedosa del cromógeno DAB utiliza un potenciador orgánico como una sal tamponante en combinación con una variedad de potenciadores orgánicos/inorgánicos y tensioactivo para maximizar sinérgicamente el depósito de DAB y, por lo tanto, la señal. También se divulgan en el presente documento procedimientos de uso de las formulaciones divulgadas para potenciar la tinción de tejido con IHQ y/o ISH.

Los procedimientos descritos en el presente documento encuentran utilidad para el diagnóstico, en el que los resultados proporcionados por los procedimientos divulgados se usan no solamente para diagnóstico, sino también para determinar el tratamiento óptimo y hacer un seguimiento de la progresión y éxito de dicho tratamiento, en un entorno clínico.

### II. Términos

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000; 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*, 2.<sup>a</sup> edición, 2003.

Las formas singulares "un", "uno", "una" y "el", "la" se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "que comprende una célula" incluye células individuales o múltiples y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos una célula". El término "o" se refiere a un elemento individual de elementos alternativos comentados o a una combinación de dos o más elementos, a menos 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 se puede formar un enlace en una posición particular.

Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para la práctica o prueba de la tecnología divulgada, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Las siguientes explicaciones de términos y procedimientos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente divulgación.

**Alifático:** restos que incluyen grupos alquilo, alqueno, alquino, 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.

**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 saturado ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Las expresiones "alquilo halogenado" o "grupo haloalquilo" se refieren a un grupo alquilo como se define 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 no aromático basado en carbono compuesto de al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, etc.

La expresión "grupo heterocicloalquilo" es un grupo cicloalquilo en el que al menos uno de los átomos de carbono del anillo está sustituido con un heteroátomo tal como, pero sin limitarse a, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. Los grupos opcionalmente sustituidos, tales como "alquilo sustituido", describen grupos, tales como un grupo alquilo, que tienen de 1 a 5 sustituyentes, típicamente de 1-3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, arilo, carboxialquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, cicloalqueno opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, tiol y tioalcoxi.

**Amplificación:** amplificación se refiere al acto o resultado de hacer que una señal sea más fuerte. La amplificación puede ser un aumento en la magnitud de la señal y/o en un aumento de la señal con respecto al fondo, por ejemplo, una proporción de señal a ruido aumentada.

**Anticuerpo:** colectivamente se refiere a inmunoglobulinas o moléculas similares a inmunoglobulinas (incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares), a la exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es al menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$  mayor, al menos  $10^4 \text{ M}^{-1}$  mayor o al menos  $10^5 \text{ M}^{-1}$  mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica).

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

Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas y las variantes y partes de los mismos que son bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos [tales como fragmentos  $F(ab')_2$ , fragmentos  $Fab'$ , fragmentos  $Fab'$ -SH y fragmentos  $Fab$  como se conocen en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos  $F(ab')_2$ , proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como se conocen en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.015.695, 6.005.079, 5.874.541, 5.840.526, 5.800.988 y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un conector, mientras que en la dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas genéticamente modificadas 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*, 3.ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Típicamente, una inmunoglobulina 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 cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable; las regiones también se conocen como "dominios". En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región marco y las CDR (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE. UU., 1991). La base de datos de Kabat ahora se mantiene en línea. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para ubicar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de unirse a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N, y

también se identifican típicamente por la cadena en la que está localizada la CDR particular. Por lo tanto, una  $V_H$  CDR3 se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una  $V_L$  CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

5 **Antígeno:** una molécula que estimula una respuesta inmunitaria. Los antígenos habitualmente son proteínas o polisacáridos. Un epítipo es un determinante antigénico compuesto por 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 particular de un antígeno se puede usar para localizar la posición del antígeno, por ejemplo, en o sobre una muestra biológica, o determinar si el antígeno particular está presente en una muestra biológica. Un antígeno de interés es un antígeno para detectarlo en un ensayo de IHQ para el que está diseñado en una muestra de prueba. Por ejemplo, para detectar un antígeno de interés, el anticuerpo primario usado en el ensayo de IHQ se une específicamente al antígeno de interés.

15 Un epítipo es un sitio en 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, regiones de unión a anticuerpos que contienen proteínas supercántigos o aptámero). Los epítipos se pueden formar tanto a partir de residuos contiguos como 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 residuos contiguos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) se retienen típicamente al exponerlos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8 o 10 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). Típicamente, un epítipo también tiene menos de 20 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de longitud, tal como menos de 15 residuos o menos de 12 residuos.

25 **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 sola. También se puede considerar una manifestación de deslocalización cíclica y de resonancia.

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

35 **Arilalquilo:** un compuesto, o un radical del mismo ( $C_7H_7$  para el tolueno) como un sustituyente unido a otro grupo, particularmente otros grupos orgánicos, que contiene estructuras tanto alifáticas como aromáticas.

40 **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.

45 **Afinidad de unión:** la tendencia de una molécula a unirse (típicamente 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 se puede medir como una constante de unión, cuya afinidad de unión por un par de unión específica (tal como un par de anticuerpo/antígeno o par de sonda de ácido nucleico/secuencia de ácido nucleico) puede ser de al menos  $1 \times 10^5 M^{-1}$ , tal como mínimo  $1 \times 10^6 M^{-1}$ , al menos  $1 \times 10^7 M^{-1}$  o al menos  $1 \times 10^8 M^{-1}$ . En un modo de realización, la afinidad de unión se calcula mediante una modificación del procedimiento Scatchard descrito por Frankel *et al.*, *Mol. Immunol.*, 16:101-106, 1979. En otro modo de realización, la afinidad de unión se mide mediante una velocidad de disociación de antígeno/anticuerpo. En todavía otro modo de realización, se mide una alta afinidad de unión mediante un radioinmunoensayo de competición. En varios ejemplos, una alta afinidad de unión para un par de anticuerpo/antígeno es de al menos aproximadamente  $1 \times 10^8 M^{-1}$ . En otros modos de realización, 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 al menos aproximadamente  $5,0 \times 10^8 M^{-1}$ .

55 **Cromógeno:** una sustancia que se puede convertir en un producto coloreado, tal como un pigmento o un colorante. Ciertos cromógenos son donadores de electrones que, cuando se oxidan, se convierten en un producto coloreado. La generación de un producto coloreado, y la propiedad de volverse insoluble tras la conversión química, tal como por oxidación, hacen que los cromógenos sean útiles para IHQ. Ejemplos particulares de compuestos cromógenos, sin limitación, incluyen diaminobencidina (DAB), tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS), yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

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

65 **Condiciones suficientes para detectar:** 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 tampón y medios de detección tales como microscopios y equipos de imágenes digitales.

5 **Contacto:** colocación que permite la asociación entre dos o más restos, particularmente la asociación física directa, por ejemplo, tanto en forma sólida como/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 divulgadas en el presente documento).

10 **Control:** una muestra o procedimiento realizado para evaluar la validez de la prueba. 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 una célula, que es similar a la muestra de prueba real, pero que se sabe por experiencia previa que da un resultado positivo. Un control positivo confirma que las condiciones básicas de la prueba producen un resultado positivo, incluso si ninguna de las muestras de prueba reales produce dicho resultado. En un ejemplo particular, un control positivo es una muestra que se sabe por pruebas previas que contiene el antígeno sospechoso.

15 En otros ejemplos, un control es un control negativo. Un control negativo es un procedimiento o muestra de prueba que se sabe por experiencia previa que da un resultado negativo. El control negativo demuestra el resultado inicial obtenido cuando una prueba no produce un resultado positivo mensurable; a menudo, el valor del control negativo se trata como un valor de "fondo" que se debe restar de los resultados de la muestra de prueba. En un ejemplo particular, un control negativo es un reactivo que no incluye el anticuerpo primario específico. Otros ejemplos incluyen controles de calibrador, que son muestras que contienen una cantidad conocida de un antígeno de control. Dichos controles de calibrador tienen una intensidad de señal esperada y, por lo tanto, se pueden usar para corregir la variabilidad de tinción interserial o intraserial.

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

25 **Conjugación, conexión, unión o enlace:** unir una molécula a otra molécula para formar una molécula más grande. Por ejemplo, hacer que dos polipéptidos formen 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 medios químicos o bien recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora de modo que exista un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula.

30 **Acoplado:** el término "acoplado" significa unido, ya sea directa o indirectamente. Un primer átomo o molécula puede estar acoplado directamente o acoplado 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 antihapteno que está unido por un anticuerpo de ratón anti-IgG de conejo, que a su vez está unido por un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón que está unido covalentemente a un marcador detectable.

35 **Derivado:** en química, un derivado es un compuesto que se deriva de un compuesto similar o un compuesto que se puede imaginar que surge de otro compuesto, por ejemplo, si un átomo se reemplaza por otro átomo o grupo de átomos. La última definición es común en química orgánica. En bioquímica, la palabra se usa para compuestos que al menos teóricamente se pueden formar a partir del compuesto precursor.

40 **Marcador 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 de tejido. Cuando se conjuga con una molécula de unión específica, el marcador detectable se puede usar 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 se puede detectar detectando la señal producida por el marcador detectable. Se puede detectar un marcador detectable directa o indirectamente, y se pueden usar varios marcadores detectables diferentes conjugados con diferentes moléculas de unión específica en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable, tal como un hapteno conjugado con un anticuerpo específico para una diana, se puede detectar indirectamente usando un segundo marcador detectable que está conjugado con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Múltiples marcadores detectables que se pueden detectar por separado se pueden conjugar con diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo combinado que puede proporcionar la detección de múltiples dianas en una muestra.

45 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 (por ejemplo, convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra), haptenos que se pueden detectar mediante interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados de anticuerpos marcados detectablemente adicionales, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Los ejemplos particulares de marcadores detectables

incluyen: enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa o  $\beta$ -glucuronidasa; fluoróforos (se pueden encontrar 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 EE. UU. n.º 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos metálicos, tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radioactivos o paramagnéticos como  $Gd^{3+}$ ; cromógenos; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas.

Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se usa un sustrato detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorógeno o un compuesto luminógeno en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia variedad de dichos compuestos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Life Technologies, Carlsbad, CA).

De forma alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfica. Los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo de oxidorreducción de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo de oxidorreducción por la enzima, y el agente activo de oxidorreducción reduce el ion metálico, haciendo que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. en trámite junto con la presente con n.º de serie 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004, la publicación PCT n.º 2005/003777 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0265922). Los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como peroxidasa de rábano picante (HRP)) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, nuevamente para formar un precipitado detectable (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.670.113).

**Detergente o tensioactivo:** una sustancia que reduce la tensión superficial del agua. Específicamente, un detergente o tensioactivo es un agente de superficie activa, o tensioactivo, que se concentra en las 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 puentes de hidrógeno. Además, los tensioactivos o detergentes reducen la tensión interfacial entre dos líquidos. Una molécula de tensioactivo tiene típicamente una "cabeza" polar o iónica y una "cola" de hidrocarburo apolar. Tras la disolución en agua, las moléculas de tensioactivo se agregan y forman micelas, en las que las colas apolares se orientan hacia el interior y las cabezas polares o iónicas se orientan hacia el exterior, hacia el entorno acuoso. Las colas apolares crean un "bolsillo" apolar dentro de la micela. Los compuestos apolares en la solución se secuestran en los bolsillos formados por las moléculas de tensioactivo, lo que permite que los compuestos apolares permanezcan mezclados en la solución acuosa.

**Detectar:** determinar si un agente (tal como una señal o un antígeno, proteína o ácido nucleico particular) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir además la cuantificación y/o localización, por ejemplo, localización dentro de una célula o compartimento celular particular. "Detectar" se refiere a cualquier procedimiento de determinación de si algo existe o no existe, tal como determinar si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, "detectar" puede incluir el uso de un dispositivo mecánico o uno visual para determinar si una muestra exhibe una característica específica. En determinados ejemplos, la detección se refiere a la observación visual de una sonda unida a una diana o a la observación de que una sonda no se une a una diana. Por ejemplo, normalmente se usa microscopía óptica y otros medios microscópicos para detectar precipitados cromógenos para los procedimientos descritos en el presente documento.

**Radiación electromagnética:** una serie de ondas electromagnéticas que se propagan mediante variaciones periódicas simultáneas de intensidad de campo eléctrico y magnético, y que incluye ondas de radio, infrarrojos, luz visible, luz ultravioleta, rayos X y rayos gamma. En ejemplos particulares, la radiación electromagnética se emite 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 a partir de una fuente. En ejemplos particulares, se emite una señal de emisión desde un fluoróforo después de que el fluoróforo absorba luz a su(s) longitud(es) de onda de excitación.

**Potenci(ar/ador/ación):** Un potenciador o reactivo potenciador es cualquier compuesto o cualquier combinación de compuestos suficiente para aumentar la actividad catalítica de una enzima, en comparación con la actividad enzimática sin dicho(s) compuesto(s). El(los) potenciador(es) o reactivo(s) potenciador(es) también se puede(n) definir como un compuesto o combinación de compuestos que aumentan o aceleran la velocidad de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. Potenci(ar/ación) es un proceso mediante el que la actividad catalítica de una enzima se incrementa mediante un potenciador, en comparación con un proceso que no incluye dicho potenciador. Potenci(ar/ación) también se puede definir como el aumento o la aceleración de la velocidad de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. La potenciación se puede medir visualmente, tal como mediante puntuación de un anatomopatólogo. En modos de realización particulares, las puntuaciones varían de más de 0 a más de 4, indicando el número más alto una mejor detección visual. Más típicamente, las puntuaciones 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 se puede medir mediante la determinación de la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de una enzima. En modos de realización 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, tales como aproximadamente 15 mDO/min, 18 mDO/min, aproximadamente 20 mDO/min, aproximadamente 40 mDO/min, aproximadamente 60 mDO/min, aproximadamente 80 mDO/min, aproximadamente 100 mDO/min, aproximadamente 120 mDO/min, aproximadamente 140 mDO/min, aproximadamente 160 mDO/min, aproximadamente 200 mDO/min, aproximadamente 250 mDO/min, aproximadamente 300 mDO/min, aproximadamente 350 mDO/min y aproximadamente 400 mDO/min. Más típicamente, la  $V_{\text{máx}}$  varía de más de 0 mDO/min a aproximadamente 160 mDO/min, tal como aproximadamente 20 mDO/min, aproximadamente 40 mDO/min, aproximadamente 60 mDO/min, aproximadamente 80 mDO/min, aproximadamente 100 mDO/min, aproximadamente 120 mDO/min, aproximadamente 140 mDO/min y aproximadamente 160 mDO/min. Además, se puede producir una potenciación usando cualquier concentración de un potenciador mayor que 0 mM. Típicamente, la potenciación se produce a concentraciones de potenciador que varían desde más de 0 mM hasta aproximadamente 100 mM; incluso más típicamente de aproximadamente 0,01 mM hasta aproximadamente 100 mM, tales 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.

**Excitación o señal de excitación:** la luz de una longitud de onda particular necesaria y/o suficiente para excitar una transición de electrones hasta un nivel de energía más alto. En ejemplos particulares, una excitación es la luz de una longitud de onda particular necesaria y/o suficiente para excitar un fluoróforo hasta un estado tal que el fluoróforo emitirá una longitud de onda de luz diferente (tal como una más larga) que la longitud de onda de la luz de la señal de excitación.

**Fijación:** un procedimiento que conserva los constituyentes celulares y tisulares en un estado lo más cercano posible a la vida y permite que se sometan a procedimientos preparativos sin que se produzcan cambios. La fijación detiene los procesos de autólisis y descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte celular y estabiliza los constituyentes celulares y tisulares de manera que puedan soportar las fases posteriores del procesamiento del tejido, tales como para IHQ.

Los tejidos se pueden fijar mediante perfusión con o bien 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 desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro de mercurio, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, methacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y varios (por ejemplo, fijación por volumen excluido y fijación por vapor). En el fijador también se pueden incluir aditivos, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (por ejemplo, cloruro de cinc, sulfato de cinc y sales de litio) y lantano.

El fijador usado más normalmente en la preparación de muestras para IHQ es el formaldehído, en general en forma de una solución de formol (4 % de formaldehído en una solución tamponante, denominada formol tamponado al 10 %).

**Fluorescencia:** un tipo de luminiscencia en la que un átomo o molécula absorbe energía y a continuación emite luz visible al realizar la transición desde un estado electrónico mayor a uno inferior. El término "fluorescencia" se limita a los fenómenos en los que el intervalo de tiempo entre la absorción y la emisión de energía es extremadamente corto.

**Hibridación fluorescente *in situ* (FISH):** la FISH es una técnica usada para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN y/o ARN en los cromosomas. La FISH usa sondas marcadas fluorescentemente que se unen solamente a aquellas partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia en condiciones de reacción definidas. La FISH también se puede usar para detectar secuencias de ARNm particulares en muestras de tejido.

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

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

Ejemplos de fluoróforos particulares que se pueden usar en las sondas divulgadas en el presente documento se proporcionan en la patente de EE. UU. n.º 5.866.366 de Nazarenko *et al.*, tales como ácido 4-acetamido-4'-

isotiocianatoestilbena-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 (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Brilliant Yellow, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (cumarano 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5''-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidroestilbena-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbena-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 de verde malaquita; 4-metilumbeliferona; ortocresolftaleína, nitrotirosina, pararosanilina, rojo fenol, B-ficoeritrina, o-ftaldialdehído, pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil-1-pireno; rojo reactivo 4 (CIBACRON™ Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo de sulforrodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; derivados de ácido rosólico y quelato de terbio; LightCycler Red 640; Cy5.5; y Cy5.

**Hapteno:** una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente, es sustancialmente incapaz de ser inmunógena, excepto en combinación con una molécula vehículo. Los ejemplos de haptenos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, biotina, nitroarilos, que incluyen, pero no se limitan a, dinitrofenol (DNP), digoxigenina, oxazol, pirazol, tiazol, benzofurano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y ciclolignano.

**Heterobifuncionales:** los agentes de reticulación contienen al menos dos grupos reactivos diferentes en cada extremo, que son reactivos hacia numerosos grupos, que incluyen, pero no se limitan a sulfhidrilos y aminas, y crean enlaces covalentes químicos entre dos o más moléculas, por ejemplo, entre un agente aglutinante específico o resto (tal como un anticuerpo) y una enzima (tal como HRP).

**Hibridación:** formar pares de bases entre regiones complementarias de dos hebras de ADN, ARN, o entre el ADN y el ARN, formando de ese modo una molécula dúplex. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados de rigurosidad particulares variarán en función de la naturaleza del procedimiento de hibridación y de la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico que hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (por ejemplo, la concentración de Na<sup>+</sup>) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación para la consecución de grados de rigurosidad particulares se analizan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview (capítulos 9 y 11).

**Inmunohistoquímica (IHQ):** un procedimiento de determinación de la presencia o distribución de un antígeno en una muestra mediante la detección de la interacción del antígeno con un agente de unión específica o un resto, 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 anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno se puede detectar por medio de un marcador detectable conjugado con el anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado con un anticuerpo secundario, que se produce contra el anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta). Los marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos, fluorocromos (tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y rodamina), enzimas y moléculas cromógenas.

**Hibridación *in situ* (ISH):** un tipo de hibridación que usa una cadena de ARN o ADN complementaria marcada (es decir, una sonda) para localizar una secuencia de ADN o ARN específica en una parte o corte de tejido (*in situ*) o, si el tejido es lo suficientemente pequeño (por ejemplo, semillas de plantas, embriones de *Drosophila*), en todo el tejido (ISH de preparaciones completas o "*whole mount*"). Es distinta de la inmunohistoquímica, que localiza proteínas en cortes de tejido. La ISH de ADN se puede usar para determinar la estructura de los cromosomas, tal como para su uso en el diagnóstico médico para evaluar la integridad cromosómica. La ISH de ARN (histoquímica de hibridación) se usa para medir y localizar ARNm y otros transcritos dentro de los cortes de tejido o preparaciones completas.

Para la histoquímica de hibridación, las células y los tejidos de la muestra se tratan, habitualmente, para fijar los transcritos diana en su lugar y aumentar el acceso de la sonda a la molécula diana. Como se indica anteriormente, la sonda es un ADN complementario marcado o bien un ARN complementario (ribosonda). La sonda se hibrida con la secuencia diana a temperatura elevada y, a continuación, el exceso de sonda se elimina por lavado (después de hidrólisis previa usando RNasa en el caso de exceso de sonda de ARN sin hibridar). Los parámetros de la solución, tales como la temperatura, la concentración de sal y/o de detergente, se pueden manipular para eliminar cualquier interacción no idéntica (es decir, solamente los emparejamientos de secuencias exactos permanecerán unidos). A continuación, la sonda marcada que se ha marcado de manera eficaz, tal como con bases radiomarcadas, marcadas con fluorescencia o con antígeno (por ejemplo, digoxigenina), se localiza y se cuantifica potencialmente en el tejido

usando autorradiografía, microscopia de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente.

**Conector:** como se usa en el presente documento, un conector es una molécula o grupo de átomos ubicado entre dos restos. Típicamente, los conectores son bifuncionales, es decir, el conector incluye un grupo funcional en cada extremo, en el que los grupos funcionales se usan para acoplar el conector a los dos restos. Los dos grupos funcionales pueden ser iguales, es decir, un conector homobifuncional, o diferentes, es decir, un conector heterobifuncional.

**Péptido conector:** 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. "Conector" también se puede referir a un péptido que sirve para unir un resto de selección de dianas, 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 que se va a determinar la presencia, localización y/o concentración. Los ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácido nucleico presentes en muestras de tejido.

**Combinación múltiple:** los modos de realización de la presente divulgación permiten detectar múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea, o secuencial, según se desee, usando múltiples conjugados diferentes. La combinación múltiple puede incluir la identificación y/o cuantificación de ácidos nucleicos, en general, ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto individualmente como en todas y cada una de las combinaciones. La combinación múltiple también puede incluir la detección de 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 anómalo e incontrolado. La neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo.

El producto de la neoplasia es una neoplasia (un tumor), que es un crecimiento anómalo de tejido que resulta de una división celular excesiva. Un tumor que no metastatiza se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede metastatizar se denomina "maligno". Los ejemplos de tumores hemáticos incluyen leucemias, que incluyen leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (formas inactiva y de gran malignidad), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, tricoleucemia y mielodisplasia.

Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, neoplasias de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, 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 de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

**Oligonucleótido:** una pluralidad de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster naturales, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Un análogo oligonucleotídico se refiere a restos que funcionan de manera similar a los oligonucleótidos pero que tienen partes que no son naturales. Por ejemplo, los análogos oligonucleotídicos pueden contener partes no naturales, tales como restos glúcidos o enlaces interglúcidos alterados, tales como un oligodesoxinucleótido de fosforotioato. Los análogos funcionales de polinucleótidos naturales se pueden unir a ARN o ADN, e incluyen moléculas de ácido peptidonucleico.

Los 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.

**Sonda:** un ácido nucleico aislado, un oligonucleótido sintético aislado, fijado a un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores típicos incluyen isótopos radioactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. Se analizan procedimientos de marcaje y directrices en la elección de marcadores apropiados para diversos fines, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en Current Protocols in Molecular Biology,

Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992).

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

**Polipéptido:** un polímero en el que los monómeros son residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces amida. Cuando los aminoácidos son  $\alpha$ -aminoácidos, se puede usar el isómero óptico L o el isómero óptico D. Se pretende que los términos "polipéptido" o "proteína", como se usan en el presente documento, abarquen cualquier secuencia de aminoácidos y que incluyan secuencias modificadas, tales como glucoproteínas. Se pretende que el término "polipéptido" cubra específicamente las proteínas naturales, así como las que se producen de forma recombinante o sintética.

El término "residuo" o "residuo de aminoácido" incluye la referencia 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 que puede estar presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida de un material biológico. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen muestras de tejido 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 líquida obtenida de, excretada por o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo, sin limitaciones, organismos unicelulares tales como bacterias, levaduras, protozoos y amebas, entre otros, organismos multicelulares (tales como vegetales o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o de un paciente humano afectado por una afección o enfermedad que se va a diagnosticar o investigar, tal como cáncer). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un líquido biológico obtenido, por ejemplo, de sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, el líquido obtenido de un absceso o de cualquier otro sitio de infección o inflamación) o líquido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por la enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una muestra de biopsia o necropsia, por ejemplo, una biopsia de tumor) o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o célula cultivada) o medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un extracto del núcleo. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un citoplasma bacteriano. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba es una célula, un corte de tejido o sedimento celular preparado a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es uno que está en riesgo de padecer una afección o enfermedad particular o que ya la padece.

**Se une específicamente:** un término que se refiere a la unión del 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 de ácido nucleico específica). 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, a 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, a una secuencia de ácido nucleico específica.

Un agente o resto de unión específica se une sustancialmente a una diana definida solamente. Se reconoce que se puede producir un grado menor de interacción no específica 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 da como resultado más de 2 veces, tal como más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100 veces de aumento en la cantidad de anticuerpo unido u otro ligando (por unidad de tiempo) a un polipéptido diana, en comparación con un polipéptido no diana. Una variedad de formatos de inmunoensayo son apropiados para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente 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 los formatos de inmunoensayo y las condiciones que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

La unión específica de una sonda de ácido nucleico a una secuencia de ácido nucleico típicamente da como resultado más de 2 veces, tal como más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100 veces de aumento 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 variedad de condiciones de ISH son apropiadas para seleccionar sondas de ácido nucleico que se unen específicamente con una secuencia de ácido nucleico particular.

**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 por que se unen entre sí a la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es al menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$  mayor,  $10^4 \text{ M}^{-1}$  mayor o  $10^5 \text{ M}^{-1}$  mayor que una constante de unión para cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas en una muestra biológica). Los ejemplos particulares de restos de unión

- 5 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 proteínas. Los restos de unión específica también pueden incluir las moléculas (o partes de las mismas) que están específicamente unidas por dichas proteínas de unión específica.
- 10 **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.

- 15 **Tiramina:** un compuesto que tiene la fórmula  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$ , también conocido como 4-(2-aminoetil)fenol.

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

### 20 **III. Descripción general de varios modos de realización**

#### **A. Composiciones**

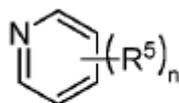
- Aspectos de la presente divulgación se refieren a composiciones que potencian el depósito de restos detectables en muestras de tejido, por ejemplo, cortes de tejido tales como los que se someten a prueba para detectar la presencia de marcadores, tales como marcadores de enfermedad. Por tanto, en el presente documento se divulgan composiciones para potenciar el depósito de restos detectables en muestras de tejido, por ejemplo, cortes de tejido. El depósito potenciado proporciona una capacidad mejorada de detectar e identificar fácilmente dianas en una muestra de tejido, por ejemplo, mejorando la calidad, cantidad y/o proporción de señal a ruido de restos detectables en muestras de tejido. En determinados modos de realización, las composiciones y procedimientos divulgados proporcionados en el presente documento aumentan y/o mejoran el recambio enzimático aumentando las tasas aparentes de oxidación enzimática, y de ese modo potencian la capacidad de la enzima de reaccionar con los componentes de la composición y aumentar el depósito de restos detectables en el sitio diana específico, tal como el sitio de una molécula diana en una muestra. En dichos modos de realización, los productos enzimáticos son restos detectables que se depositan en muestras de tejido. Los componentes de composición ejemplares se detallan adicionalmente en las siguientes secciones.

#### **1. Potenciadores**

- 40 Los modos de realización divulgados utilizan potenciadores o soluciones potenciadoras para mejorar la actividad enzimática hacia el depósito de restos detectables, por ejemplo, en el caso de HRP aumentando la cinética de reacción enzimática aparente y aumentando de ese modo la tasa de depósito del sustrato enzimático, tal como el producto de reacción cromógeno de DAB y HRP. Los potenciadores divulgados se pueden usar en soluciones que comprenden otros componentes de la composición, o pueden comprender una solución distinta, en la que 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, pero no se limitan a, glicoles, tales como propilenglicol, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, dimetilformamida y cualquier combinación de los mismos.

#### **i. Análogos de piridina**

Los modos de realización particulares de las composiciones divulgadas incluyen como potenciadores análogos de piridina que tienen las siguientes fórmulas generales (fórmula 1):



**Fórmula 1**

- 55 En algunos ejemplos, con referencia a la fórmula 1,  $\text{R}^5$  es un resto que contiene un heteroátomo, tal como hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida, o  $\text{NR}^6\text{R}^7$  en la que  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los
- 60 mismos. Con referencia a la fórmula 1,  $n$  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-

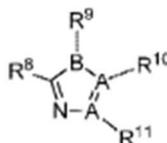
5, 1-4, 2-5 o 1-5. Los ejemplos de análogos de piridina son piridina y 2-hidroxipiridina.

En algunos ejemplos, los potenciadores están presentes en una solución, por ejemplo, para facilitar su 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, 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.

## 15 *ii. Potenciadores opcionales*

En modos de realización particulares, los potenciadores de análogos de piridina se usan junto con potenciadores opcionales adicionales. En algunos modos de realización, los potenciadores opcionales se incluyen en la misma solución que los potenciadores de análogos de piridina y, por tanto, se pueden poner en contacto con una muestra de tejido como una composición única, tal como una solución única. En algunos casos, podría ser deseable incluir los potenciadores opcionales en una solución distinta, por ejemplo, para evitar reactividad y/o solubilidad reducidas. Por tanto, en algunos modos de realización, los potenciadores opcionales se incluyen en una solución diferente de los potenciadores de análogos de piridina y, por tanto, se pueden poner en contacto con una muestra de tejido desde una solución distinta, por ejemplo, como administración por etapas o administración simultánea.

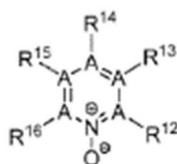
Los modos de realización particulares de las composiciones divulgadas contienen potenciadores opcionales que se pueden usar o no en combinación con el análogo de piridina, dependiendo de factores tales como la aplicación particular o los restos detectables o enzimas, entre otros. En modos de realización particulares, una composición divulgada contiene, como potenciadores opcionales, potenciadores de heteroarilo que tienen la siguiente fórmula general (fórmula 2):



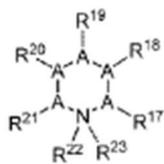
Fórmula 2

Con referencia a la fórmula 2, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son independientemente un resto alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene un heteroátomo, hidrógeno o cualquier combinación de los mismos. En determinados ejemplos, el halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En determinados ejemplos, el resto que contiene un heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup> en la que R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. Con referencia a la fórmula 2, "A" es un heteroátomo (distinto 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 determinados modos de realización, los potenciadores de heteroarilo para su uso en las composiciones divulgadas 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 su distribución desde máquinas automatizadas.

En algunos modos de realización, las composiciones divulgadas contienen, como potenciadores opcionales, potenciadores de heteroarilo que tienen las siguientes fórmulas generales (fórmula 3 y fórmula 4):



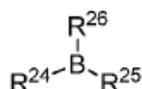
Fórmula 3



Fórmula 4

- 5 Con referencia a las fórmulas 3 y 4, R<sup>12</sup>-R<sup>23</sup> son independientemente un resto alifático, arilo, halógeno, un resto que contiene un heteroátomo, hidrógeno o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el resto de halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En algunos ejemplos, el resto que contiene un heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup> en la R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En determinados
- 10 modos de realización, R<sup>22</sup> es una especie radical, tal como [O], o una especie con carga negativa, tal como [O]<sup>-</sup>. Con referencia a la fórmula 4, en modos de realización particulares, R<sup>21</sup> y R<sup>17</sup> comprenden un grupo dimetilo geminal. Con referencia a la fórmula 4 y/o 5, "A" es un heteroátomo (distinto 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 modos de realización específicos, los potenciadores de
- 15 heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, *N*-óxido de pirimidina, *N*-óxido de piridina, *N*-metil morfolina (NMO) y 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPO).

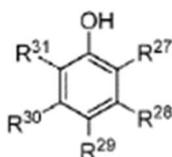
- En algunos modos de realización, las composiciones divulgadas contienen, como potenciadores opcionales, ácidos borónicos orgánicos e inorgánicos. En algunos modos de realización, los ácidos borónicos orgánicos tienen la
- 20 siguiente fórmula general (fórmula 5):



Fórmula 5

- Con referencia a la fórmula 5, R<sup>24</sup>, R<sup>25</sup> y R<sup>26</sup> son independientemente un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En ejemplos específicos, dos o más, tal como 2 o 3, de R<sup>24</sup>, R<sup>25</sup> y R<sup>26</sup> son
- 25 hidroxilo, siendo los R<sup>24</sup>, R<sup>25</sup> o R<sup>26</sup> restantes un resto alifático, arilo, heteroalifático o heteroarilo. En modos de realización particulares, R<sup>24</sup>, R<sup>25</sup> y R<sup>26</sup> son independientemente alquilo, alqueno, alquino y fenilo. En determinados modos de realización de la composición divulgada, los ácidos borónicos orgánicos son ácido bórico, ácido fenil borónico, ácido 4-AcHN-fenil borónico o cualquier combinación de los mismos.

- En algunos modos de realización, las composiciones divulgadas incluyen compuestos fenólicos como potenciadores opcionales. En algunos modos de realización, los compuestos fenólicos tienen la siguiente fórmula general (fórmula
- 30 6):



Fórmula 6

- Con referencia a la fórmula 6, R<sup>27</sup>, R<sup>28</sup>, R<sup>29</sup>, R<sup>30</sup> y R<sup>31</sup> son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, un
- 35

resto que contiene un heteroátomo, halógeno o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el resto de halógeno es yodo, bromo, cloro o flúor. En algunos ejemplos, el resto que contiene un heteroátomo es hidroxilo, éter, éter silílico, éster, ácido carboxílico, sililo, fosfonato, fosfina, amida o  $NR^6R^7$  en la que  $R^6$  y  $R^7$  son independientemente hidrógeno, un resto alifático, arilo, heteroalifático, heteroarilo o cualquier combinación de los mismos. En modos de realización particulares, cualesquiera dos grupos adyacentes seleccionados de  $R^{27}$ ,  $R^{28}$ ,  $R^{29}$ ,  $R^{30}$  y  $R^{31}$  se pueden unir para formar un sistema cíclico condensado, aromático o no aromático. En modos de realización particulares adicionales, al menos uno de  $R^{27}$ ,  $R^{28}$ ,  $R^{29}$ ,  $R^{30}$  y  $R^{31}$  se selecciona de hidroxilo. Los modos de realización de trabajo particulares se refieren a compuestos fenólicos como potenciadores opcionales, tales como pirocatecol.

## 2. Restos detectables

Las composiciones divulgadas permiten una detección aumentada de restos detectables. Estos restos detectables se pueden seleccionar de cualquier resto que se pueda usar con muestras de tejido. Los modos de realización 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.

Los modos de realización particulares utilizan cromógenos como restos detectables. Los cromógenos se pueden seleccionar de cualquier compuesto que pueda producir un cambio de color detectable tras depositarse en el tejido, por ejemplo, una muestra de tejido tal como un corte de tejido típicamente empleado para el examen histopatológico. En algunos ejemplos, el resto detectable se deposita en tejido de muestra después de que haya actuado en ella una enzima. A modo de ejemplo, la enzima selecciona como diana a una molécula diana en una muestra de tejido, la enzima actúa sobre el resto detectable, que a su vez se deposita en la muestra en la proximidad inmediata de la enzima, lo que posibilita la detección, cuantificación y/o localización de la molécula diana en una muestra de tejido. Los restos detectables se pueden usar en soluciones que comprenden otros componentes de la composición, o pueden comprender una solución distinta, en la que la solución se añade por separado a otros componentes de la composición.

Se pueden diseñar restos de unión específica para conjugarlos directamente con un marcador. Usado de esta manera, el complejo de unión específica/marcador (es decir, la sonda) se pone en contacto con la muestra y se detecta la diana.

Los restos de unión específica también se pueden asociar indirectamente con un marcador. En algunos ejemplos, se pone en contacto un primer resto de unión específica con una muestra. Los restos de unión específica pueden estar basados en ácidos nucleicos o bien en proteínas. El resto de unión específica se puede conjugar con otro resto que a continuación 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 se puede unir a continuación a un marcador, tal como una enzima. En otro ejemplo, un resto de unión específica se puede asociar indirectamente con un marcador conjugando el resto de unión específica, directa o bien indirectamente, con un péptido que tiene actividad enzimática. La actividad enzimática se elige de manera que tras la adición de uno o más sustratos, el/los sustrato(s) se convierta(n) en un resto detectable, o se vuelva un marcador más activo.

Los ejemplos no limitantes ejemplares de pares de enzima/sustrato incluyen los siguientes: HRP/DAB con un sustrato cromógeno o sustrato fluorógeno. Los expertos en la técnica conocen otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de las mismas, véanse las patentes de EE. UU. n.º 4.275.149 y 4.318.980. Cuando se genera una sonda a partir de la asociación indirecta de una o más moléculas adicionales, las moléculas adicionales se pueden denominar componentes de la sonda.

En algunos ejemplos, el marcador se conjuga indirectamente con un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo se puede conjugar con biotina, en el que la biotina se une selectivamente a avidina para su posterior detección. De forma alternativa, un anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno y un marcador se conjuga con un anticuerpo antihapteno. Por tanto, se puede lograr la conjugación indirecta del marcador con el resto de selección de dianas.

Cuando la sonda incluye una enzima que reacciona con un sustrato para generar el marcador de detección, el sustrato puede ser un compuesto cromógeno. Hay numerosos ejemplos de dichos sustratos. Por ejemplo, muchos de dichos compuestos se pueden adquirir de Invitrogen, Eugene OR. Los ejemplos no limitantes particulares de compuestos cromógenos incluyen nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-Gal),

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

Los modos de realización particulares utilizan fluoróforos como restos detectables. Los fluoróforos se pueden seleccionar de compuestos que muestran fluorescencia, que incluyen, pero no se limitan a, fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas. Se proporcionan ejemplos de fluoróforos particulares que se pueden usar en las sondas divulgadas en el presente documento en la patente de EE. UU. 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 (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Brilliant Yellow, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (cumarano 151); cianosina; 4',6'-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5''-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidroestilbeno-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 de verde malaquita; 4-metilumbeliferona; ortocresoltaleína, nitrotirosina, pararrosanilina, rojo fenol, B-ficoeritrina, o-ftaldialdehído, pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil-1-pireno; rojo reactivo 4 (CIBACRON™ Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo de sulforrodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; derivados de ácido rosólico y quelato de terbio; LightCycler Red 640; Cy5.5; y Cy5 (muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes se pueden encontrar en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, Molecular Probes, Eugene, OR).

En otros modos de realización, 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. Determinados modos de realización usan conjugados de tiramida que comprenden tiramina y un hapteno en los que el hapteno se selecciona de oxazol, pirazol, tiazol, benzofurazano, triterpeno, urea, tiourea, nitroarilo, rotenoide, cumarina, ciclolignano, heterobiarilo, azoarilo, benzodiacepina o combinaciones de los mismos.

Otros modos de realización contemplados por la presente divulgación incluyen conjugados de tiramida que incluyen un compuesto de tiramina unido a una nanopartícula, tal como un punto cuántico. Otros modos de realización particulares incluyen un compuesto de tiramina unido a un fluoróforo, que se puede seleccionar de fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas. Todavía otros modos de realización particulares se refieren a un compuesto de tiramina unido a una proteína, que se puede seleccionar de una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa o  $\beta$ -lactamasa.

En modos de realización particulares, el marcador detectable o hapteno se fija al compuesto de tiramina mediante un conector, tal como un conector alifático, un conector heteroalifático o cualquier otro resto de fijación flexible con reactividades comparables. Por ejemplo, un compuesto de tiramina se puede modificar covalentemente con un marcador detectable mediante un conector de polialquilenglicol heterobifuncional tal como un conector de polietilenglicol (PEG) heterobifuncional.

Una clase de conectores adecuados para formar conjugados de tiramina-resto detectable y conjugados de tiramina-hapteno divulgados son compuestos alifáticos, tales como cadenas de hidrocarburo alifático que tienen uno o más sitios de insaturación o cadenas de alquilo. La cadena alifática también incluye típicamente grupos funcionales terminales, que incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, un grupo reactivo con carbonilo, un grupo reactivo con amina, un grupo reactivo con tiol o un grupo fotorreactivo, que facilita el acoplamiento a restos detectables y otros compuestos deseados. La longitud de la cadena puede variar, pero típicamente tiene un límite práctico superior de

aproximadamente 30 átomos. Los enlaces de cadena mayores a aproximadamente 30 átomos de carbono han demostrado ser menos eficaces que los compuestos que tienen enlaces de cadena más pequeña. Por tanto, los conectores de cadena alifática tienen típicamente una longitud de cadena de aproximadamente 1 átomo de carbono a aproximadamente 30 átomos de carbono. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que, si un conector particular tiene más de 30 átomos, y aún funciona de manera eficaz para unir el resto detectable a un compuesto de tiramina, y el conjugado aún funciona como se desea, entonces dichos enlaces de cadena están aún dentro del alcance de la presente invención. Las concentraciones típicas para conjugados de tiramida-hapteno que comprenden los conectores divulgados varían de aproximadamente 500  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ . Incluso concentraciones más típicas varían de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 55  $\mu\text{M}$ .

Otra clase de conectores útiles son los óxidos de alquileo. Los óxidos de alquileo se representan en el presente documento por referencia a glicoles, tales como etilenglicoles. Un experto en la técnica apreciará que, a medida que aumenta el número de átomos de oxígeno, también puede aumentar la hidrofilia del compuesto. Por tanto, los conectores de la presente divulgación tienen típicamente una fórmula de  $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$  en la que  $n$  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, 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 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 y de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM.

### 3. Conjugados de restos de unión específica

Los modos de realización particulares se refieren al uso de conjugados que comprenden un resto de unión específica y una enzima, en los que el resto de unión específica puede reconocer y unirse a una diana particular en una muestra. Los restos de unión específica se pueden seleccionar de oligonucleótidos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. Los modos de realización particulares se refieren al uso de proteínas, tales como anticuerpos, como restos de unión específica.

En modos de realización particulares, el resto de unión específica está unido a una enzima. Los ejemplos de enzimas contempladas del procedimiento pueden incluir oxidorreductasas, tales como peroxidasas. Los modos de realización particulares se refieren al uso de peroxidasa de rábano picante, glutatión peroxidasa o cualquier otra peroxidasa que contenga un resto hemo.

En determinados modos de realización, los conjugados que comprenden un resto de unión específica y un hapteno se pueden usar junto con un segundo conjugado que comprende un anticuerpo antihapteno y una enzima. En estos modos de realización particulares, el resto de unión específica, típicamente un anticuerpo, puede reconocer una diana en una muestra y se puede unir a la misma. El resto de unión específica está unido a un hapteno, que lo reconocerá el segundo conjugado que comprende el anticuerpo antihapteno 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 se puede seleccionar de oxazol, pirazol, tiazol, benzofurazano, triterpeno, urea, tiourea, nitroarilo, rotenoide, cumarina, ciclolignano, heterobiarilo, azoarilo, benzodiazepina o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, IgG de conejo, IgG de ratón, IgM de ratón e IgG de cabra. Las enzimas ejemplares son como se divulgan previamente. En algunos ejemplos, los conjugados de 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 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 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

Modos de realización particulares se refieren a composiciones que comprenden además sales que contienen metales del grupo I o el grupo II que tienen una fórmula  $MX_n$  o  $MX$ , en la que M es un metal del grupo I o del grupo II, y X se selecciona de haluro, tal como fluoruro, bromuro, cloruro y yoduro; e iones que contienen oxígeno, tales como carbonato, hidróxido y fosfato. Modos de realización particulares se refieren al uso de metal del grupo I seleccionado de sodio, litio, cesio y potasio. Otros modos de realización particulares se refieren al uso de metales del grupo II seleccionados de magnesio, calcio, estroncio y bario. Modos de realización 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 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, 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.

Los modos de realización particulares se refieren a composiciones que comprenden además oxidantes, inhibidores y tensioactivos como componentes que se pueden usar en cualquier combinación con cualquiera de los componentes divulgados previamente. Los oxidantes pueden incluir cualquier compuesto que pueda activar de forma eficaz la enzima. Modos de realización particulares se refieren al uso de peróxidos, tales como peróxido de hidrógeno, como oxidantes usados para activar la enzima. Típicamente, el oxidante es peróxido de hidrógeno a un 0,03 %.

Un inhibidor se puede seleccionar de cualquier compuesto que pueda inhibir de forma eficaz la enzima después de que haya reaccionado suficientemente de una manera que da como resultado el depósito del resto detectable. Modos de realización particulares se refieren a inhibidores seleccionados de peroxidasas. Típicamente, el peróxido de hidrógeno se usa como inhibidor. Determinados modos de realización se refieren al uso de peróxido de hidrógeno a un 3 % como inhibidor. En modos de realización particulares, el inhibidor se añade a la muestra posteriormente a la adición de los otros componentes de la composición.

Modos de realización particulares de esta divulgación se refieren a composiciones para su uso en la detección de una molécula diana en una muestra, tal como una muestra de tejido. En algunos modos de realización, las composiciones comercialmente viables comprenden un análogo de piridina, un potenciador opcional, un resto detectable, un conjugado de resto de unión específica, una enzima, un oxidante y un tensioactivo. Estos componentes de composición se pueden añadir en cualquier orden y cualquier combinación que dé como resultado el depósito eficaz del resto detectable en la diana en la muestra. Las composiciones se pueden usar junto con un segundo anticuerpo, que se conjuga con una enzima, un oxidante y un tinte.

En modos de realización de trabajo particulares, el análogo de piridina es 2-hidroxipiridina. En modos de realización de trabajo particulares, el conjugado del resto de unión específica es un conjugado de anticuerpo IgG con hapteno y el anticuerpo secundario comprende un conjugado de HRP múltiplo antihapteno.

Modos de realización divulgados 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 enlaces de hidrógeno. Además, los tensioactivos reducen la tensión interfacial entre dos líquidos. Una molécula de tensioactivo tiene típicamente una "cabeza" polar o iónica y una "cola" de hidrocarburo apolar. Tras la disolución en agua, las moléculas de tensioactivo se agregan y forman micelas, en las que las colas apolares se orientan hacia el interior y las cabezas polares o iónicas se orientan hacia el exterior, hacia el entorno acuoso. Las colas apolares crean un "bolsillo" apolar dentro de la micela. Los compuestos apolares en la solución se secuestran en los bolsillos formados por las moléculas de tensioactivo, lo que permite que los compuestos apolares permanezcan mezclados en la solución acuosa. En modos de realización divulgados particulares, el tensioactivo se puede usar para producir una distribución uniforme de reactivos a través de un corte de tejido, así como para disminuir la tinción de fondo.

Los ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, éter alquílico de polioxietileno, en el que el alquilo es  $(CH_2)_M$  y el oxietileno es  $(C_2H_4O)_N$ , en el que M es 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 un modo de realización, el tensioactivo es éter laurílico de polioxietileno que tiene una fórmula  $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$ . En otro modo de realización, el tensioactivo es un monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, comprendiendo el monoalquilato entre 8 y 14 carbonos. En otro modo de realización, el tensioactivo es un polioxietileno de alcohol secundario lineal que tiene una fórmula  $C_{12-14}H_{25}$ .

${}_{29}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x$ , en la que x es igual a un número entero entre 2 y 12. En todavía otro modo de realización, el tensioactivo es un éter octil fenílico de polioxietileno. Los tensioactivos ejemplares se venden bajo 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. Los modos de realización de trabajo divulgados particulares se refieren al uso de tensioactivos seleccionados de Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™, Triton™.

## B. Procedimiento de detección de una molécula diana

Las composiciones divulgadas son particularmente útiles para la detección de moléculas diana en muestras porque actúan sinérgicamente para proporcionar un depósito maximizado durante la tinción de tejido con IHQ o ISH. Por tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de detección de una molécula diana en una muestra, tal como una muestra de tejido. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye poner en contacto una muestra con una solución potenciadora que incluye un análogo de piridina como se describe en la sección anterior (Sección A), poner en contacto la muestra con una enzima y poner en contacto la muestra con un resto detectable que se puede detectar mediante depósito o técnicas fluorescentes. En algunos ejemplos, la enzima actúa sobre un sustrato para catalizar la producción del resto detectable, que se deposita en la muestra en la localización de la molécula diana, lo que posibilita 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 de tejido. La diana puede ser cualquier molécula de interés para la que se tiene que determinar la presencia, localización y/o concentración. Los ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácido nucleico. En algunos modos de realización, el análogo de piridina es 2-hidroxipiridina.

En algunos modos de realización, la enzima se inmoviliza en la diana incubando la muestra con un conjugado enzimático que se une a la diana. La enzima se puede conjugar con cualquier resto que se pueda unir a la diana, por ejemplo, se puede conjugar con un anticuerpo o ácido nucleico que reconoce específicamente la molécula diana. Los restos adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, nucleótidos, oligonucleótidos, proteínas, péptidos o aminoácidos.

En otros modos de realización, la inmovilización de la enzima es un procedimiento de múltiples etapas. Por ejemplo, la muestra se puede incubar con un primer resto (por ejemplo, un anticuerpo, nucleótido, oligonucleótido, proteína, oligopéptido, péptido o aminoácido) que se une a la diana. La muestra luego se puede incubar con un conjugado enzimático que comprende un resto que se puede unir al primer resto. En algunos modos de realización, cuando el primer resto es un anticuerpo contra la diana, el procedimiento 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 se puede unir a cualquier anticuerpo monoclonal de conejo, por ejemplo, un anticuerpo secundario. El procedimiento de múltiples etapas puede eliminar la necesidad de generar un conjugado de enzima-anticuerpo que sea adecuado para cada diana.

En algunos modos de realización, 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 con una enzima, se introduce un conjugado de enzima-anticuerpo en el que el resto de anticuerpo del conjugado reconoce y se une al primer anticuerpo.

En algunos modos de realización, la enzima es una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante o glutatión peroxidasa o una oxidoreductasa. Por tanto, se seleccionan condiciones adecuadas para la reacción enzimática tal como una concentración de sal y pH que posibilitan a la enzima para realizar su función deseada, por ejemplo, convertir el sustrato en un resto detectable que se deposita en la muestra de tejido 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 picante, la reacción se puede realizar 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. Se dan ejemplos adicionales de cromógenos para su uso en los procedimientos divulgados en la sección anterior (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. Se dan ejemplos adicionales de fluoróforos para su uso en los modos de realización del procedimiento divulgado en la sección anterior (Sección A).

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

En modos de realización específicos, el resto detectable se conjuga con tiramina, por ejemplo, a través de un conector,

tal como un conector alifático o heteroalifático de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono en una cadena. En modos de realización específicos, el conector es un óxido de alquileo, tal como etilenglicol o un polímero del mismo, por ejemplo, un polímero con de 1 a aproximadamente 15 unidades de etilenglicol. Cuando se usan tiraminas con los procedimientos divulgados, la amplificación de la señal de tiramida se puede usar para amplificar adicionalmente la señal generada. La amplificación de la señal de tiramida utiliza la actividad catalítica de una enzima peroxidasa para unir covalentemente una tiramina o derivado, residuo de tiramina, a una fase sólida. La fase sólida puede ser, por ejemplo, componentes proteínicos de células o estructuras celulares que están inmovilizadas sobre un sustrato tal como un portaobjetos de microscopio. Algunas enzimas peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), en presencia de un peróxido, pueden catalizar la dimerización de compuestos fenólicos. Por tanto, si se añade tiramina a una muestra que contiene proteína en presencia de peroxidasa de rábano picante y peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), el grupo fenol de tiramina puede formar un dímero con el grupo fenol de un aminoácido de tirosina.

Solamente las moléculas de tiramina en proximidad estrecha a la enzima inmovilizada reaccionarán y formarán dímeros con residuos de tirosina en las cercanías o proximales a la enzima inmovilizada, incluyendo residuos de tirosina en la propia enzima, residuos de tirosina en el anticuerpo con el que se conjuga la enzima y/o residuos de tirosina en la muestra que están proximales a la enzima inmovilizada, tal como en aproximadamente 100 nm, en aproximadamente 50 nm, en aproximadamente 10 nm o en aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Por ejemplo, el residuo de tirosina puede estar a una distancia de aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 100 nm, aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 50 nm, aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 10 nm o aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Dicha unión proximal permite que la diana se detecte con al menos el mismo grado de especificidad que los procedimientos de tinción convencionales usados con IHQ y/o ISH. Por ejemplo, los modos de realización del procedimiento divulgado permiten distinguir estructuras subcelulares, por ejemplo, la membrana nuclear frente a la región nuclear, la membrana celular frente a la región citoplásmica, etc.

Una vez que la enzima se inmoviliza en la muestra, el conjugado de tiramida se introduce en condiciones adecuadas para posibilitar que la enzima reaccione con la tiramida. Típicamente, la enzima es una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante. 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, típicamente uniéndose a un residuo de tirosina proximal a la enzima inmovilizada, incluyendo residuos de tirosina dentro de la propia enzima inmovilizada. Después de que el conjugado de tiramida se une a la muestra, se detecta su presencia por medios adecuados, por ejemplo, en virtud de un resto detectable unido a la tiramida.

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

Los modos de realización del procedimiento como se divulga en el presente documento se pueden realizar de forma manual o automatizada, por ejemplo, en un instrumento de procesamiento de tejido automatizado. Los sistemas automatizados típicamente están, al menos parcialmente, si no de manera sustancialmente completa, bajo control de un ordenador. Debido a que los sistemas automatizados típicamente están controlados por un ordenador al menos parcialmente, determinados modos de realización de la presente divulgación también se refieren a uno o más medios tangibles legibles por ordenador que almacenan instrucciones ejecutables por el ordenador para hacer que un ordenador realice modos de realización divulgados del procedimiento.

### **C. Muestras y dianas**

Las muestras incluyen componentes biológicos y, en general, se sospecha que incluyen una o más moléculas diana de interés. Las moléculas diana pueden estar en la superficie de las células y las células pueden estar en una suspensión o en un corte de tejido. Las moléculas diana también pueden ser intracelulares y se detectan tras la lisis celular o la penetración de la célula por una sonda. Un experto en la técnica apreciará que el procedimiento de detección de moléculas diana en una muestra variará dependiendo del tipo de muestra y de la sonda usada. En la técnica se conocen procedimientos de recogida y preparación de muestras.

Las muestras para su uso en los modos de realización del procedimiento y con la composición divulgada en el presente documento, tales como un tejido u otra muestra biológica, se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica por un experto en la técnica. Las muestras se pueden obtener de un sujeto para el cribado de rutina o de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno, tal como una anomalía genética, una infección o una neoplasia. Los modos de realización descritos del procedimiento divulgado también se pueden aplicar a muestras que no tienen anomalías genéticas, enfermedades, trastornos, etc., denominadas muestras "normales". Dichas muestras

normales son útiles, entre otras cosas, como controles para la comparación con otras muestras. Las muestras se pueden analizar para muchos fines diferentes. Por ejemplo, las muestras se pueden usar en un estudio científico o para el diagnóstico de una posible enfermedad, o como indicadores pronósticos para evaluar el éxito del tratamiento, la supervivencia, etc.

5 Las muestras pueden incluir múltiples dianas que se pueden unir específicamente mediante una sonda o molécula indicadora. Las dianas pueden ser secuencias de ácido nucleico o proteínas. A lo largo de la presente divulgación, cuando se hace referencia a una proteína diana, se entiende que las secuencias de ácido nucleico asociadas con esa proteína también se pueden usar como dianas. En algunos ejemplos, la diana es una proteína o molécula de ácido nucleico de un patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito intracelular, tal como de un genoma vírico. Por ejemplo, una proteína diana se puede producir a partir de una secuencia de ácido nucleico diana asociada con (por ejemplo, correlacionada con, causalmente implicada en, etc.) una enfermedad.

15 Una secuencia de ácido nucleico diana puede variar sustancialmente de tamaño. Sin limitación, la secuencia de ácido nucleico puede tener un número variable de residuos de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana puede tener al menos aproximadamente 10 residuos de ácido nucleico o al menos aproximadamente 20, 30, 50, 100, 150, 500, 1000 residuos. Del mismo modo, un polipéptido diana pueden variar sustancialmente de 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 algunos modos de realización, ese polipéptido puede incluir al menos dos epítopos que se unen a un anticuerpo específico de péptido, o fragmento del mismo.

25 En ejemplos no limitantes específicos, una proteína diana se produce por una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico genómico diana) asociada con una neoplasia (por ejemplo, un cáncer). En las células neoplásicas se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluyendo translocaciones y otros reordenamientos, amplificación o eliminación), especialmente en las células cancerosas, tales como leucemias de linfocitos B y de linfocitos 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 de ácido nucleico genómico diana) amplificada o eliminada en al menos una subpoblación de células de una muestra.

30 Se sabe que los oncogenes son responsables de varias neoplasias malignas humanas. Por ejemplo, los reordenamientos cromosómicos que implican al gen *SYT* localizado en la región del punto de ruptura del cromosoma 18q11.2 son comunes entre los tumores de partes blandas de sarcoma sinovial. La translocación t(18q11.2) se puede identificar, 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 distalmente desde el gen *SYT* y la segunda sonda incluye ácido nucleico FPC generado a partir de una secuencia de ácido nucleico diana que se extiende en dirección 3' o proximal al gen *SYT*. Cuando las sondas que corresponden a estas secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico genómico diana) se usan en un procedimiento de hibridación *in situ*, las células normales, que carecen de un t(18q11.2) en la región del gen *SYT*, muestran dos señales de fusión (generadas por los dos marcadores en proximidad estrecha), lo que refleja las dos copias intactas de *SYT*. Las células anómalas con un t(18q11.2) muestran una única señal de fusión.

45 En otros ejemplos, se selecciona una proteína diana producida por una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómico diana) que es un gen supresor de tumor que está eliminado (se ha perdido) en las 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 eliminada en determinados tipos de cáncer de vejiga. Las eliminaciones cromosómicas que implican a 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 determinados tipos de tumores sólidos del sistema nervioso central.

55 Los ejemplos mencionados anteriormente se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Los expertos en la técnica conocen otras numerosas anomalías citogenéticas que se correlacionan con la transformación y/o crecimiento neoplásico. Las proteínas diana que se producen por secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico genómico diana) que se han correlacionado con la transformación neoplásica y que son útiles en los procedimientos divulgados también incluyen el gen del EGFR (7p12; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000007, nucleótidos 55054219-55242525), el gen de C-MYC (8q24.21; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000008, nucleótidos 128817498-128822856), D5S271 (5p15.2), gen de la lipoproteína lipasa (LPL) (8p22; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000008, nucleótidos 19841058-19869049), RBI (13q14; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000013, nucleótidos 47775912-47954023), p53 (17p13.1; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000017, complemento, nucleótidos 7512464-7531642), N-MYC (2p24; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000002, complemento, nucleótidos 151835231-151854620), CHOP (12q13; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000012, complemento, nucleótidos 56196638-56200567), FUS (16p11.2; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000016, nucleótidos 31098954-31110601), FKHR (13p14; por ejemplo, n.º de acceso en GENBANK™ NC\_000013, complemento, nucleótidos 40027817-40138734), así como, por ejemplo: ALK (2p23; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™

NC\_000002, complemento, nucleótidos 29269144-29997936), cadena pesada de Ig, CCND1 (11q13; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000011, nucleótidos 69165054..69178423), BCL2 (18q21.3; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000018, complemento, nucleótidos 58941559-59137593), BCL6 (3q27; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000003, complemento, nucleótidos 188921859-188946169), MALF1, AP1 (1p32-p31; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000001, complemento, nucleótidos 59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000017, complemento, nucleótidos 35798321-35827695), TMRSS (21q22.3; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000021, complemento, nucleótidos 41758351-41801948), ERG (21q22.3; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000021, complemento, nucleótidos 38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000007, complemento, nucleótidos 13897379-13995289), EWS (22q12.2, por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000022, nucleótidos 27994271-28026505); FLI1 (11q24.1-q24.3; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000011, nucleótidos 128069199-128187521), PAX3 (2q35-q37; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000002, complemento, nucleótidos 222772851-222871944), PAX7 (1p36.2-p36.12; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000001, nucleótidos 18830087-18935219), PTEN (10q23.3; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000010, nucleótidos 89613175-89716382), AKT2 (19q13.1- q13.2; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000019, complemento, nucleótidos 45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000001, complemento, nucleótidos 40133685-40140274), REL (2p13-p12; por ejemplo, número de acceso en GENBANK™ NC\_000002, nucleótidos 60962256-61003682) y CSF1R (5q33-q35; por ejemplo, número de acceso en 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 derivado de virus o de microorganismo (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómico diana) en una muestra de célula o tejido es indicativa de la presencia del organismo. Por ejemplo, el péptido, polipéptido o proteína diana se puede seleccionar del genoma de un virus oncógeno o patógeno, una bacteria o un parásito intracelular (tal como *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (*sp.*), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como especies de *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* y *Babesia*).

En algunos ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómica diana) a partir de un genoma vírico. Los virus ejemplares y las correspondientes secuencias genómicas (n.º de acceso en GENBANK™ y RefSeq entre paréntesis) incluyen adenovirus A humano (NC\_001460), adenovirus B humano (NC\_004001), adenovirus C humano (NC\_001405), adenovirus D humano (NC\_002067), adenovirus E humano (NC\_003266), adenovirus F humano (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 A humano (NC\_001612), enterovirus B humano (NC\_001472), enterovirus C humano (NC\_001428), enterovirus D humano (NC\_001430), eritrovirus V9 humano (NC\_004295), virus espumoso humano (NC\_001736), herpesvirus 1 humano (virus del herpes simple de tipo 1) (NC\_001806), herpesvirus 2 humano (virus del herpes simple de tipo 2) (NC\_001798), herpesvirus 3 humano (virus de varicela zóster) (NC\_001348), herpesvirus 4 humano de tipo 1 (virus de Epstein-Barr de tipo 1) (NC\_007605), herpesvirus 4 humano de tipo 2 (virus de Epstein-Barr de tipo 2) (NC\_009334), herpesvirus 5 humano cepa AD169 (NC\_001347), herpesvirus 5 humano cepa Merlin (NC\_006273), herpesvirus 6A humano (NC\_001664), herpesvirus 6B humano (NC\_000898), herpesvirus 7 humano (NC\_001716), herpesvirus 8 humano de tipo M (NC\_003409), herpesvirus 8 humano de tipo P (NC\_009333), virus de la inmunodeficiencia humana 1 (NC\_001802), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (NC\_001722), metapneumovirus humano (NC\_004148), virus del papiloma humano-1 (NC\_001356), virus del papiloma humano-18 (NC\_001357), virus del papiloma humano-2 (NC\_001352), virus del papiloma humano-54 (NC\_001676), virus del papiloma humano-61 (NC\_001694), virus del papiloma humano-cand90 (NC\_004104), virus del papiloma humano RTRX7 (NC\_004761), virus del papiloma humano de tipo 10 (NC\_001576), virus del papiloma humano de tipo 101 (NC\_008189), virus del papiloma humano de tipo 103 (NC\_008188), virus del papiloma humano de tipo 107 (NC\_009239), virus del papiloma humano de tipo 16 (NC\_001526), virus del papiloma humano de tipo 24 (NC\_001683), virus del papiloma humano de tipo 26 (NC\_001583), virus del papiloma humano de tipo 32 (NC\_001586), virus del papiloma humano de tipo 34 (NC\_001587), virus del papiloma humano de tipo 4 (NC\_001457), virus del papiloma humano de tipo 41 (NC\_001354), virus del papiloma humano de tipo 48 (NC\_001690), virus del papiloma humano de tipo 49 (NC\_001591), virus del papiloma humano de tipo 5 (NC\_001531), virus del papiloma humano de tipo 50 (NC\_001691), virus del papiloma humano de tipo 53 (NC\_001593), virus del papiloma humano de tipo 60 (NC\_001693), virus del papiloma humano de tipo 63 (NC\_001458), virus del papiloma humano de tipo 6b (NC\_001355), virus del papiloma humano de tipo 7 (NC\_001595), virus del papiloma humano de tipo 71 (NC\_002644), virus del papiloma humano de tipo 9 (NC\_001596), virus del papiloma humano de tipo 92 (NC\_004500), virus del papiloma humano de tipo 96 (NC\_005134), virus paragripal humano 1 (NC\_003461), virus paragripal humano 2 (NC\_003443), virus paragripal humano 3 (NC\_001796), parechovirus humano (NC\_001897), parvovirus 4 humano (NC\_007018), parvovirus B19 humano (NC\_000883), virus sincicial respiratorio humano (NC\_001781), rinovirus A humano (NC\_001617), rinovirus B humano (NC\_001490), spumavirus humano (NC\_001795), virus linfótrofo T 1 humano (NC\_001436), virus linfótrofo T 2 humano (NC\_001488).

En determinados ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo,

secuencia de ácido nucleico genómica diana) a partir de un virus oncógeno, tal como el virus de Epstein-Barr (VEB) o un virus del papiloma humano (VPH, por ejemplo, VPH16, VPH18). En otros ejemplos, la proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómico diana) es de un virus patógeno, tal como un virus sincicial respiratorio, un virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis C), un coronavirus (por ejemplo, el virus del SRAG), un adenovirus, un poliomavirus, un citomegalovirus (CMV) o un virus del herpes simple (VHS).

#### **D. Preparación de la muestra**

Las muestras de tejido descritas en el presente documento se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido actualmente o desarrollado más adelante en la técnica. En general, las muestras de tejido se preparan mediante fijación e inclusión del tejido en un medio.

En algunos ejemplos se usa un medio de inclusión. Un medio de inclusión es un material inerte en el que se incluyen los tejidos y/o las células para ayudar a conservarlos para futuros análisis. La inclusión también posibilita cortar láminas de las muestras de tejido en secciones finas. Los medios de inclusión incluyen, pero no están limitados a, parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plásticos o acrílicos.

Muchos medios de inclusión son hidrófobos; por lo tanto, puede ser necesario retirar el material inerte antes del análisis histológico o citológico, que utiliza principalmente reactivos hidrófilos. El término desparafinación o desparafinado se usa ampliamente en el presente documento para hacer referencia al retiro parcial o completo de cualquier tipo de medio de inclusión de una muestra biológica. Por ejemplo, los cortes de tejido incluidos en parafina se desparafinan pasándolas por disolventes orgánicos, tales como tolueno, xileno, limoneno u otros disolventes adecuados.

El procedimiento de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra de tejido conserva las células y los constituyentes del tejido en un estado lo más cercano posible a la vida y les permite someterse a procedimientos preparativos sin cambios significativos. La fijación detiene los procesos de autólisis y descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte celular y estabiliza los constituyentes celulares y del tejido de manera que puedan soportar las fases posteriores del procesamiento del tejido, tales como para IHQ o ISH.

Los tejidos se pueden fijar mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo perfusión o inmersión en un fijador. Los fijadores se pueden clasificar en agentes de reticulación (por ejemplo, aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de reticulación no aldehídicos), 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 de mercurio, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, methacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y otros fijadores (por ejemplo, excepto fijación en volumen y fijación con vapor). También se pueden incluir aditivos en el fijador, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (tales como cloruro de cinc, sulfato de cinc y sales de litio) y lantano.

El fijador usado más normalmente en la preparación de muestras para IHQ es el formaldehído, en general en forma de una solución de formol (4 % de formaldehído en una solución tamponante, denominada formol tamponado al 10 %). En un ejemplo, el fijador es formol neutro tamponado al 10 %.

#### **E. Contratinción**

La contratinción es un procedimiento de tratamiento posterior de las muestras después de que ya se hayan teñido con agentes para detectar una o más dianas, de modo que sus estructuras se puedan visualizar más fácilmente bajo un microscopio. Por ejemplo, se usa opcionalmente una contratinción antes de aplicar el cubreobjetos para hacer que la tinción inmunohistoquímica sea más clara. Los tintes de contraste difieren en el color de un tinte primario. Numerosos tintes de contraste son bien conocidos, tales como hematoxilina, eosina, verde de metilo, azul de metileno, Giemsa, azul alciano y Fast Red nuclear.

En algunos ejemplos, se pueden mezclar más de un tinte para producir el tinte de contraste. Esto proporciona flexibilidad y la capacidad de elegir tintes. Por ejemplo, se puede seleccionar un primer tinte para la mezcla que tiene un atributo particular, pero todavía no tiene un atributo deseado diferente. Se puede añadir un segundo tinte a la mezcla que exhiba el atributo deseado que falta. Por ejemplo, azul de toluidina, DAPI y Pontamine Sky Blue se pueden mezclar para formar un tinte de contraste.

#### **F. Imágenes**

Determinados, o todos los aspectos de los modos de realización divulgados se pueden automatizar y facilitar mediante un análisis informático y/o un sistema de análisis de imágenes. En algunas aplicaciones, se miden proporciones de color precisas. En algunos modos de realización, la microscopía óptica se utiliza para el análisis de imágenes. Determinados modos de realización divulgados implican la adquisición de imágenes digitales. Esto se puede hacer acoplado una cámara digital a un microscopio. Las imágenes digitales obtenidas de muestras teñidas se analizan

usando un programa informático de análisis de imágenes. El color se puede medir de diferentes maneras. Por ejemplo, el color se puede medir como valores de rojo, azul y verde; valores de matiz, saturación e intensidad; y/o midiendo una longitud de onda específica o un intervalo de longitudes de onda usando una cámara de imagen espectral.

5 Un modo de realización divulgado implica usar imágenes de campo claro con colorantes cromógenos. La luz blanca en el espectro visible se transmite a través del colorante. El colorante absorbe la luz de determinadas longitudes de onda y transmite otras longitudes de onda. Esto cambia la luz de blanco a coloreado dependiendo de las longitudes de onda específicas de la luz transmitida.

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

15 **G. Kits**

Los modos de realización divulgados proporcionan, en parte, kits para llevar a cabo diversos modos de realización del procedimiento de la invención. Los ejemplos de dichos kits incluyen los útiles para el análisis de colesterol, kits de embarazo, kits de diagnóstico de cáncer, etc. En algunos modos de realización, el kit incluye un análogo de piridina que tiene una fórmula como se describe en la Sección A.

20 En algunos modos de realización, el kit incluye una enzima, tal como una oxidorreductasa o una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante 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 están unidos.

25 En algunos modos de realización, el kit incluye un resto detectable que se puede detectar usando técnicas de depósito o fluorescentes, o un sustrato enzimático que produce el resto detectable después de la reacción con la enzima. En algunos ejemplos, el resto detectable es un fluoróforo (tal como una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un 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 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 de heteroarilo, una sal que contiene metal del grupo I o el grupo II, un compuesto que contiene boro y un compuesto de fenol, por ejemplo los descritos en la Sección A.

30 En algunos modos de realización, el kit incluye un oxidante, tal como un peróxido, por ejemplo, peróxido de hidrógeno.

40 En algunos modos de realización, el kit incluye un tensioactivo, tal como Brij® 35, TWEEN®, Tergitol™ y Triton™.

En algunos modos de realización, el kit incluye un antioxidante seleccionado de estannato de sodio, metabisulfato de sodio y bisulfato de sodio.

45 En algunos modos de realización, el kit incluye mordiente de cobre. El kit puede incluir componentes adicionales, incluyendo anticuerpos, sondas marcadas con hapteno y otros reactivos necesarios para realizar IHQ y/o ISH mediante detección cromógena. Dichos kits se pueden usar, por ejemplo, por un facultativo o un médico como ayuda para seleccionar un tratamiento apropiado para un paciente particular o con fines de diagnóstico.

50 Modos de realización particulares se refieren al uso de kits que comprenden un inhibidor, tal como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %; una HRP de multímero universal, tal como HRP conjugada para cabra antirratón/conejo; un peróxido, tal como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03 %; un cromógeno, tal como DAB; y un mordiente de cobre. Este kit se denomina ultraView™ y se puede usar en combinación con los potenciadores divulgados.

55 **H. Modos de realización automatizados**

Un experto en la técnica apreciará que los modos de realización del procedimiento divulgado en el presente documento para la detección cromógena de dos o más moléculas se pueden automatizar. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de una serie de patentes de Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 20030211630 y 20040052685. Se llevaron a cabo modos de realización particulares de los procedimientos usando diversos procedimientos automatizados.

60 **IV. Ejemplos de trabajo**

65 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características específicas de los modos de

realización de trabajo. El alcance de la presente invención no está limitado a aquellas características ejemplificadas por los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

#### Tinción de tejido con IHQ con imidazol

La tinción con IHQ de bcl2 en amígdala se realizó usando el cromógeno DAB universal ultraView™ potenciado con imidazol. El imidazol (10 mM-100 mM) aumentó significativamente la intensidad de tinción de DAB (véanse las FIGS. 1 y 2). Sin embargo, a medida que aumentaba la señal de DAB deseada, también lo hacía la señal de fondo observada. Concentraciones más altas de imidazol demostraron ser incompatibles, lo que provocó la precipitación de DAB de la solución de cromógeno DAB reformulada.

### Ejemplo 2

#### Cribado cinético de potenciadores

Se desarrolló un ensayo en placa para cribar independientemente posibles compuestos y entender mejor el depósito de DAB potenciada observado 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 de 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 mediante UV-VIS a 455 nm. Los aditivos se sometieron a prueba a concentraciones establecidas para determinar la potenciación en la reacción de oxidación de DAB. Los datos se representaron gráficamente y se calculó la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) aparente en cada nivel de concentración de aditivo.

La prueba inicial de ácido 4-acetilamidofenilborónico e imidazol demostró una velocidad de reacción aumentada para HRP a medida que aumentaba la concentración de cualquiera de los aditivos (véanse las FIGS. 3 y 4, respectivamente). La  $V_{m\acute{a}x}$  aparente para la DAB oxidada con HRP fue de 18,5 mDO/minuto sin potenciación. La adición de imidazol 10 mM aumentó la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente en un 56 % y el ácido 4-acetilamidofenilborónico 10 mM 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 -  $V_{m\acute{a}x}$  uView)/ $V_{m\acute{a}x}$  uView] x 100 %).

Estimulados por los resultados anteriores, se examinaron otros tampones que se podrían usar como posibles potenciadores. Además del uso conceptual de análogos de imidazol, se exploraron las reacciones de oxidación mediadas por peróxido facilitadas por L-histidina. La L-histidina 50 mM aumentó la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de HRP en un 138 % (véase la FIG. 5). Al igual que con una mayor concentración de imidazol, la L-histidina 50 mM también provocó 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 aumentó un 18 % con L-histidina 10 mM. También se sometieron a prueba tampones de 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, pH final que varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 3) para la formulación DAB porque el ácido bórico tiene un intervalo eficaz de tamponamiento del pH de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10,2. La adición de ácido bórico 10 mM potenció la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de HRP en un 265 %, sin embargo, a 50 mM, el ácido bórico potenció enormemente la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de HRP en un 592 % (véase la FIG. 6).

Se examinaron otros compuestos heterocíclicos para encontrar una nueva clase de potenciadores que aumentaran aún más la velocidad aparente de HRP. Se descubrió que los análogos de pirimidina son una clase novedosa de potenciadores. Un resumen de los resultados del ensayo para todos los potenciadores de la oxidación de DAB mediada por HRP se puede encontrar en la tabla 1.

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

| Potenciador               | Concentración (mM) | $V_{m\acute{a}x}$ (mDO/min) | Coef. reg. |
|---------------------------|--------------------|-----------------------------|------------|
| Sin potenciador           | n/d                | 18,50                       | 0,985      |
| Ácido bórico              | 10                 | 67,47                       | 0,989      |
|                           | 50                 | 128,00                      | 0,935      |
|                           | 100                | 47,60 (sat)                 | 0,999      |
| Cloruro de calcio         | 5                  | 43,50                       | 0,984      |
|                           | 10                 | 52,50                       | 0,999      |
|                           | 20                 | 57,00                       | 0,998      |
| 4-AcHNPh(OH) <sub>2</sub> | 5                  | 21,20                       | 0,971      |
|                           | 10                 | 32,80                       | 0,975      |

|                               |                  |             |         |
|-------------------------------|------------------|-------------|---------|
|                               | 20               | 32,00       | 0,977   |
| Imidazol                      | 10               | 28,80       | 0,982   |
|                               | 50               | 38,80       | 0,967   |
|                               | 100              | 70,00       | 0,954   |
|                               |                  |             |         |
| Tiazol                        | 10               | 66,40       | 0,993   |
|                               | 50               | 27,00 (sat) | 0,989   |
|                               | 100              | 27,05 (sat) | 0,972   |
| Oxazol                        | 10               | 24,00       | 0,995   |
|                               | 50               | 40,00       | 0,961   |
|                               | 100              | 18,00 (sat) | 0,998   |
| Pirimidina                    | 10               | 104,00      | 0,961   |
|                               | 50               | 124,00      | 0,968   |
|                               | 100              | 36,80 (sat) | 0,983   |
| L-histidina                   | 10               | 21,84       | 0,973   |
|                               | 50               | 44,00       | 0,999   |
|                               | 100              | 72,00       | 0,961   |
| 2-hidroxipirimidina           | 10               | 144,00      | 2 pt.   |
|                               | 50               | 156,00      | 2 pt.   |
|                               | 100              | 148,00      | 2 pt.   |
| Timina                        | 10               | 82,00       | 0,984   |
|                               | 50 (sol)         | 86,00       | 0,896   |
|                               | 100 (sol)        | 74,00       | 0,990   |
| Citosina                      | 10               | 36,00       | 0,931   |
|                               | 50 (sol)         | 66,00       | 0,857   |
|                               | 100 (sol)        | n/a (1)     | n/a (1) |
| Uracilo                       | 10               | 52,00       | 0,942   |
|                               | 50 (sol)         | 72,00       | 0,933   |
|                               | 100 (sol)        | n/a (1)     | n/a (1) |
| Ácido 2-tiobarbitúrico        | 10               | 54,00       | 0,964   |
|                               | 50               | 56,00       | 0,911   |
|                               | 100              | 76,00       | 0,920   |
| <i>N</i> -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 de la DAB oxidada se controló a 455 nm. (Sat) = La velocidad de reacción se saturó al inicio del análisis UV-VIS. (Sol) = El problema de solubilidad se produjo a temperatura ambiente. Se requirió calor para disolver el aditivo en el tampón de reacción. (1) El aditivo no era soluble a temperatura ambiente.

5

La adición de pirimidina 10 mM aumentó en gran medida la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de HRP en un 462 %. Este aumento aparente de la velocidad de oxidación de DAB fue mayor que la observada con otros potenciadores heterocíclicos (estructuras centrales de imidazol, tiazol y oxazol). El aumento de la concentración de pirimidina hasta 50 mM proporcionó un aumento moderado en la  $V_{m\acute{a}x}$  de HRP con respecto a 10 mM (570 %) (véase la FIG. 7). Una reformulación del cromógeno DAB con pirimidina plantea un posible problema debido a la alta presión de vapor (p. eb.  $\approx$  124 °C). Por tanto, se investigaron otros análogos de pirimidina para encontrar una alternativa adecuada que no tuviera problemas de volatilidad.

10

Las bases de nucleótidos de pirimidina (timina, uracilo y citosina) aumentaron la velocidad aparente de HRP, sin embargo, tienen problemas de solubilidad en tampones acuosos. Se descubrió que tanto la 2-hidroxipirimidina (véase la FIG. 8) como el *N*-óxido de pirimidina proporcionan velocidades aparentes similares o aumentadas con respecto a la pirimidina y no tienen problemas de solubilidad o volatilidad. Se ha demostrado anteriormente que los *N*-óxidos heterocíclicos de cinco y seis miembros aumentan la velocidad aparente de la oxidación basada en HRP de oligo- y

15

polisacáridos, concretamente la oxidación de la celulosa. Las reformulaciones de DAB con *N*-óxido de pirimidina perdieron funcionalidad y dejaron de teñirse con el tiempo. Sin embargo, aún se usa *N*-óxido de pirimidina en una solución de potenciación si se añade a las reacciones de oxidación mediadas por HRP en el tejido. Además de pirimidina, la 2-hidroxipiridina 10 mM aumentó la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de HRP (157 %). El bencimidazol, azul de metileno, fenotiacina y 4-dimetilaminopiridina no proporcionaron ninguna potenciación.

### Ejemplo 3

#### Efectos sinérgicos y antagonicos para potenciadores

El ensayo de placa del ejemplo 2 se usó para examinar los posibles efectos sinérgicos y antagonicos de cada aditivo sobre la velocidad aparente de la oxidación de DAB mediada 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 el tampón de reacción 1X que contenía gelatina de pescado al 0,1 % para cada ensayo. En cada ensayo, los potenciadores se añadieron juntos a la vez. Los resultados se resumen en la FIG. 9 y la tabla 2.

**Tabla 2:** La influencia de los potenciadores se evaluó en la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añadieron secuencialmente al kit de detección ultraView™.

| Entrada | Potenciador                   | $V_{m\acute{a}x}$<br>(mDO/min) | Coef. reg. |
|---------|-------------------------------|--------------------------------|------------|
| 1       | Sin potenciación              | 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                         | 2pt.       |

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

Como se muestra previamente en la tabla 1, el ácido bórico 10 mM aumentó la velocidad aparente de HRP en un 265 %. La adición de cloruro de calcio a los ensayos de HRP mostró que aumenta la estabilidad y la velocidad aparente de HRP. La adición de tanto cloruro de calcio 10 mM como de ácido bórico 10 mM al ensayo que contiene imidazol 10 mM aumentaba sinérgicamente la velocidad aparente de HRP.

El *N*-óxido de morfolina aumentó 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 2, entrada 5), se observó un efecto antagonico. La adición de L-histidina 50 mM o pirimidina 10 mM a la mezcla de reacción 5 (tabla 2, entradas 6 y 7) aumentó la velocidad aparente de HRP. Estos datos respaldan el cribado del uso de *N*-óxidos en una solución de potenciación. Se puede usar *N*-óxido de pirimidina en combinación con L-histidina para aumentar el depósito de DAB en la tinción de tejido con IHQ (véase la FIG. 11).

### Ejemplo 4

#### Tinción de tejido para IHQ con potenciadores

La tinción de IHQ se realizó para bcl2 en tejido de amígdala usando soluciones de cromógeno DAB potenciada para examinar adicionalmente los efectos sinérgicos potenciadores en el depósito de DAB. En la tabla 3 se muestra un resumen de puntuación de histopatología para la tinción de IHQ. El lector 1 realizó todas las evaluaciones de histopatología durante el mismo periodo de tiempo. El lector 2 realizó las evaluaciones en lotes cuando los portaobjetos se produjeron inicialmente y representa alguna variabilidad en la puntuación.

**Tabla 3:** Resumen de puntuación de histopatología para la tinción de IHQ de bcl2 en tejido de amígdala usando tinción con DAB ultraView™ y soluciones de cromógeno DAB potenciada.

| Solución sometida a prueba         | 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 de base contienen 5,5 mM de tetraclorhidrato de 3,3-diaminobencidina (DAB-4 HCl) y Brij® 35 al 0,05 % en peso (sin peroxidasa). [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 de sodio 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 de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM].

Se apreciaron dos observaciones generales. En primer lugar, se logró una potenciación de la velocidad aparente máxima para el depósito de HRP de DAB a través de la combinación de 2-3 componentes potenciadores. Los potenciadores adicionales no aumentaron la intensidad de la señal de la tinción con DAB más fuerte en el tejido; sin embargo, el porcentaje de células teñidas con la intensidad de la señal más alta aumentó en todo el tejido. Esta observación se debió en gran parte al número limitado de recambios observado por las reacciones de oxidación de HRP-DAB en el tejido. En segundo lugar, los potenciadores que aumentaron la oxidación de DAB mediada por HRP en el ensayo de placa proporcionaron un depósito más discreto de DAB en el tejido. La tinción de DAB fue en general menos difusa.

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

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

La tinción con IHQ de bcl2 en tejido de amígdala se evaluó usando la adición de una "solución de potenciación" a un kit de detección ultraView™ estándar. No se hizo ninguna corrección en la concentración de los reactivos ultraView™ para compensar la dilución de la solución de potenciación (véanse las FIGS. 14-17). El lector de histopatología 1 seleccionó L-histidina 50 mM y pirimidina 10 mM (FIG. 16) como una tinción de DAB preferente como se muestra en la tabla 3. El imidazol 100 mM y el ácido bórico 50 mM aumentaron el depósito de DAB, pero redujeron el intervalo dinámico de la señal de DAB y aumentaron el fondo del suero. Una concentración más baja de potenciadores aumentaría el intervalo dinámico de la señal de DAB. Una solución de L-histidina 10 mM, 2-hidroxipirimidina 10 mM, cloruro de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM mostró una señal de DAB menor cuando se reformuló 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.

### Ejemplo 5

#### 5 Cinética de Michaelis-Menten

Para estudiar adicionalmente el efecto sinérgico en la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente aumentada para DAB oxidada con HRP, se calculó la cinética de Michaelis-Menten para las mejores mezclas de cromógeno DAB potenciada en la tabla 3. Se hizo reaccionar una dilución 1:32 del múltimero de HRP ultraView™ con una concentración variable de peróxido de hidrógeno (0,015  $\mu\text{M}$ -0,514  $\mu\text{M}$ ) para saturar la velocidad aparente de HRP. Inicialmente, tanto el imidazol como la L-histidina se examinaron con pirimidina 10 mM (véase la FIG. 18) y 2-hidroxipirimidina 10 mM (véase la FIG. 19). Se calcularon valores de  $K_m$  similares a  $\frac{1}{2}V_{m\acute{a}x}$ , pero el imidazol proporcionaba una  $V_{m\acute{a}x}$  aparente más alta que la L-histidina (véase la tabla 4). La definición de  $V_{m\acute{a}x} = K_{cat} \bullet [E]_{total}$  cuando la concentración de sustrato enzimático estaba en niveles de saturación. Cuando la concentración de la enzima se mantuvo constante, la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente es proporcional a la  $k_{cat}$  (el recambio aparente para HRP o la constante de velocidad de primer orden). El imidazol aumentó el recambio aparente de HRP más que la L-histidina.

**Tabla 4:** Influencia de los potenciadores en la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente para DAB oxidada con HRP cuando se combina con imidazol 50 mM, cloruro de calcio 10 mM y ácido bórico 10 mM.

| Potenciador   | $V_{m\acute{a}x}$<br>(mDO/min) | $K_m$ |
|---|--------------------------------|-------|
| Sin potenciador   | 228                            | 0,073 |
| <b>Tampón con pirimidina 10 mM</b>  |                                |       |
| Imidazol 10 mM  | 330                            | 0,085 |
| L-histidina 10 mM   | 300                            | 0,088 |
| <b>Tampón con 2-hidroxipirimidina 10 mM</b>                                       |                                |       |
| Imidazol 50 mM  | 320                            | 0,081 |
| L-histidina 50 mM   | 317                            | 0,084 |
| <b>Potenciador en imidazol 50 mM, cloruro de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM</b> |                                |       |
| Pirimidina 50 mM  | 326                            | 0,082 |
| 2-hidroxipirimidina 10 mM   | 320                            | 0,081 |
| 2-hidroxipiridina 10 mM   | 383                            | 1,001 |
| <i>N</i> -óxido de pirimidina   | 374                            | 0,098 |

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

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

Usando las soluciones de cromógeno DAB de la tabla 4, se realizó un ensayo en placa usando concentraciones variables del múltimero 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 de aumento o disminución de 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 redujo la concentración de HRP. La magnitud del cambio aumentó a concentraciones más bajas de HRP. Estos datos confirmaron los resultados de la tabla 4, en la que el imidazol proporcionó una  $V_{m\acute{a}x}$  aparente mayor en relación con la L-histidina. Este efecto se observó para la mayoría de las concentraciones.

**Tabla 5:** Influencia de las sales tamponantes y los potenciadores en la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente para DAB oxidada con HRP cuando se añade al kit de detección ultraView™.

| Sal base        | Potenciador | Concentración de HRP (µg) |      |      |      |     |      |      |      |      |
|-----------------|-------------|---------------------------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
|                 |             | 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   |

La densidad óptica de la DAB oxidada se controló a 455 nm. [Potenciadores: (A) = pirimidina 10 mM; (B) = 2-hidroxipirimidina 10 mM, cloruro de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM; (C) = 2-hidroxipiridina 10 mM, cloruro de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM; (D) = *N*-óxido de pirimidina 10 mM, cloruro de calcio 10 mM, ácido bórico 10 mM].

5

### Ejemplo 6

#### Tinción de tejido para ISH con potenciadores

10 La tinción de tejido para ISH se examinó usando soluciones de DAB potenciada. Los xenoinjertos de ratón HER-2 3 en 1 de las líneas celulares de carcinoma positivo a HER-2 CaLu3, ZR-75-1 y MCF7 se trataron con sonda de ADN de HER2 (VMSI 480-4495) y se tiñeron con la solución de cromógeno DAB ultraView™ o solución de cromógeno DAB potenciada que contenía L-histidina 10 mM (véanse las FIGS. 21-22). La L-histidina 10 mM aumentó el depósito de DAB en la tinción con ISH de células de carcinoma CaLu3 que tienen una sobreexpresión de HER2. El aumento del depósito de DAB fue marginal para las señales de ISH más fuertes, pero la intensidad de la señal para las señales de DAB más débiles se incrementó en todo el tejido. La misma observación se hizo con un depósito de DAB potenciada en IHQ.

15

### Ejemplo 7

20

#### Tinción de tejido para TSA con potenciadores

Se evaluó el depósito de DAB potenciada en una tinción de tejido para TSA-IHQ de bcl2 en tejido de amígdala. El antígeno bcl2 se tiñó con TSA usando depósito de TA-HQ durante 4 minutos después de una incubación de 16 minutos del Ac primario contra bcl2. El depósito de tiramida se realizó con y sin 2-hidroxipirimidina 10 mM. El depósito de DAB se realizó con la solución de cromógeno DAB ultraView™ o una solución de cromógeno DAB que contenía L-histidina 10 mM (véanse las FIGS. 23-26). La L-histidina 10 mM aumentó el depósito de DAB en el tejido.

25

En un estudio paralelo, el antígeno bcl2 se tiñó con TSA usando depósito de TA-HQ durante 4 minutos después de una incubación de 8 minutos del Ac primario contra bcl2 (véanse las FIGS. 27 y 28). La 2-hidroxipirimidina 10 mM aumentó el depósito de tiramida y, por tanto, aumentó el depósito de DAB. El porcentaje de células teñidas con DAB aumentó en zonas con baja expresión de antígeno bcl2.

30

### Ejemplo 8

35

#### Tinción con ribosonda 18s

Los tejidos de xenoinjerto CaLu-3 incluidos en parafina fijados con formol se montaron en portaobjetos Superfrost®, se desparafinaron y se recuperaron los antígenos usando desnaturalizante RiboClear™ (un componente del kit RiboMap®; Ventana® p/n 760-102) durante 12 minutos de incubación, 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 dos gotas (200 µl) de una sonda 18s de hebra de sentido o de antisentido con hapteno NP en un portaobjetos, se desnaturalizó a 80 °C durante 8 minutos y se hibridó a 65 °C durante 6 horas. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron 3 veces usando SSC 0,1x a 75 °C durante 8 minutos; cada sonda con hapteno NP se detectó usando 5 µg de un conjugado de anti-NP de ratón con HRP seguido de 100 µl de cada uno de un conjugado de tiramida-HQ de 55 µl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (componente del kit de DAB de ultraView™ de Ventana® p/n 760-500) y se incubaron durante 12 minutos. La tiramida-HQ depositada se detectó usando 0,5 µg de un conjugado de anti-HQ de ratón con HRP seguido de una gota de DAB (DAB 5,5 mM, Brij® 35 al 0,05 %, L-histidina 10 mM, 2-hidroxipiridina 10 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubando en el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó la DAB ultraView™ como referencia. Después de enjuagar los portaobjetos en el tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB de ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se taparon con el cubreobjetos y se observaron usando un microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestran en las FIGS. 29 y 30, respectivamente.

40

45

50

55

### Ejemplo 9

**Tinción de VPH**

Se montaron tejidos de xenoinjerto C33, HeLa y CaSki incluidos en parafina fijados con formol en portaobjetos Superfrost, se desparafinaron 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 tres gotas (300 µl) de tampón SISH Hyb (componente del kit de detección por SISH ultraView™ p/n 780-001) y tres gotas de sonda de VPH con hapteno DIG en un portaobjetos, se desnaturalizó a 75 °C durante 8 minutos y se hibridó 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 con hapteno DIG se detectó usando 3 µg de un conjugado de anti-DIG de ratón con HRP seguido de DAB (DAB 5,5 mM, Brij® 35 al 0,05 %, L-histidina 10 mM, 2-hidroxipiridina 10 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (componente del kit de DAB de ultraView™ de Ventana p/n 760-500) incubando en el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó la DAB ultraView™ como referencia. Después de enjuagar los portaobjetos en el tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB de ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se taparon con el cubreobjetos y se observaron usando un microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestra en las FIGS. 31 frente a 32, 33 frente a 34 y 35 frente a 36, respectivamente.

**Ejemplo 10****Tinción con DAB de CD20**

Se montó tejido de amígdala incluido en parafina fijado con formol en portaobjetos Superfrost, se desparafinó y se recuperó el antígeno usando reactivo en masa CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor de UV (un componente del kit de DAB ultraView™) en un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó 1 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 enjuagues con tampón de reacción, el anticuerpo contra CD20 se detectó usando 1 gota del conjugado de HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó en el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadió una gota de cada uno de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; L-histidina 10 mM; 2-hidroxipiridina 10 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los portaobjetos y se incubaron durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de enjuagar los portaobjetos en el tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB de ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se taparon con el cubreobjetos y se observaron usando un microscopio de campo claro. La comparación de la muestra tratada con potenciador y la muestra ultraView™ se muestra en las FIGS. 37 y 38, respectivamente.

**Ejemplo 11****Tinción con AEC de CD20 y Ki-67**

Se montó tejido de amígdala incluido en parafina fijado con formol en portaobjetos Superfrost, se desparafinó y se recuperó el antígeno usando reactivo en masa CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor (un componente del kit de AEC de Ventana® p/n 760-020) en un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó 1 gota del anticuerpo de ratón anti-CD20 (clon L-26; Ventana® p/n 760-2531) o de conejo anti-Ki67 (clon 30-9; Ventana® p/n 790-4286) en el portaobjetos y se incubó durante 16 minutos. Después de 2 enjuagues con tampón de reacción, el anticuerpo se detectó usando 1 gota del conjugado de HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó en el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadió una gota de una solución de potenciación que contenía L-histidina 50 mM de pH 6,5 y 2-hidroxipiridina 10 mM y se coincubó con una gota de cada uno de AEC y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó durante 8 minutos. Se usó un portaobjetos teñido con cromógeno AEC sin ninguna potenciación como referencia. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se dejaron secar al aire; se cubrieron 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 FIGS. 39 frente a 40, y 41 frente a 42, respectivamente.

**Ejemplo 12****Tinción con DAB de Bcl-2**

Se montó tejido de amígdala incluido en parafina fijado con formol en portaobjetos Superfrost, se desparafinó y se recuperó el antígeno usando reactivo en masa CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor de UV (un componente del kit de DAB ultraView™) en un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó 1 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 enjuagues con tampón de reacción, el anticuerpo contra bcl2 se detectó usando 1 gota del conjugado de HRP universal

ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó en el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadió una gota de cada uno de DAB (DAB 5,5 mM; Brij® 35 al 0,05 %; más cualquier combinación de potenciadores investigados en la tabla 3) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los portaobjetos y se incubaron durante 8 minutos. Se usó DAB ultraView™ como referencia. Después de enjuagar los portaobjetos en el tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB de ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se taparon con el cubreobjetos y se observaron usando un microscopio de campo claro.

### 10 Ejemplo 13

#### **Bcl-2 - tinción con DAB y TSA-HQ**

Se montó tejido de amígdala incluido en parafina fijado con formol en portaobjetos Superfrost, se desparafinó y se recuperó el antígeno usando reactivo en masa CC1 (Ventana® p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor de UV (un componente del kit de DAB ultraView™) en un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó 1 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 enjuagues con tampón de reacción, el anticuerpo contra bcl2 se detectó usando 1 gota del conjugado de HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó en el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadieron 100 µl de cada uno de tiramida-HQ 55 uM con y sin 2-hidroxipiridina 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (componente de kit de DAB ultraView™ de Ventana® p/n 760-500) y se incubaron durante 12 minutos. La tiramida-HQ depositada se detectó usando 0,5 µg del conjugado de anti-HQ de ratón con HRP seguido de una gota de DAB (DAB 5,5 mM, Brij® 35 al 0,05 %, L-histidina 10 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubando en el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó la DAB ultraView™ como referencia. Después de enjuagar los portaobjetos en el tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB de ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana® p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana® p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se taparon con cubreobjetos y se observaron usando un microscopio de campo claro (FIGS. 23-26).

### 30 Ejemplo 14

#### **Bcl-2 - tinción con DAB y TSA-NP**

Se montó tejido de amígdala incluido en parafina fijado con formol en portaobjetos Superfrost, se desparafinó y se recuperó el antígeno usando reactivo en masa CC1 (Ventana p/n 950-124). Después de la recuperación, se distribuyó una gota (100 µl) de inhibidor de UV (un componente del kit de DAB ultraView™) en un portaobjetos y se incubó durante 8 minutos. Después de la incubación del inhibidor, se distribuyó 1 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 enjuagues con tampón de reacción, el anticuerpo contra bcl2 se detectó usando 1 gota del conjugado de HRP universal ultraView™ (un componente del kit de DAB ultraView™) y se incubó en el portaobjetos durante 8 minutos. Se añadieron 100 µl de cada uno de tiramida-NP 5 uM con y sin 2-hidroxipiridina 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (componente del kit de DAB ultraView™ de Ventana® p/n 760-500) y se incubaron durante 12 minutos. La tiramida-HQ depositada se detectó usando 0,5 µg del conjugado de anti-NP de ratón con HRP seguido de una gota de DAB (DAB 5,5 mM, Brij® 35 al 0,05 %, L-histidina 10 mM, 2-hidroxipiridina 10 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubando en el portaobjetos durante 8 minutos. Se usó la DAB ultraView™ como referencia. Después de enjuagar los portaobjetos en el tampón de reacción, se aplicaron 100 µl de cobre (componente del kit de DAB de ultraView™) al portaobjetos durante 4 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron usando hematoxilina II (Ventana p/n 790-2208) y reactivo añil (Ventana p/n 760-2037). Los portaobjetos se deshidrataron usando alcoholes en gradiente, se taparon con cubreobjetos y se observaron usando un microscopio de campo claro (FIGS. 43-46).

En vista de los muchos modos de realización posibles a los que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, se debe reconocer que los modos de realización ilustrados son solamente ejemplos preferentes de la invención y no se deben adoptar como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

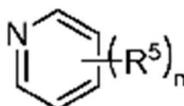
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento 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 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 manera que el marcador se deposite de forma proximal a la diana en presencia de un potenciador del depósito que tiene una fórmula



en la que R<sup>5</sup> es un resto que contiene un heteroátomo; n es 1-5,

en el que el sustrato enzimático se selecciona del grupo que consiste en un cromógeno y un conjugado de tiramida, o

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; y

detectar el marcador.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que poner en contacto la muestra con una solución de detección incluye oxidar enzimáticamente el sustrato enzimático usando un agente oxidante para formar el marcador, en el que oxidar enzimáticamente el sustrato enzimático usando un agente oxidante incluye reducir la solubilidad o la estabilidad del sustrato enzimático de manera que el sustrato enzimático se deposita como marcador.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la enzima es una oxidorreductasa o una peroxidasa.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el resto de unión específica comprende un anticuerpo o un ácido nucleico.

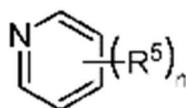
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que depositar el marcador de forma proximal a la diana en presencia del potenciador del depósito incluye el potenciador del depósito a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sustrato enzimático es un derivado de tiramina.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución de detección comprende además un acelerador seleccionado de un compuesto de heteroarilo, un ácido borónico, un compuesto fenólico o una combinación de los mismos, opcionalmente en el que el compuesto de 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-tetrametilpiperidin-1-óxido.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la solución de detección comprende además un tensioactivo no iónico seleccionado de un éter laurílico de polioxietileno que tiene una fórmula (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>23</sub>C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OH; monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, comprendiendo el monoalquilato entre 8 y 14 carbonos; un polioxietileno de alcohol secundario lineal que tiene una fórmula C<sub>12-14</sub>H<sub>25-29</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>, en la que x es igual a un número entero entre 2 y 12; y éter octilfenílico de polioxietileno, o en el que la solución de detección comprende además 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 además una sal que contiene metales del grupo I o el grupo II que tiene una fórmula MX<sub>2</sub> o MX en la que M es un metal del grupo I o el 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.

9. Una composición para detectar una diana en una muestra depositando de forma proximal un marcador, que comprende un potenciador del depósito que tiene una fórmula,



en la que  $R^5$  es un resto que contiene un heteroátomo; n es 1-5; y

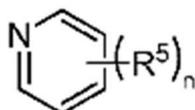
5 un sustrato enzimático, en la que el sustrato enzimático se selecciona de 1,3-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, tetrametilbencidina, una fluoresceína, un luminóforo, una cumarina, un colorante BODIPY, una resorufina, una rodamina, una tiramida o un derivado de los mismos.

10. La composición de la reivindicación 9, que comprende además un acelerador seleccionado de un compuesto de heteroarilo, un ácido borónico, un compuesto fenólico o una combinación de los mismos; un tensioactivo no iónico seleccionado de un éter laurílico de polioxietileno que tiene una fórmula  $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$ ; monoalquilato de polioxietileno (20) sorbitán, comprendiendo el monoalquilato 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 éter octilfenílico de polioxietileno y un antioxidante seleccionado de bisulfato de sodio, estannato de sodio, metabisulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

11. Un kit, que comprende

una enzima;

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



en la que  $R^5$  es un resto que contiene un heteroátomo; y n es 1-5, y

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.

12. El kit de la reivindicación 11, que comprende además un resto de unión específica, 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 kit de la reivindicación 12, en el que el resto de unión específica y la enzima están unidos entre sí.

14. El kit 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 picante o glutatión peroxidasa.

15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición de la reivindicación 9 o 10, o el kit de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el potenciador del depósito 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

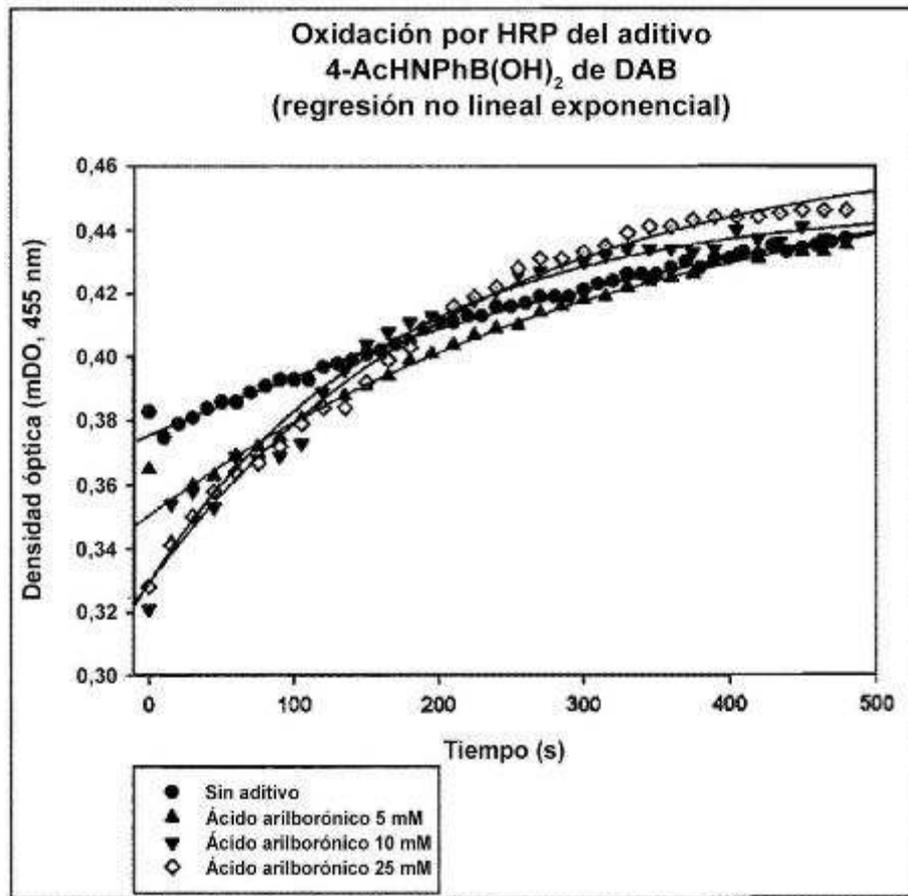


FIG. 4

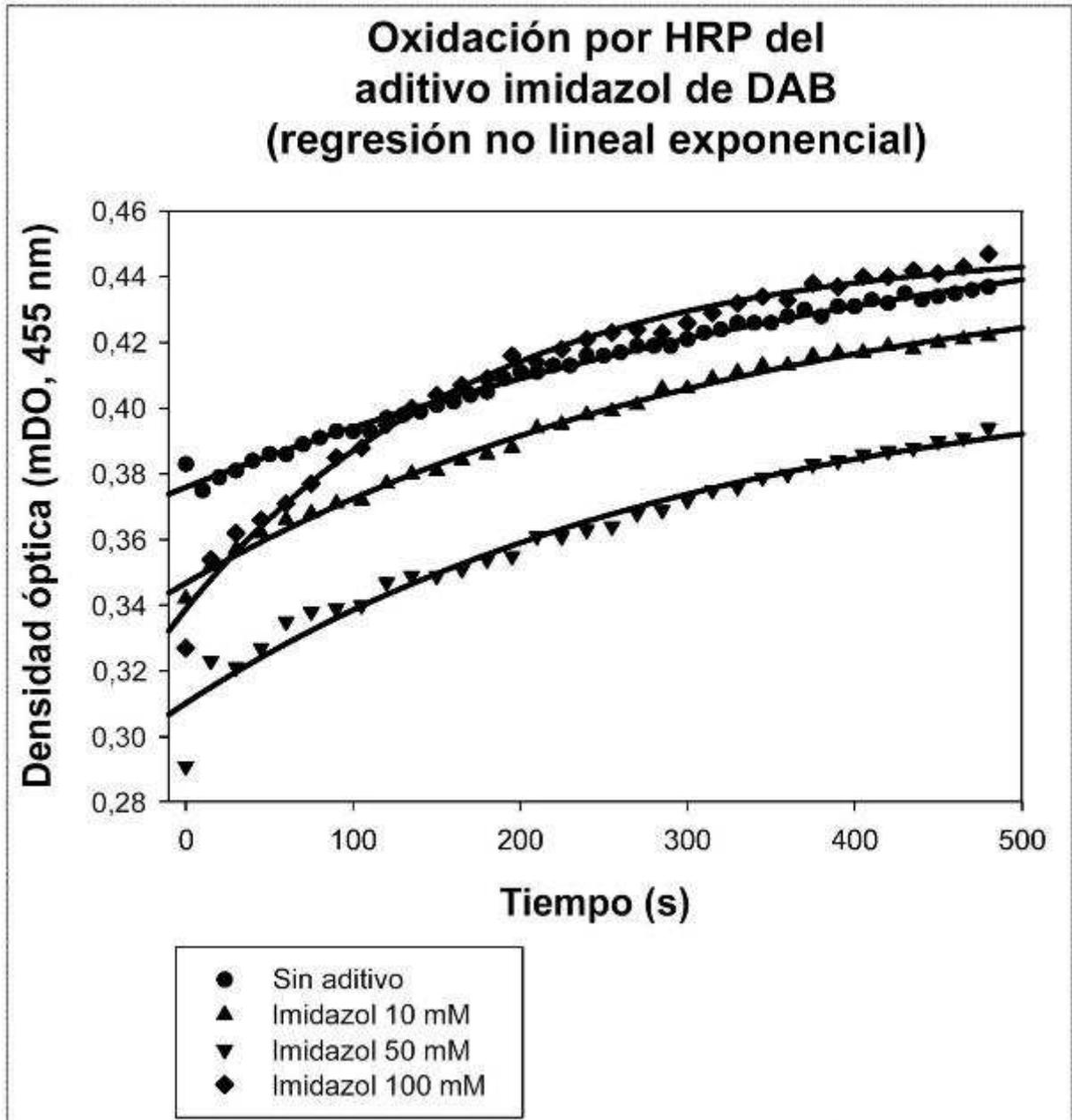
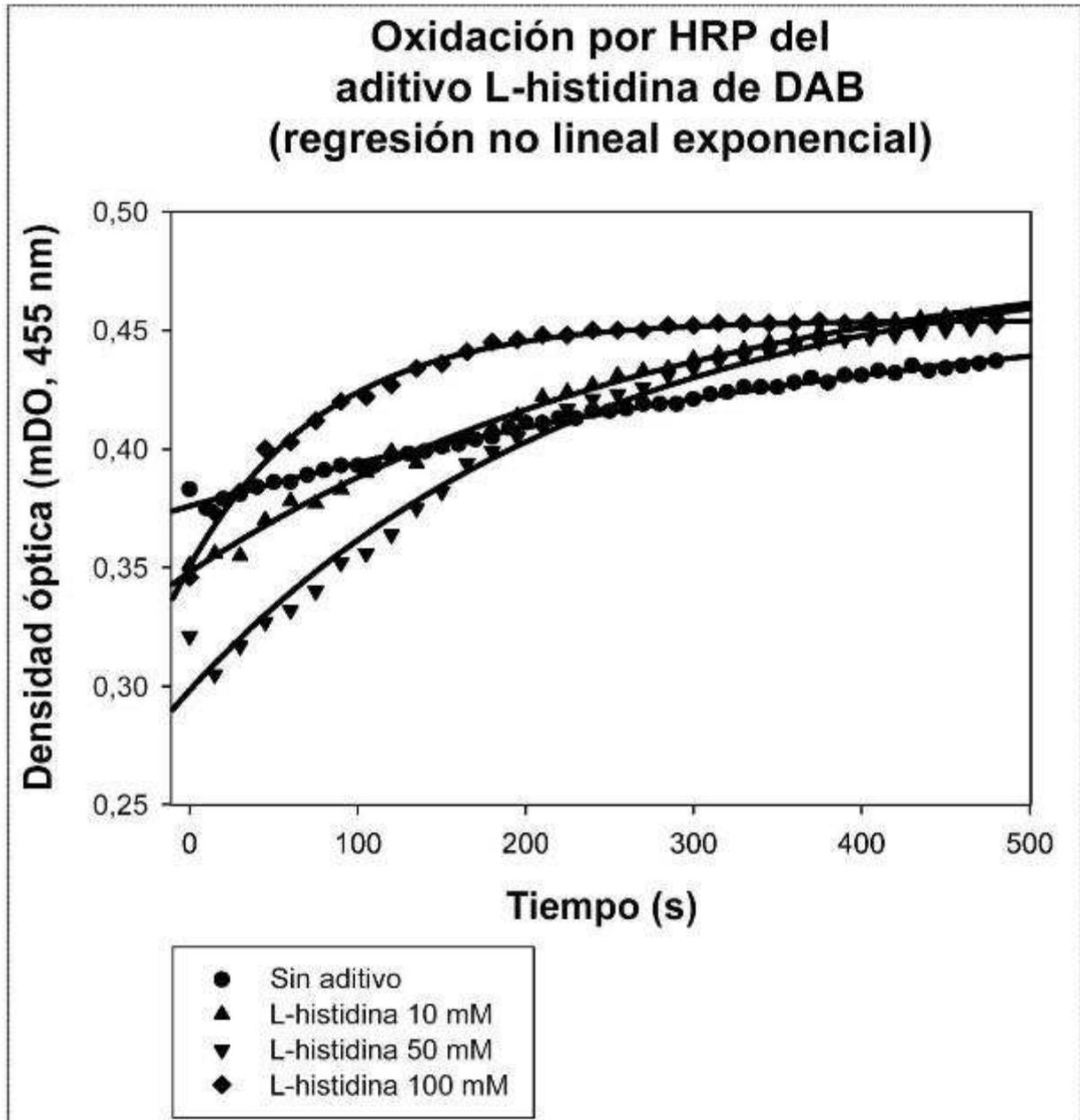


FIG. 5



**FIG. 6**

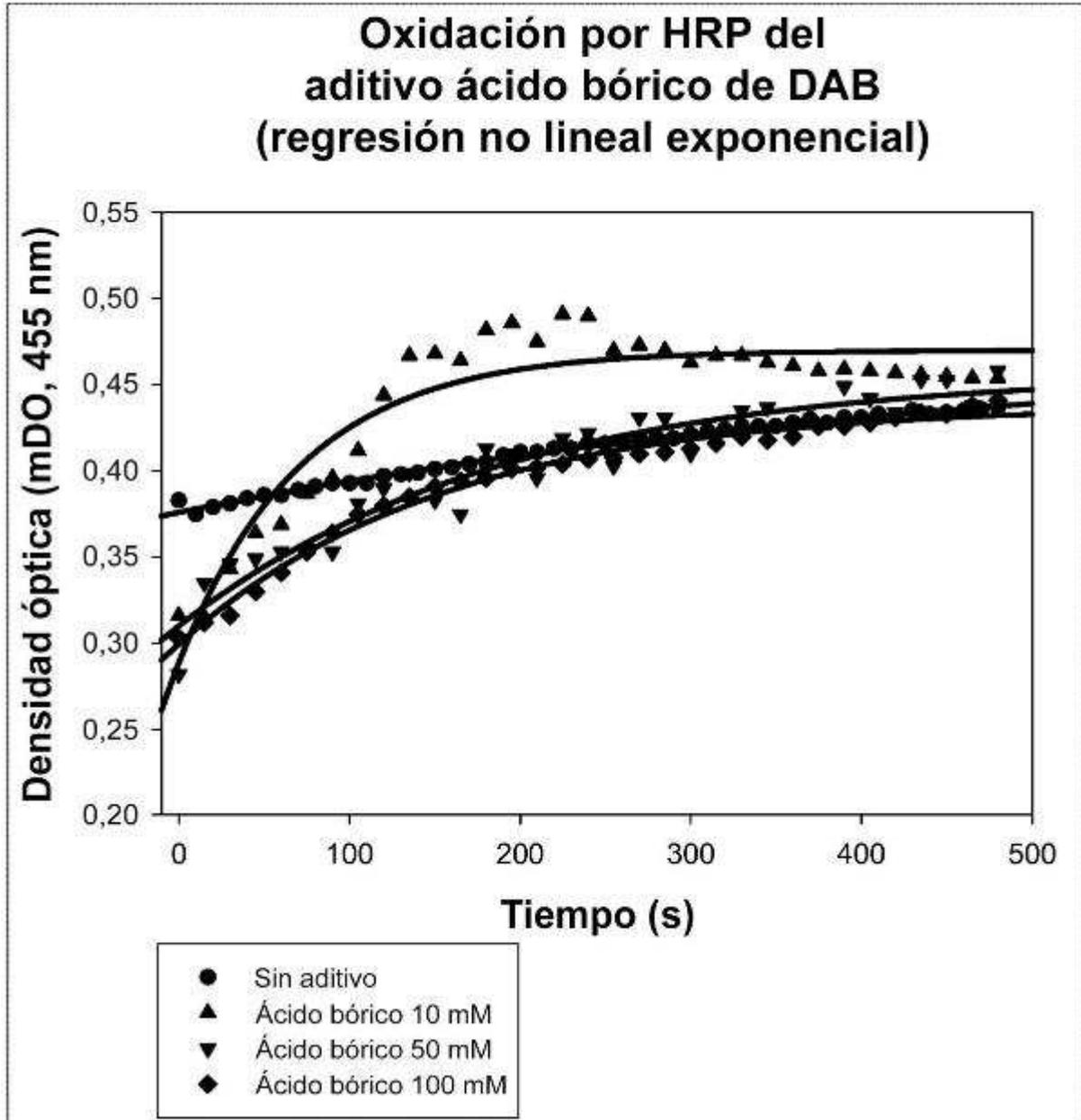


FIG. 7

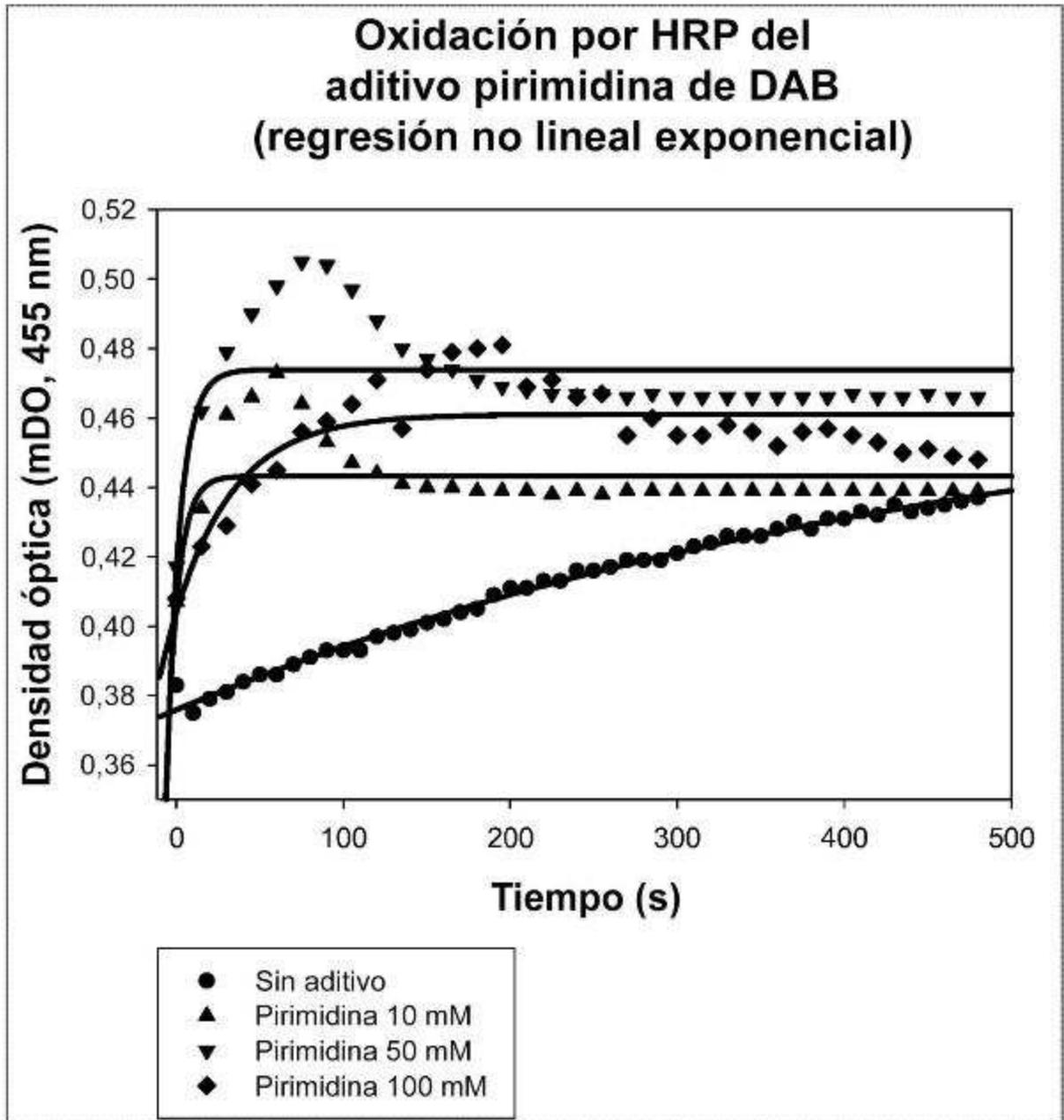
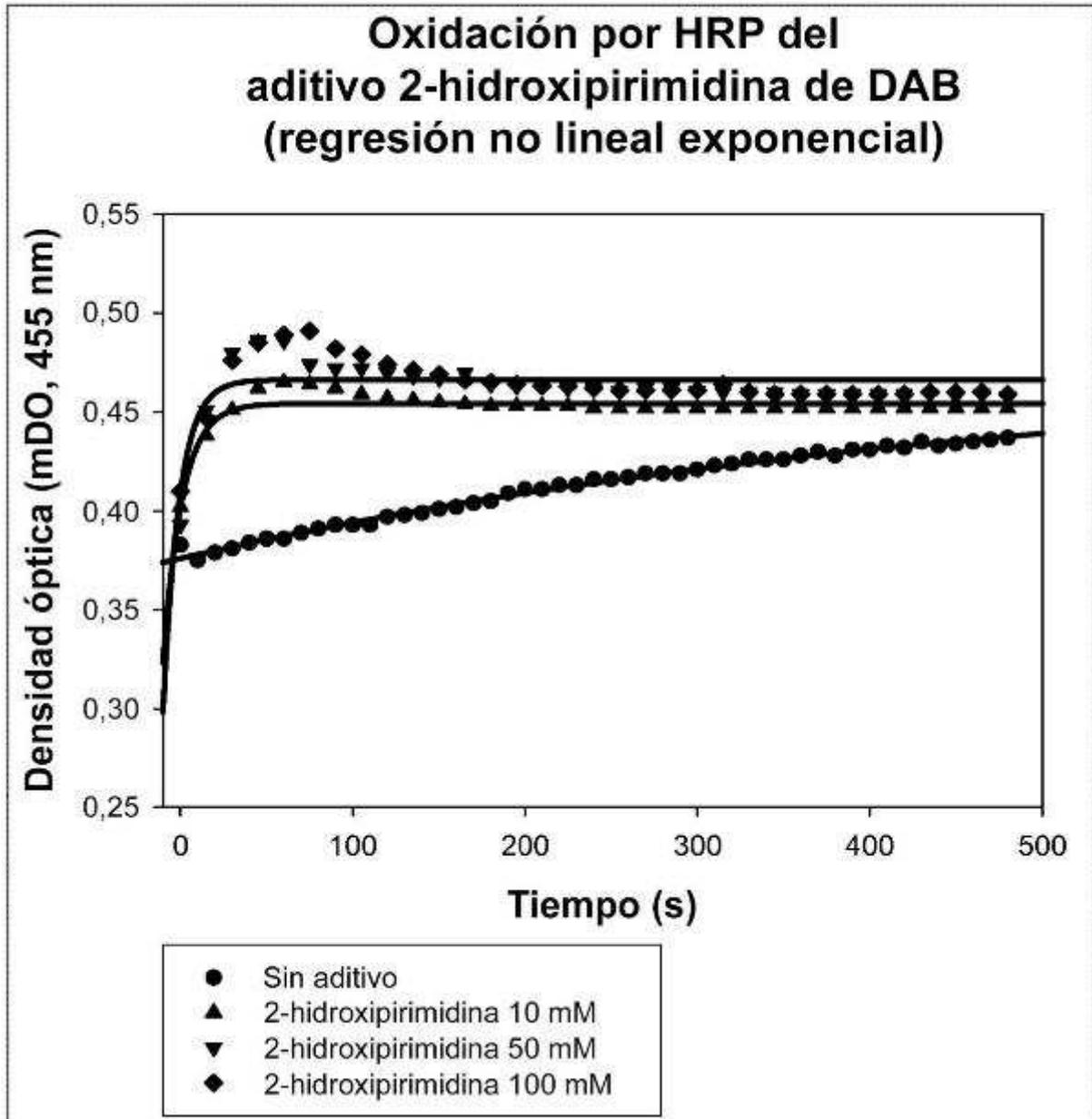
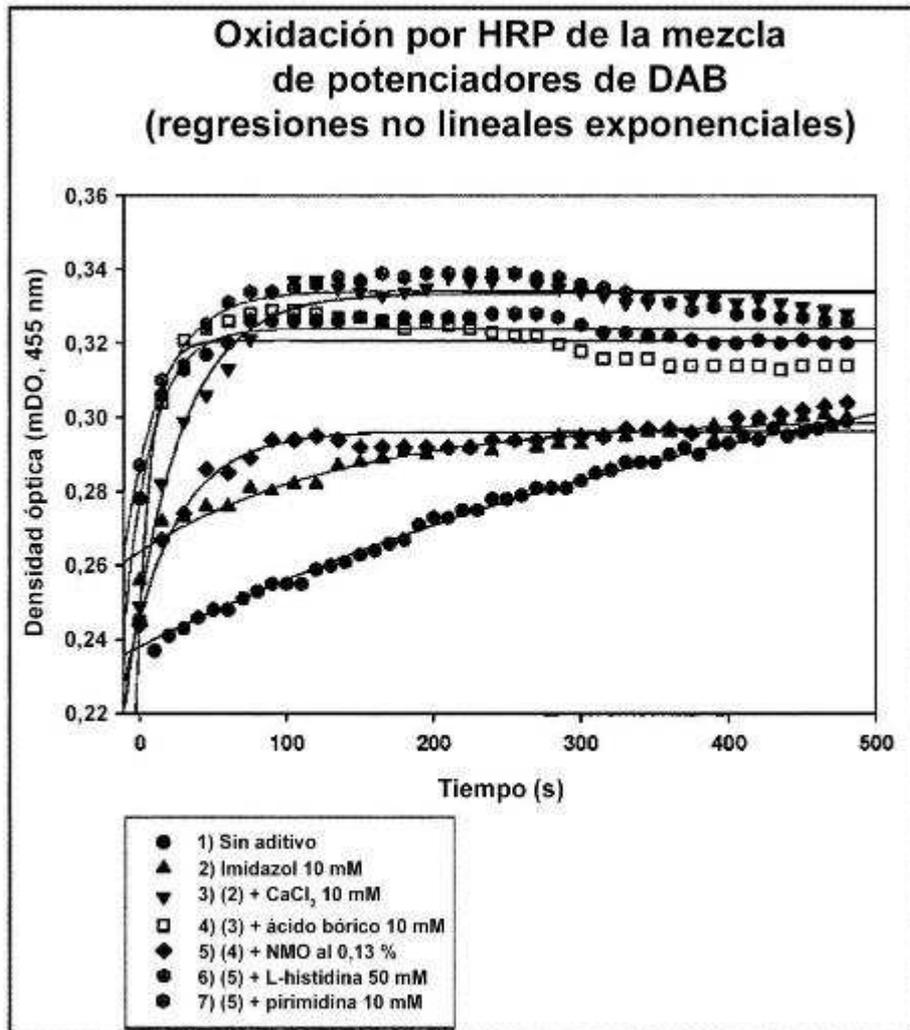
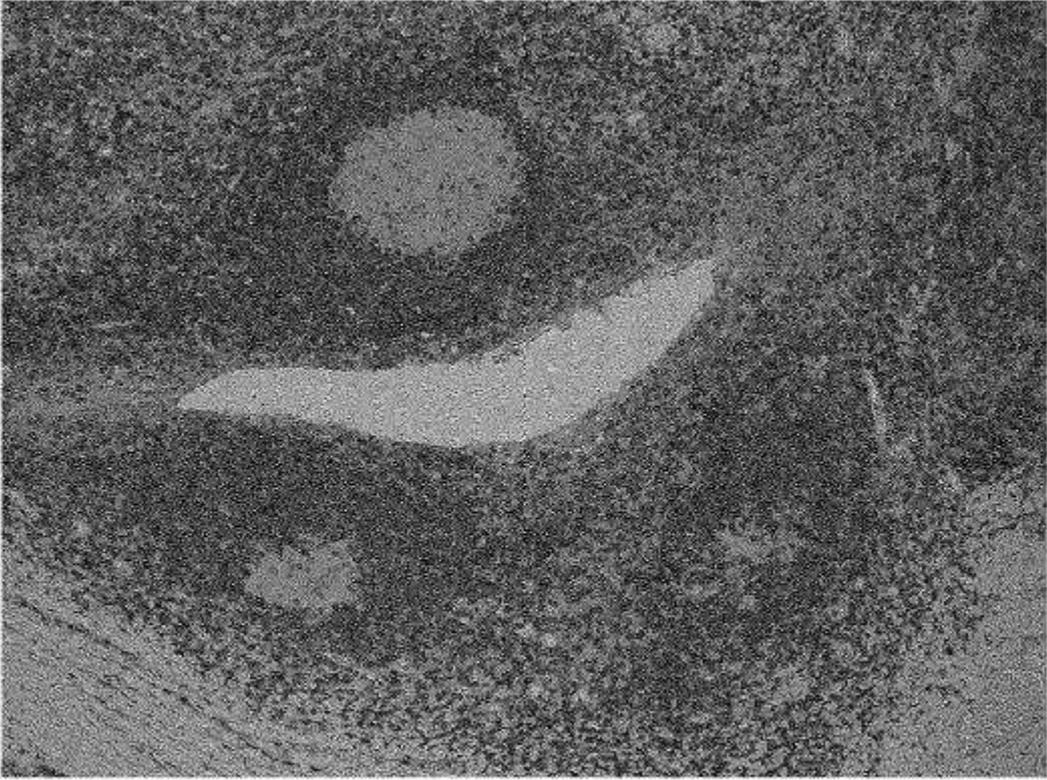


FIG. 8

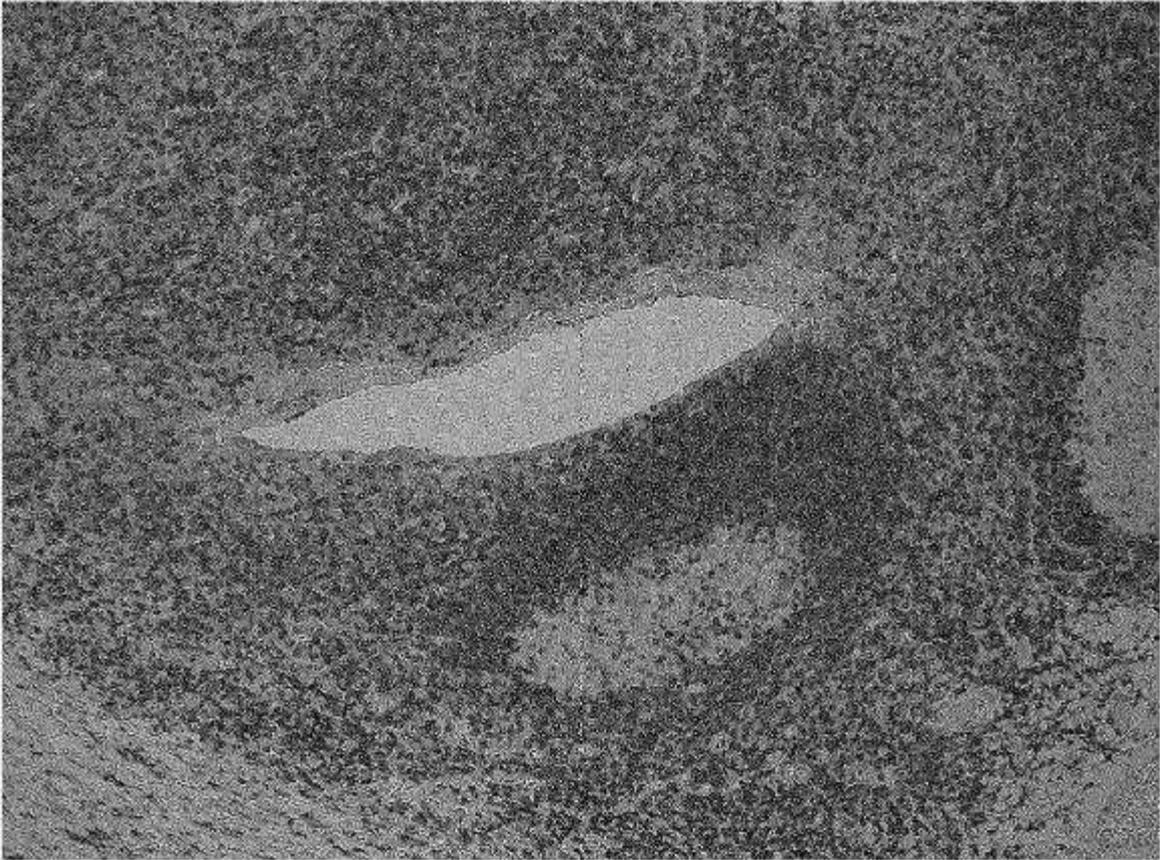




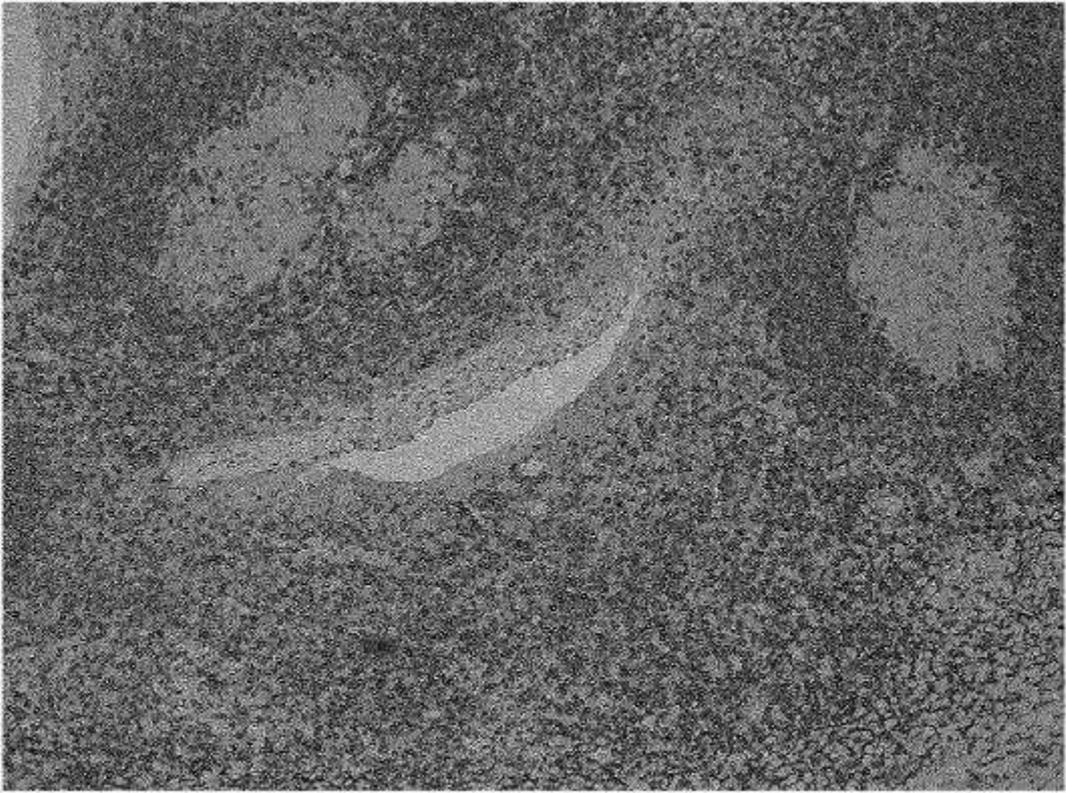
**FIG. 9**



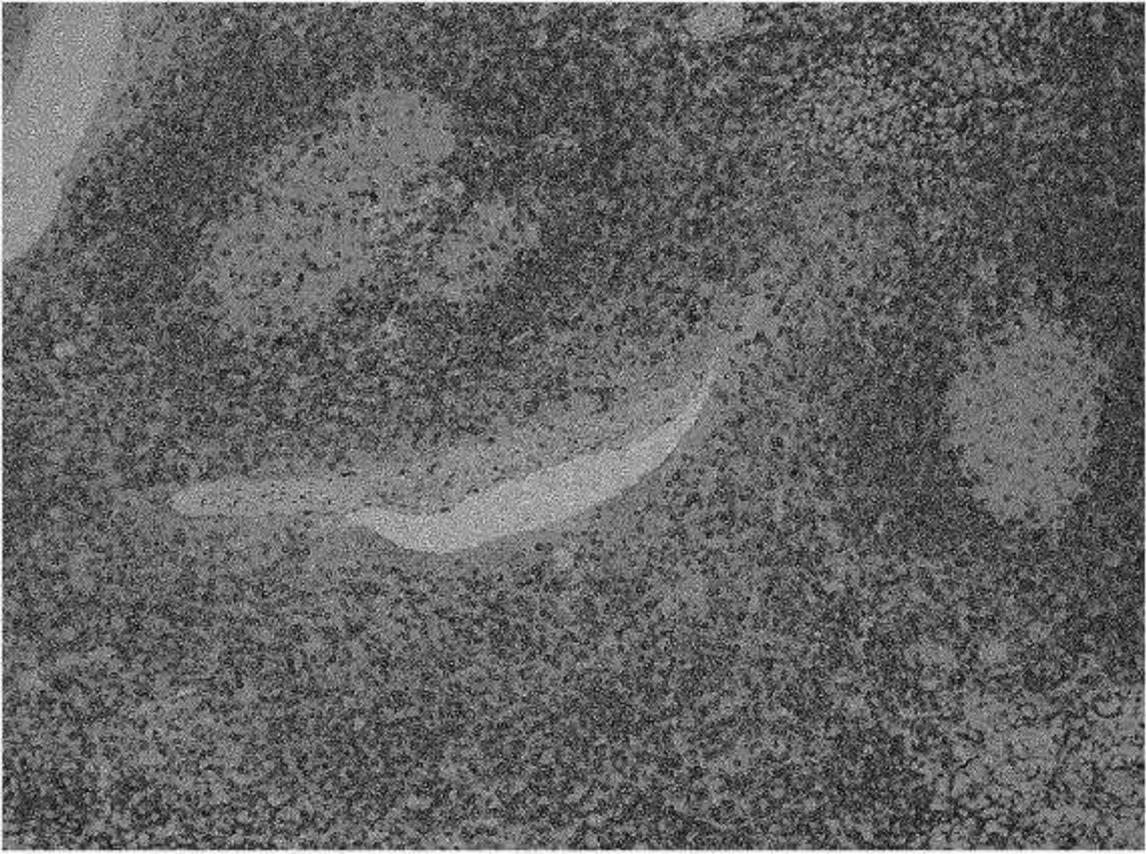
**FIG. 10**



**FIG. 11**

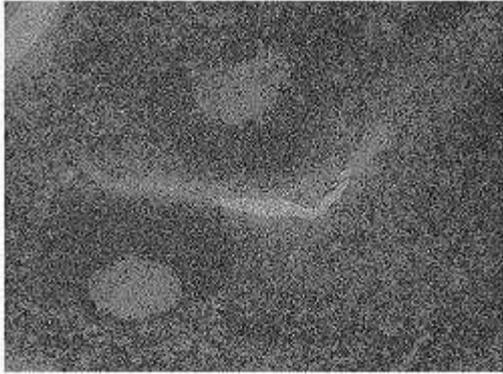


**FIG. 12**

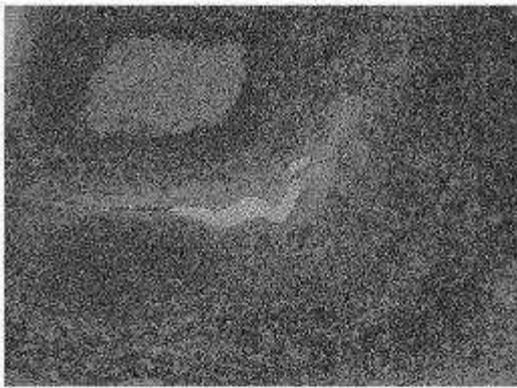
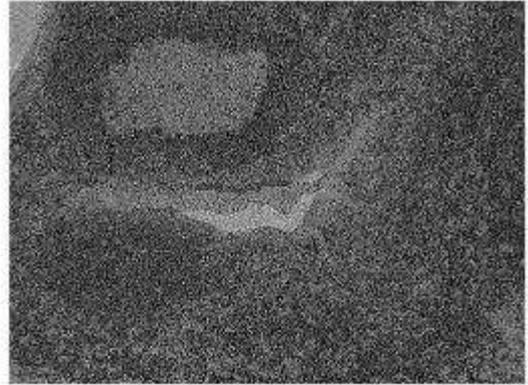


**FIG. 13**

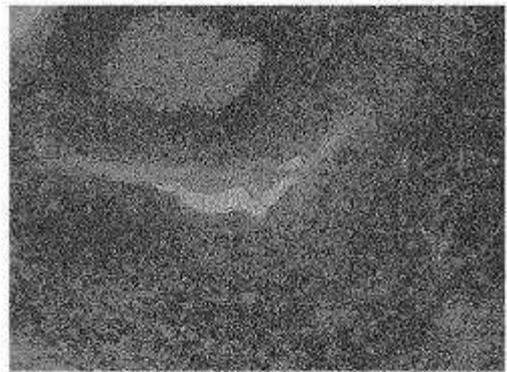
**FIG. 14**



**FIG. 15**



**FIG. 16**



**FIG. 17**

FIG. 18

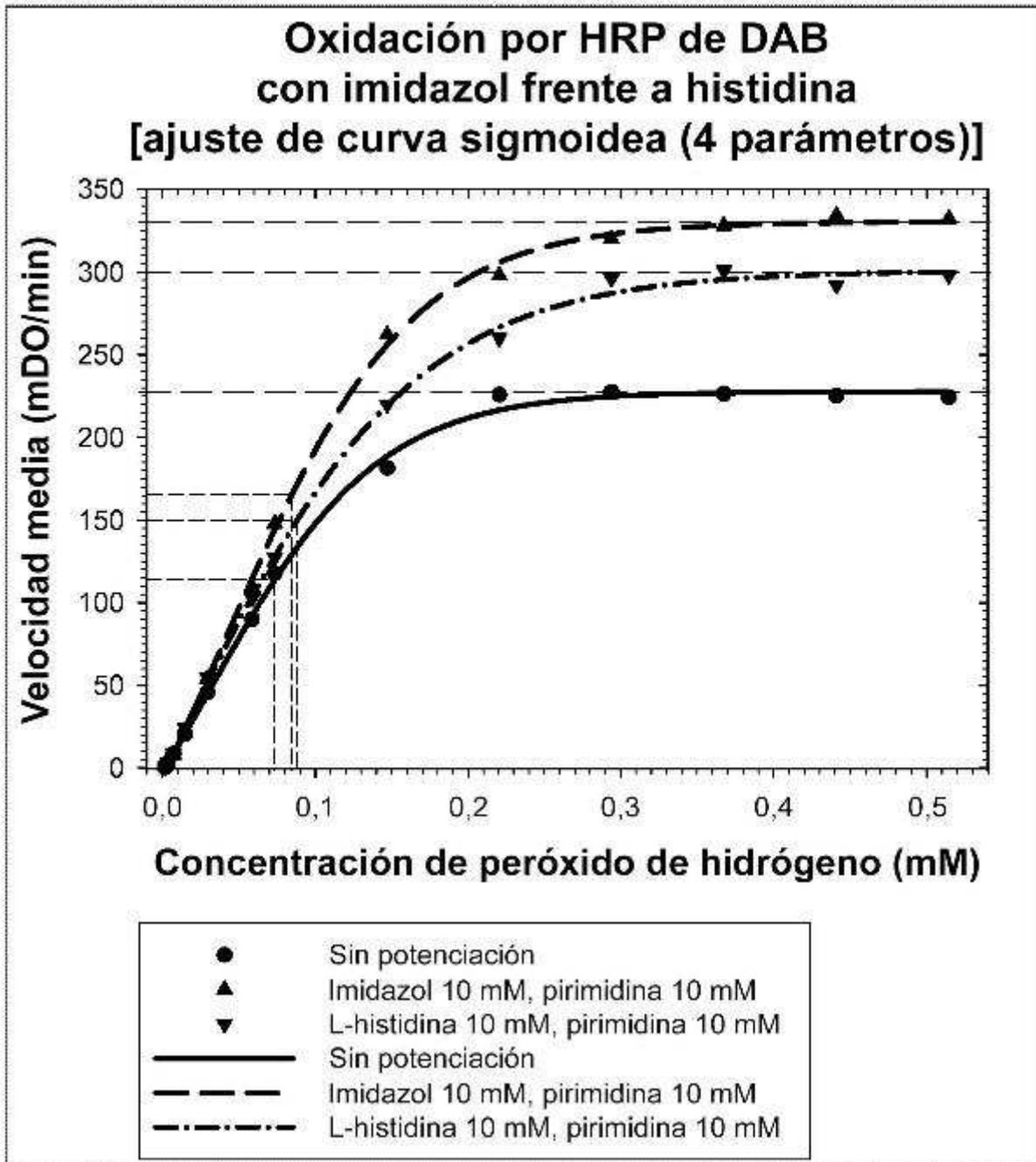
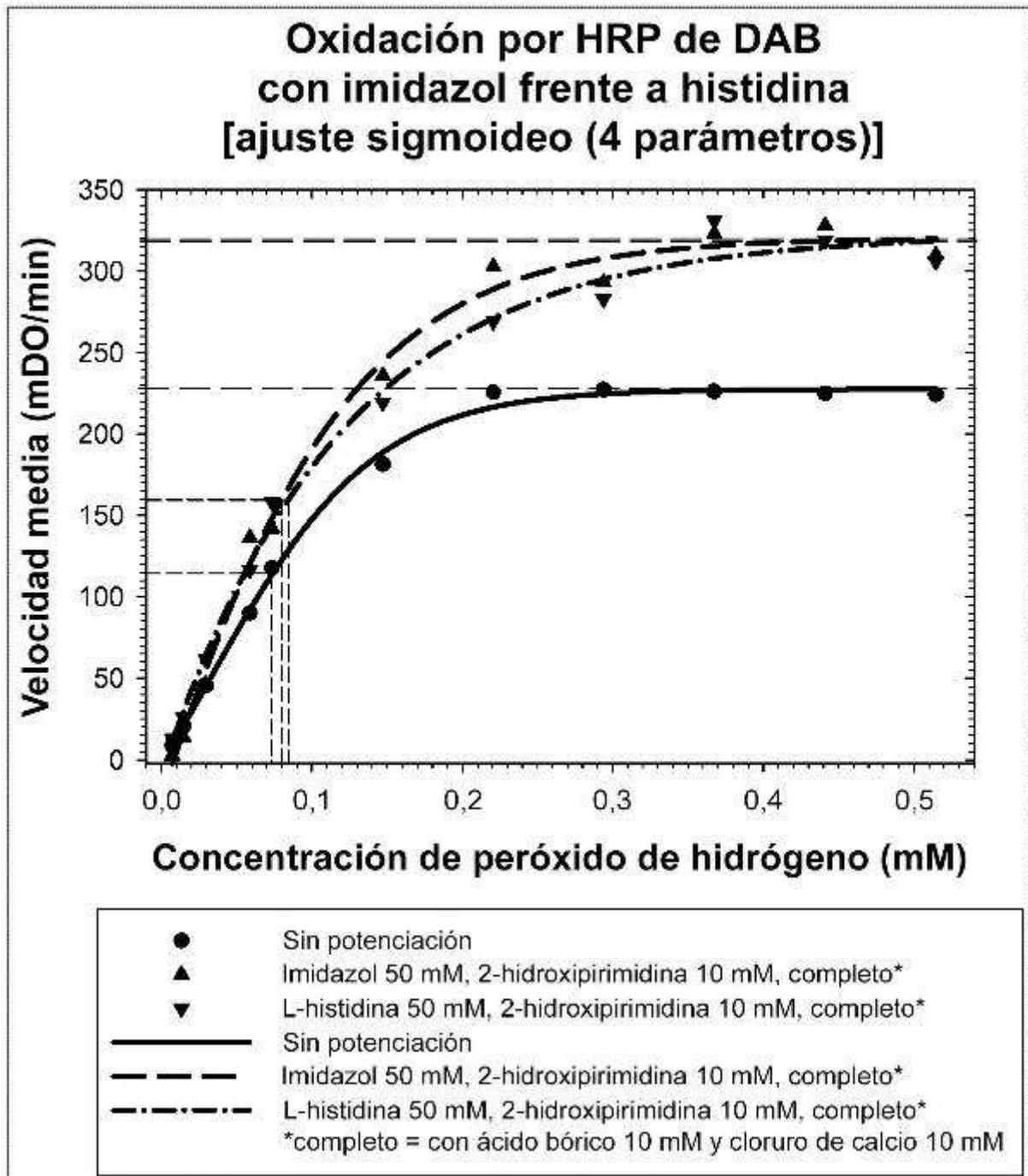
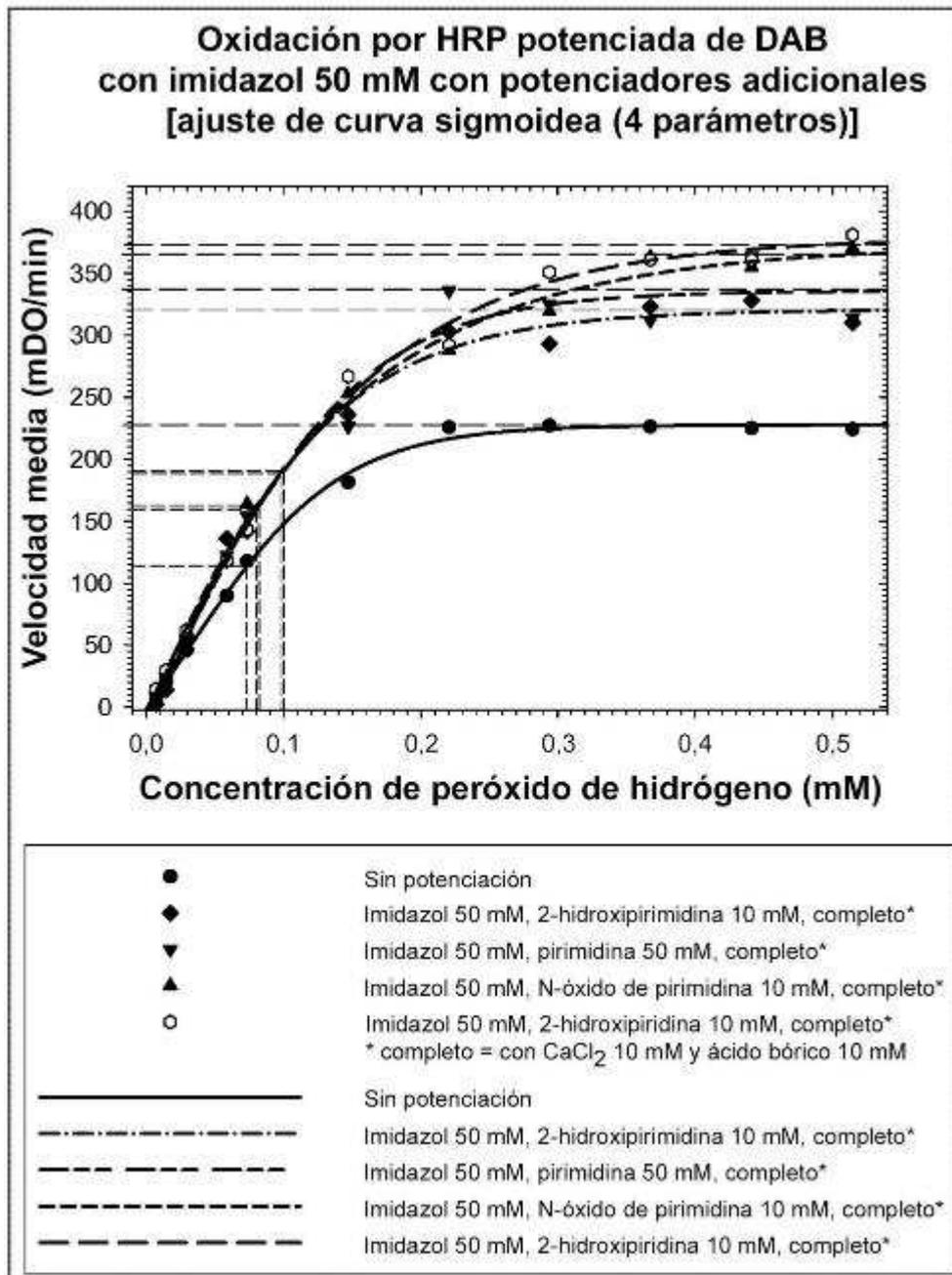
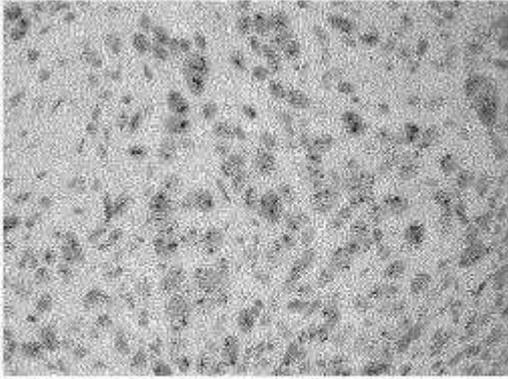


FIG. 19

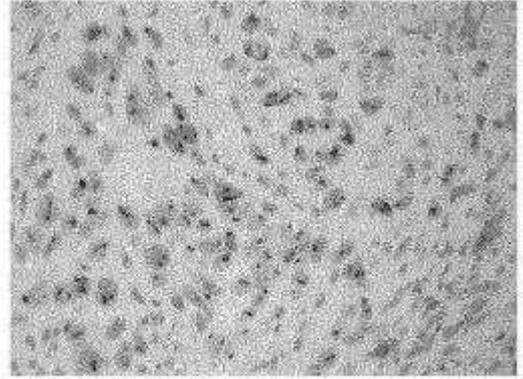




**FIG. 20**

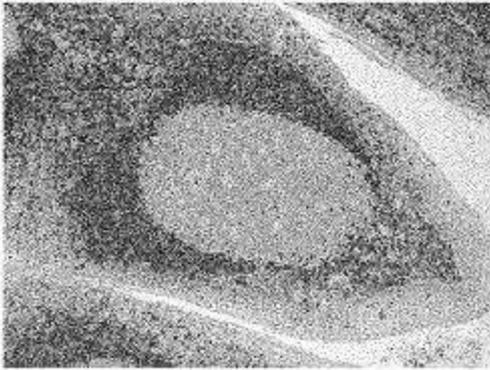


**FIG. 21**

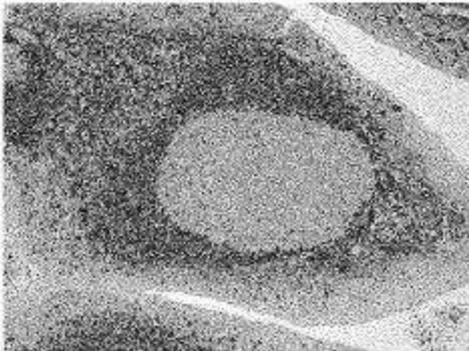
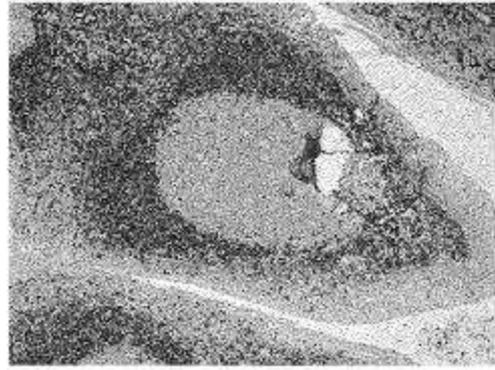


**FIG. 22**

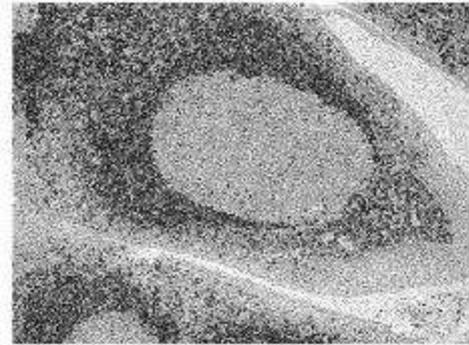
**FIG. 23**



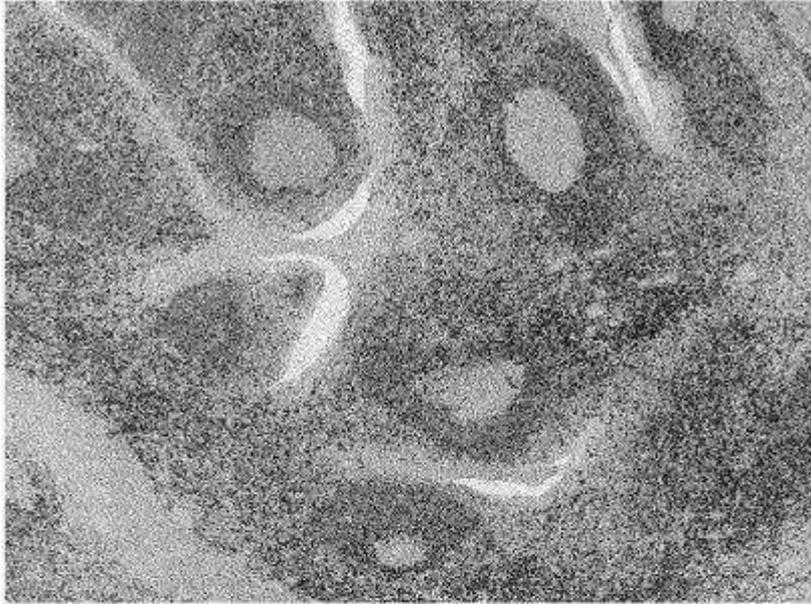
**FIG. 24**



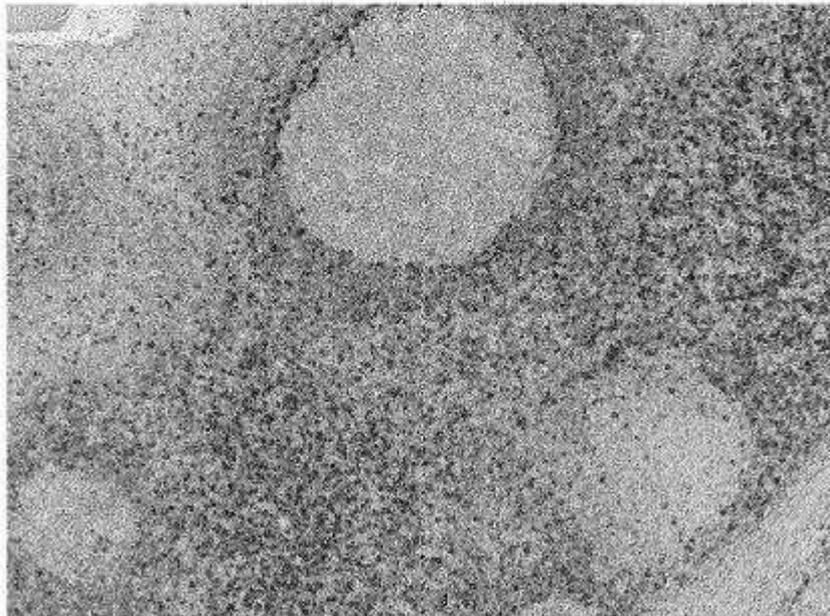
**FIG. 25**



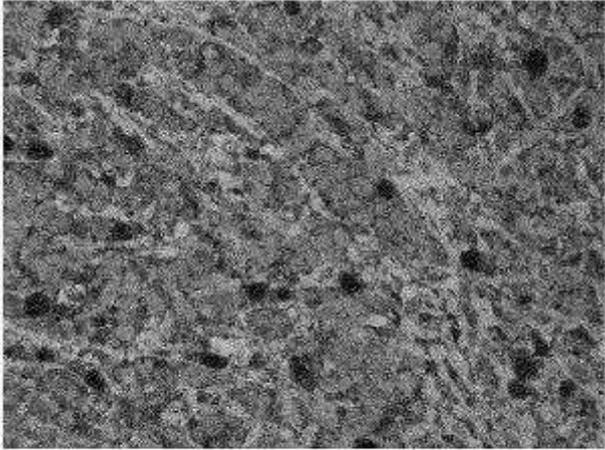
**FIG. 26**



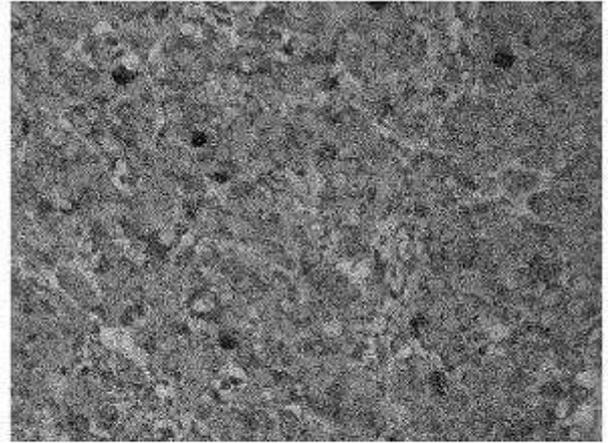
**FIG. 27**



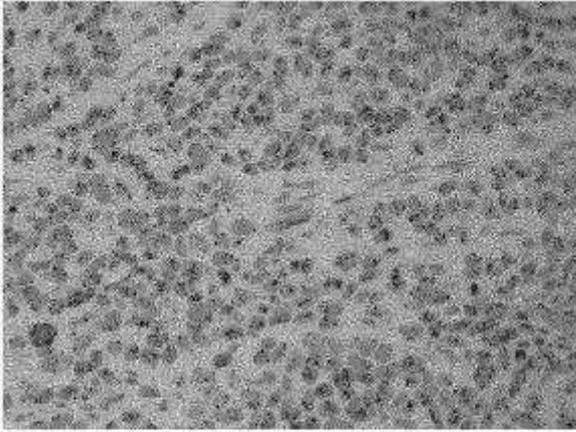
**FIG. 28**



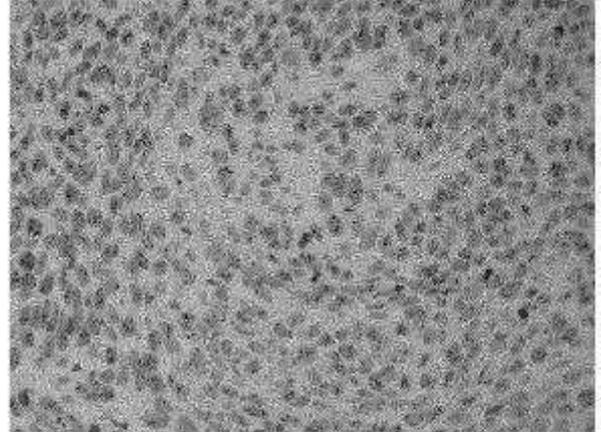
**FIG. 29**



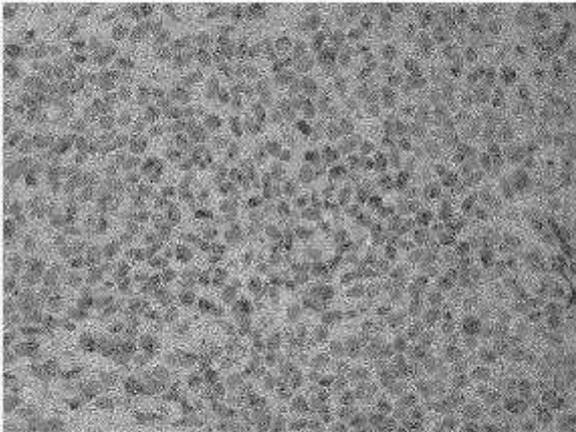
**FIG. 30**



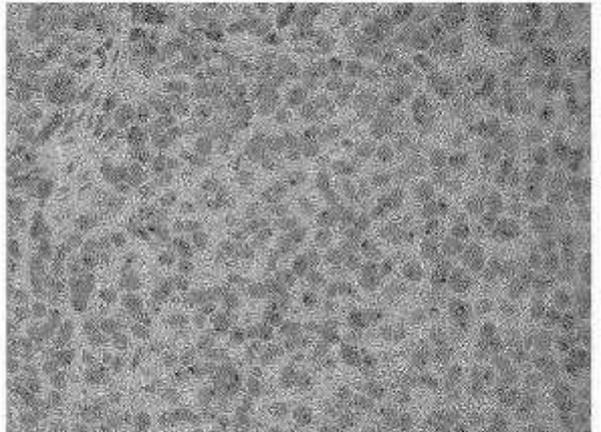
**FIG. 31**



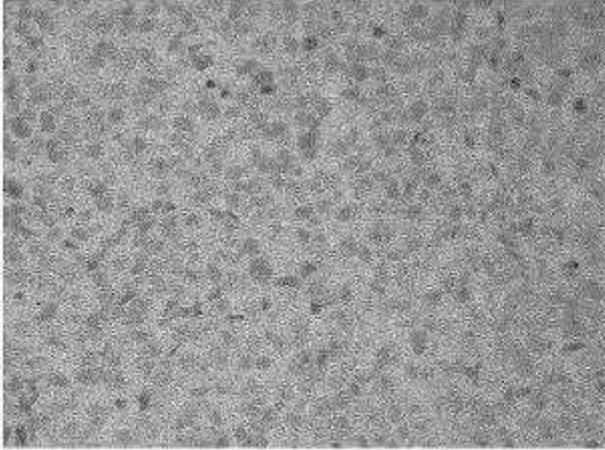
**FIG. 32**



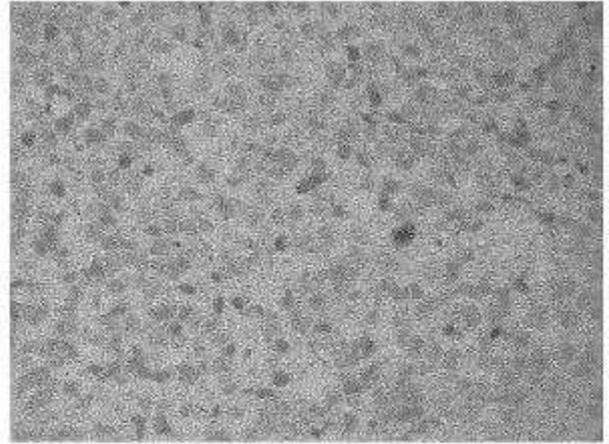
**FIG. 33**



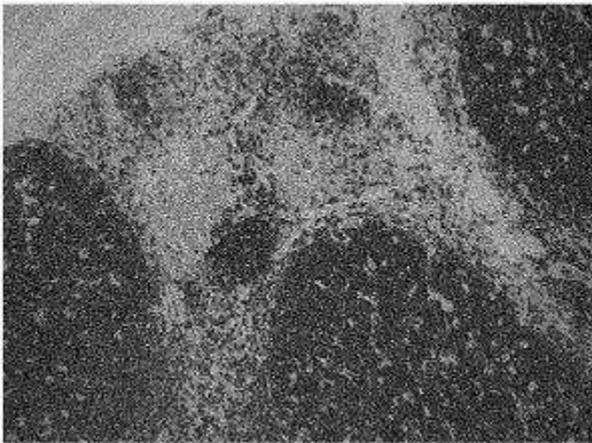
**FIG. 34**



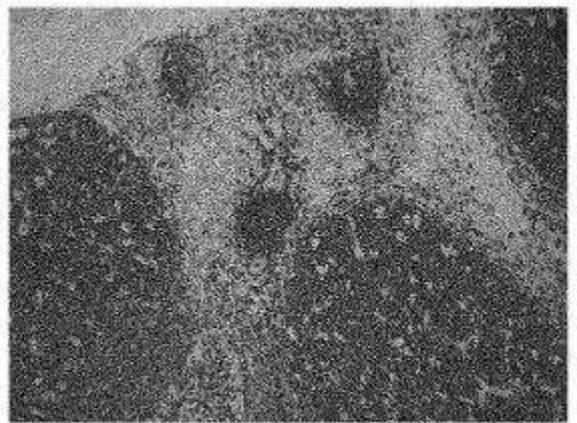
**FIG. 35**



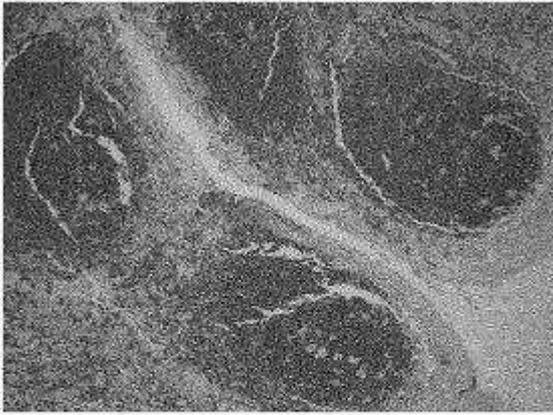
**FIG. 36**



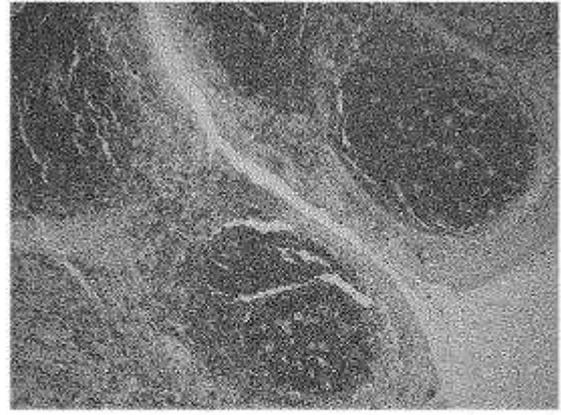
**FIG. 37**



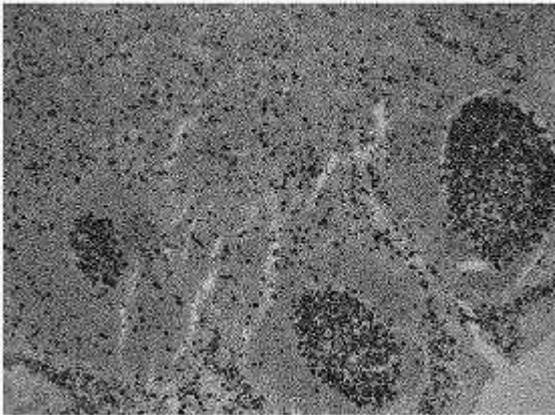
**FIG. 38**



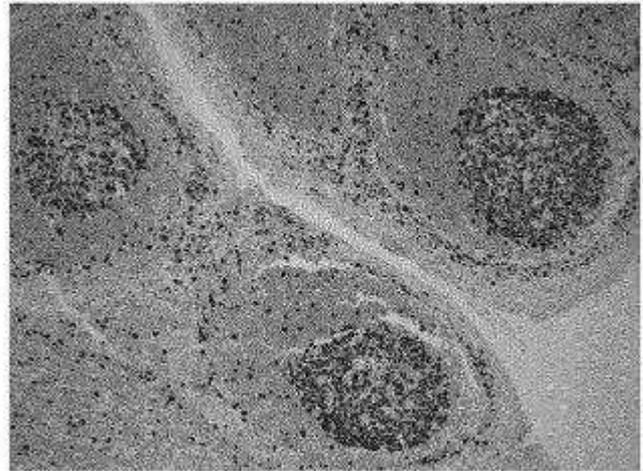
**FIG. 39**



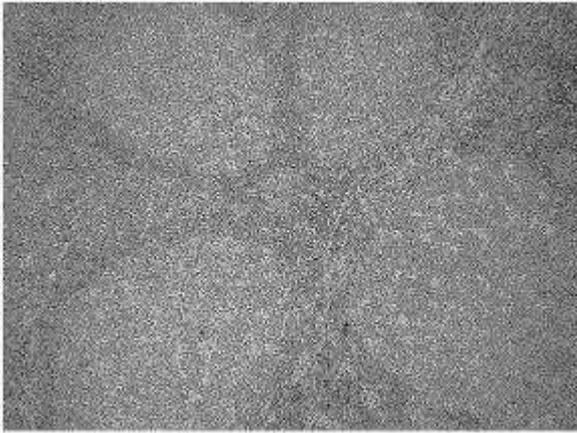
**FIG. 40**



**FIG. 41**



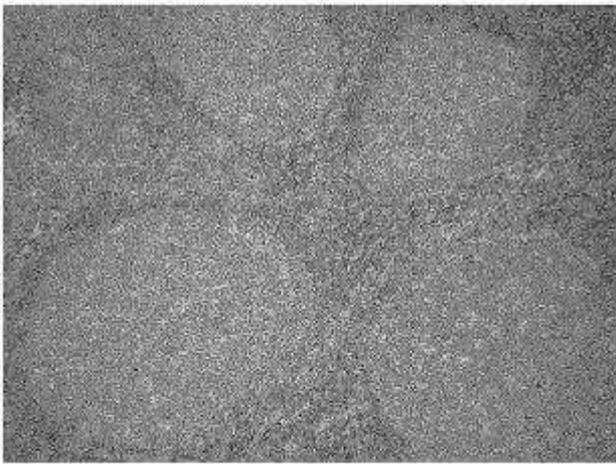
**FIG. 42**



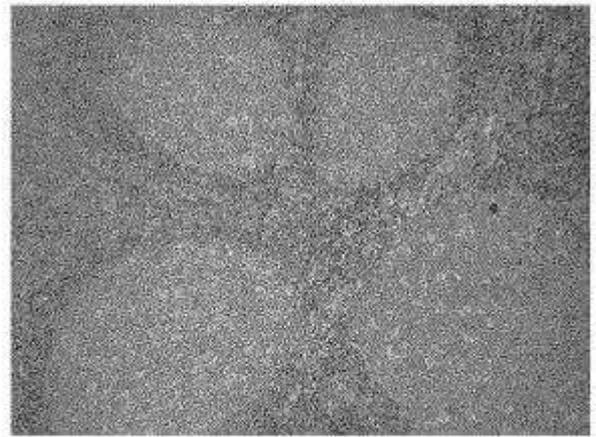
**FIG. 43**



**FIG. 44**



**FIG. 45**



**FIG. 46**