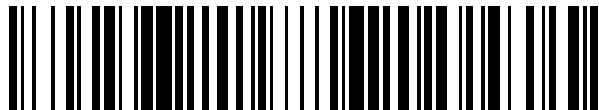


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 352**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 1/31** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016 PCT/EP2016/057955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016 E 16715850 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2022 EP 3283881**

54 Título: **Procedimientos y sistemas de inactivación de anticuerpo con base termoquímica**

30 Prioridad:

**13.04.2015 US 201562146610 P**

**25.11.2015 US 201562260147 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2023**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HUBBARD, ANTONY;**  
**JONES, TOBIN;**  
**TANG, LEI y**  
**ZHANG, WENJUN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 939 352 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos y sistemas de inactivación de anticuerpo con base termoquímica

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a procedimientos, composiciones y sistemas para inactivar y/o retirar entidades de unión proteínica (por ejemplo, anticuerpos) para ensayos tales como, pero sin limitarse a, ensayos de histoquímica, más en particular a tratamientos termoquímicos y composiciones para inactivación y/o retirada de entidades de unión proteínica (por ejemplo, anticuerpos).

**Antecedentes de la invención**

Muchos procedimientos de diagnóstico requieren la evaluación de múltiples dianas en la misma muestra. Aunque esto se realiza de forma relativamente fácil y rutinaria para técnicas moleculares, no se puede decir lo mismo para técnicas microscópicas que se basan en la visualización microscópica. Estas técnicas típicamente se basan en el uso de pares de anticuerpos primarios/secundarios para visualizar el analito diana. Sin embargo, la capacidad para teñir una sola muestra con múltiples pares de anticuerpos primarios/secundarios es bastante limitada, debido a la posibilidad de reactividad cruzada entre los anticuerpos secundarios y diferentes anticuerpos primarios.

Se han usado diversos procedimientos para ayudar a evitar dicha reactividad cruzada en ciclos de tinción posteriores. Por ejemplo, Nakane (J Histochem Cytochem, 1968, 16:557-60) usó un lavado ácido para retirar o eluir el complejo antígeno-anticuerpo primario-anticuerpo secundario-peroxidasa del primer ciclo de tinción después de que se formara el precipitado de DAB insoluble en agua. Sin embargo, esta técnica probablemente provocó deterioro en la calidad de la muestra tisular. Negoescu *et al.* (J Histochem Cytochem, 1994, 42:433-437) usaron un anticuerpo F(ab) monovalente policlonal secundario para bloquear el exceso de sitios de unión en el anticuerpo primario después del primer ciclo de tinción. Pero esta técnica requiere experimentos cuidadosamente controlados y requiere mucho tiempo, y la baja afinidad de los anticuerpos secundarios F(ab) hace que este enfoque sea limitante (Tornehave *et al.*, 2000, Histochem Cell Biol 113:19-23). Wang y Larsson (Histochemistry, 1985, 83:47-56) usaron tratamiento con vapor de formaldehído para inactivar los sitios de combinación de antígenos en los anticuerpos secundarios presentes en los complejos antígeno-anticuerpo unidos a tejido. Sin embargo, este procedimiento se asoció con el riesgo de hacer que los antígenos sensibles a formaldehído fueran indetectables.

Kolodziejczyk y Baertschi (J Histochem Cytochem, 1986, 34:1725-1729) usaron calor excesivo (por ejemplo, 130 °C) para retirar las inmunoglobulinas después de que se tomaran fotografías de una tinción. A continuación se realizó una nueva tinción y se tomaron nuevas fotografías y se compararon con el primer conjunto de imágenes. Esta técnica requiere varios días (por ejemplo, 5-7) de protección tisular entre los diferentes ciclos de tinción, y puede ser difícil predecir dónde se deben tomar las fotografías para determinar la colocalización con un antígeno posterior. Lan *et al.*, (J Histochem Cytochem, 1991, 43:97-102) usaron microondas para desnaturar moléculas de anticuerpo ya unidas para usar dos anticuerpos primarios y detectar antígenos nucleares y citoplasmáticos usando fosfatasa alcalina y sistemas de visualización enzimática HRP. Tornehave *et al.* (Histochem Cell Biol, 2000, 113:19-23), Toth y Mezey (J Histochem Cytochem, 2007, 55:545) y Osman *et al.* (Euro J Histochem, 2013, 57:e22) sugirieron aplicar microondas entre los ciclos de tinción actual y posteriores para permitir la tinción de inmunofluorescencia indirecta doble cuando los anticuerpos son de la misma especie. Sin embargo, este procedimiento no se ha evaluado ampliamente por su eficacia en la eliminación completa de las señales de tinción de reactividad cruzada, y se demostró que aplicar microondas destruyó algunos de los antígenos en muestras incluidas en parafina fijadas con formol (FFPE) (Bauer *et al.*, Histochem Cell Biol, 2001, 116:227-232; Osman *et al.*, Euro J Histochem, 2013, 57:e22). También se informó de la pérdida de fluorescencia para determinados fluoróforos con técnicas de aplicación de microondas (Toth y Mezey, 2007; Bauer *et al.*, 2001). Pirici *et al.* (J Histochem Cytochem, 2009, 57:567-575) mostraron que las técnicas de microondas son propensas a retirar algunas biopsias delicadas de portaobjetos de polilisina, especialmente si ya se han recuperado antígenos por un procedimiento previo mediado por calor.

Pirici *et al.* (J Histochem Cytochem, 2009, 57:567-575) y Gendusa *et al.* (J Histochem Cytochem, 2014, 62:519-531) estudiaron varios tampones con diferentes pH, osmolaridades, detergentes y propiedades desnaturizantes en un esfuerzo por eliminar el complejo de anticuerpo ya unido de ciclos de tinción IHQ previos. A pesar del interés por el uso de tampones para inactivar anticuerpos primarios de ciclos de tinción previos, no se descubrió que los tampones funcionaran de forma consistente. Por ejemplo, Pirici encontró que un tampón de glicina-HCl/SDS pH 2 era eficaz, pero Gendusa lo encontró ineficaz. Gendusa encontró que un tampón de 2-mercaptoetanol/SDS pH 6,75 era eficaz, pero Pirici lo encontró ineficaz. Además, se descubrió que algunos tampones decoloraban la tinción con H y E o reducían la tinción de las dianas de proteínas nucleares. Se determinó que otros tampones incluyendo agentes desnaturizantes eran biopeligrosos.

El documento WO 2009/117140 A2 divulga procedimientos para practicar la inmunohistoquímica y el análisis de hibridación *in situ*, incluyendo calentar una muestra entre poner en contacto la muestra con un primer y un segundo conjunto de más de una sonda basada en péptidos. Stack *et al.* (2014), Methods 70(1):46 proporciona una revisión

sobre inmunohistoquímica multiplexada, obtención de imágenes y cuantificación. El documento US 6 296 809 B1 enseña un aparato y procedimientos para teñir o tratar automáticamente múltiples muestras tisulares montadas en portaobjetos de microscopio incluyendo control de temperatura de portaobjetos individualizado.

5 Además, ninguno de estos procedimientos es compatible con los teñidores de portaobjetos automatizados existentes que tienen fuentes térmicas para portaobjetos, incluyendo los teñidores de portaobjetos automatizados de la serie Ventana BenchMark y Leica BOND. Los procedimientos requieren reactivos especializados que actualmente no se ofrecen en estas plataformas automatizadas, o bien los dispositivos no contienen fuentes  
10 térmicas que puedan alcanzar las temperaturas requeridas. Además, ninguno de los teñidores de portaobjetos automatizados disponibles comercialmente contiene un módulo que pueda calentar un portaobjetos por medio de microondas.

### Sumario de la invención

15 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Los modos de realización y descripciones que ya no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas se consideran simplemente como ejemplos adecuados para entender la invención.

A pesar de las pruebas, como se describe anteriormente, de que los tampones de inactivación de anticuerpo no eran buenos candidatos para la inactivación de anticuerpo, los autores de la invención han descubierto sorprendentemente un proceso termoquímico para implementar entre ciclos de tinción para ayudar a evitar la reactividad cruzada en ciclos de tinción posteriores. Por ejemplo, el tratamiento puede ayudar a reducir la cantidad de un anticuerpo (o complejo anticuerpo-anticuerpo, por ejemplo, un complejo anticuerpo primario-anticuerpo secundario) en la muestra y/o reducir la capacidad de dicho anticuerpo (o complejo anticuerpo-anticuerpo) de detectarse en ciclos de tinción posteriores (por ejemplo, promover la elución del complejo de anticuerpo, etc.). La muestra se puede poner en contacto primero con (o incubar con) una primera entidad de unión proteínica (PBE) exógena, por ejemplo, un anticuerpo, de manera que dé como resultado el depósito de la PBE en las proximidades de su diana. A continuación, la muestra se puede poner en contacto con (o incubarse con) reactivos de manera que dé como resultado el depósito específico de un resto detectable en las proximidades de la PBE. A continuación, la muestra se puede tratar con un procedimiento/proceso termoquímico (procedimiento de termoinactivación) para reducir la capacidad de la PBE de detectarse además en la muestra (por ejemplo, para eluir la PBE de la muestra, para desnaturalizar la PBE en la muestra, etc.).

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento automatizado de acuerdo con la reivindicación 1.

35 El procedimiento o proceso termoquímico (procedimiento de termoinactivación) de la presente invención comprende poner en contacto una muestra en un portaobjetos con un volumen de solución que comprende un tampón citrato con un pH de 5 a 7 y calentar el portaobjetos y la muestra y la solución que comprende el tampón por medio de calentar una fuente térmica (por ejemplo, una almohadilla térmica). La fuente térmica puede estar muy próxima al portaobjetos (por ejemplo, en contacto directo o contacto casi directo con el portaobjetos). Calentar la fuente térmica calienta eficazmente el portaobjetos, la muestra y el tampón (por ejemplo, elevando la temperatura de una primera temperatura a una segunda temperatura). La fuente térmica se calienta (por ejemplo, a una tasa particular, por ejemplo, una tasa lenta, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8 grados Celsius por minuto a aproximadamente 12 a 15 grados Celsius por minuto) de una temperatura de fuente térmica inicial (por ejemplo, de 18 °C a 42 °C) a una temperatura de fuente térmica diana (o por encima de la temperatura de fuente térmica diana), por ejemplo, de 80 °C a 98 °C, en la que la temperatura de fuente térmica diana (o la temperatura que está por encima de la temperatura de fuente térmica diana) es menor que el punto de ebullición de la solución que comprende el tampón. La fuente térmica se puede mantener a la temperatura de fuente térmica diana (o la temperatura por encima de la temperatura de fuente térmica diana) durante un período de tiempo particular.

50 El volumen de solución que comprende el tampón, que se deposita sobre la muestra/portaobjetos, puede estar en el intervalo de aproximadamente de 500 µl a aproximadamente de 2 a 4 ml. Este volumen proporciona una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 5 µl/cm<sup>2</sup> a 500 µl/cm<sup>2</sup> de cobertura de tampón (por ejemplo, el volumen de solución que cubre esa área del portaobjetos). En comparación con los procedimientos de sobremesa que presentan el remojo de portaobjetos en grandes volúmenes de tampones calientes, el volumen de solución usado en la presente invención es relativamente pequeño. Se cree ampliamente en la industria que un pequeño volumen como el de la presente invención usado cuando se calienta un portaobjetos y una muestra a una temperatura de muestra diana durante un período de tiempo (por ejemplo, a una tasa lenta) presentaría problemas que afectarían a la capacidad para inactivar y/o retirar entidades de unión proteínica (por ejemplo, anticuerpos) como tales por hacer que el sistema sea ineficaz. Por ejemplo, el proceso de calentamiento puede promover demasiada evaporación del volumen de solución, lo que afectaría a la capacidad de eluir el anticuerpo no deseado eficazmente (por ejemplo, el anticuerpo se podría agregar en un volumen pequeño). Sin embargo, se descubrió sorprendentemente que se podía usar un pequeño volumen en este proceso para inactivar y/o retirar las entidades de unión proteínica no deseadas (por ejemplo, anticuerpos), permitiendo detectar al menos dos dianas en la misma muestra en un solo sustrato sólido.

La presente invención presenta procedimientos automatizados para detectar al menos dos dianas en la misma muestra en un solo sustrato sólido. Como se analiza previamente, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra con una primera entidad de unión proteínica exógena (PBE) de manera que dé como resultado el depósito de la PBE en las proximidades de su diana. Por ejemplo, esto puede comprender incubar la muestra con un anticuerpo primario. El procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con reactivos de manera que dé como resultado el depósito específico de un resto detectable en las proximidades de la PBE. Por ejemplo, esto puede comprender incubar la muestra con un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo secundario específico para la especie del anticuerpo primario, para una marca en el anticuerpo (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.), etc. El anticuerpo secundario se puede marcar, por ejemplo, con un resto detectable. El anticuerpo secundario/resto detectable se puede depositar en las proximidades de la PBE).

El procedimiento comprende además tratar la muestra para reducir la capacidad de la primera PBE para detectarse además en la muestra. La muestra se pone en contacto con un volumen de solución que comprende un tampón citrato con un pH de 5 a 7 y el sustrato sólido se pone en contacto con (o se expone a) una fuente térmica (por ejemplo, una almohadilla térmica). La FIG. 1A muestra un ejemplo de un sustrato sólido (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) con una muestra, en el que el sustrato sólido está encima de una fuente térmica (por ejemplo, una almohadilla térmica). Un volumen de solución que comprende un tampón está encima de la muestra en el sustrato sólido. El sentido del calor puede ser desde la fuente térmica al sustrato sólido/muestra a la solución que comprende el tampón.

El tampón comprende un tampón citrato. La solución que comprende el tampón está a una temperatura de tampón inicial (que está por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón) antes de que la fuente térmica caliente la solución que comprende el tampón a una segunda temperatura de tampón. La fuente térmica se calienta de una temperatura de fuente térmica inicial a al menos una temperatura de fuente térmica diana (que está por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón) durante un período de tiempo (véase la FIG. 1B). Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que debido a que la fuente térmica está en contacto directo o bien muy próxima al sustrato sólido (por ejemplo, un portaobjetos) con la muestra, la fuente térmica puede calentar el portaobjetos y la muestra (y la solución que comprende el tampón) a una temperatura similar a la de la fuente térmica. Como se analiza previamente, el calor de la fuente térmica calienta el sustrato sólido/muestra, y el calor del sustrato sólido/muestra calienta la solución que comprende el tampón.

El procedimiento comprende además repetir las etapas anteriores con una segunda PBE (y opcionalmente una tercera PBE, una cuarta PBE, una quinta PBE, etc.) y repetir las etapas de tratamiento entre incubaciones con una PBE. No es necesario realizar el tratamiento después de la última incubación con PBE. Cada resto detectable se puede detectar (por ejemplo, visualizar) en la muestra en la localización que corresponde a la localización diana de la PBE. En algunos modos de realización, la muestra se lava (una vez, dos veces, tres veces, más de tres veces) después de cada tratamiento termoquímico. El procedimiento debe mantener la calidad de la muestra de modo que la morfología de muestra siga siendo aceptable como se determina por un lector capacitado.

La solución comprende un tampón citrato que tiene un pH de 5 a 7. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón citrato tiene un pH de 5 a 6,5. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón citrato tiene una concentración de citrato de 5 mM a 20 mM. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón citrato comprende además un tensioactivo. En algunos modos de realización, el tensioactivo comprende dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de sodio (SLS), dodecilsulfato de amonio (ADS), dodecilsulfato de hidrógeno (HDS) y dodecilsulfato de tris(hidroximetil)aminometano. En algunos modos de realización, el porcentaje de tensioactivo es de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 % o 0,6 %.

En algunos modos de realización, el volumen de solución es un charco independiente. El volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 500  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En algunos modos de realización, el volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En algunos modos de realización, el volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 100  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En algunos modos de realización, la muestra se lava (por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces, más de tres veces, etc.) entre el tratamiento y la adición de una nueva PBE.

En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 18 °C a 42 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 20 °C a 37 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 22 °C a 30 °C. En algunos modos de realización, la fuente térmica comprende una almohadilla térmica. En algunos modos de realización, la fuente térmica está en contacto directo con el sustrato sólido. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica inicial es de 18 °C a 42 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica inicial es de 20 °C a 37 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica inicial es de 22 °C a 30 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica inicial es de 15 °C a 42 °C.

En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 80 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica diana es de 85 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica diana es de 90 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica diana es de 95 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de fuente térmica diana es de 97 °C.

5 En algunos modos de realización, el período de tiempo en que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 3 minutos. En algunos modos de realización, el período de tiempo en que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 4 minutos. En algunos modos de realización, el período de tiempo en que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 8 minutos.

10

En algunos modos de realización, el período de tiempo en que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 10 minutos. En algunos modos de realización, el período de tiempo en que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 16 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 9 a 11 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 8 a 12 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 8 a 15 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a una tasa de 5 a 15 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 15 segundos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 30 segundos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 1 minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 2 minutos.

15

20

25

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende incubar la muestra con un primer anticuerpo primario e incubar la muestra con un primer anticuerpo secundario específico para el primer anticuerpo primario de manera que deposite un resto detectable en un sitio en el que el primer anticuerpo primario se une a una diana; tratar la muestra para reducir la capacidad del anticuerpo primario para detectarse además en la muestra como se describe anteriormente, repetir la incubación con al menos un segundo anticuerpo primario y un segundo anticuerpo secundario específico para el segundo anticuerpo primario; y repetir el tratamiento entre cada repetición de la incubación con anticuerpos primario/secundario.

30

35

En algunos modos de realización, el primer anticuerpo primario y el segundo anticuerpo primario comprenden cada uno una marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.). En algunos modos de realización, la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del primer anticuerpo primario y la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del segundo anticuerpo primario son iguales. En algunos modos de realización, la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del primer anticuerpo primario y la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del segundo anticuerpo primario son diferentes. En algunos modos de realización, el segundo anticuerpo secundario es el mismo que el primer anticuerpo secundario, pero los anticuerpos secundarios tienen marcadores detectables diferentes.

40

45

El procedimiento de la presente invención está automatizado. En algunos modos de realización, el procedimiento de la presente invención se realiza en un sistema cerrado (por ejemplo, un procedimiento automatizado), en el que el procedimiento no tiene etapas manuales. Por ejemplo, el procedimiento se realiza en un sistema cerrado y la etapa de tratamiento termoquímico se integra en el sistema cerrado (el tratamiento termoquímico no es una etapa manual).

50

La presente invención también presenta un sistema de acuerdo con la reivindicación 13.

La presente divulgación también presenta composiciones que no forman parte de la invención, tales como composiciones que comprenden una muestra tisular marcada obtenida usando procedimientos de la presente invención. La presente divulgación también presenta composiciones que comprenden un portaobjetos con una muestra tisular, en la que la muestra tisular comprende un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario y un marcador, en la que la muestra tisular se trata como se describe anteriormente.

55

60

Sin desear limitar a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los procedimientos, composiciones y sistemas descritos en el presente documento pueden ser beneficiosos para ensayos automatizados en dispositivos de tinción automatizados (por ejemplo, VENTANA BenchMark, Dako, Leica Bond, etc.). Dichos dispositivos automatizados ya están adaptados para dosificar tampones y reactivos y para calentar muestras a diversas temperaturas (por ejemplo, 37 °C - 90 °C, 37 °C - 95 °C, 37 °C - 99 °C, etc.), mientras que dichos dispositivos automatizados no están adaptados para muestras de microondas o muestras térmicas a temperaturas muy altas

65

tales como 130 °C.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1A muestra una representación esquemática del sustrato sólido (110) (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) con la muestra situada encima de una fuente térmica (120) (por ejemplo, una almohadilla térmica). El volumen de solución (130) (por ejemplo, charco), por ejemplo, tampón citrato, se sitúa encima de la muestra/sustrato sólido. El calor de la almohadilla térmica se dirige hacia arriba. En algunos modos de realización, la almohadilla térmica calienta el sustrato sólido. A continuación, el calor se transfiere hacia arriba a la muestra, a  
10 continuación al volumen de solución, por ejemplo, tampón. El volumen de solución puede ser un charco independiente. La flecha se refiere al sentido del calor (140). La FIG. 1B es una vista esquemática del calentamiento de la fuente térmica con el tiempo. La fuente térmica comienza a una temperatura de fuente térmica inicial (151). La fuente térmica se calienta hasta una temperatura de fuente térmica diana (152) (o por encima de la temperatura de fuente térmica diana) durante un período de tiempo. En algunos modos de realización, la fuente  
15 térmica se mantiene a la temperatura de fuente térmica diana (o por encima de la temperatura de fuente térmica diana) durante un período de tiempo. El número (153) se refiere al tiempo de la temperatura de fuente térmica inicial a la temperatura de fuente térmica diana. El número (154) se refiere al tiempo en o por encima de la temperatura de fuente térmica diana.
- 20 La FIG. 2A muestra la tinción IHQ de CD20 (201) como control (ejemplo 1). La FIG. 2B muestra la tinción de CD20 cuando se usó una etapa de tratamiento termoquímico (etapa de termoinactivación) después de la aplicación de anti-CD20 de conejo/anti-HRP de conejo caprino (ejemplo 1).
- 25 La FIG. 3A muestra la tinción IHQ de CD20 (201) como control (ejemplo 2). La FIG. 3B muestra la tinción de CD20 cuando se aplicó una etapa de tratamiento termoquímico (etapa de termoinactivación) después de la aplicación de anti-CD20 de conejo/anti-HRP de conejo caprino y detección DAB (ejemplo 2).
- 30 La FIG. 4A muestra la tinción IHQ de CD20 de control (201) (ejemplo 3). La FIG. 4B muestra la tinción después de que se aplicara una etapa de tratamiento termoquímico (etapa de termoinactivación) después de la aplicación de los anticuerpos primario y secundario pero antes de la reaplicación del anticuerpo secundario (y detección DAB posterior) (ejemplo 3).
- 35 La FIG. 5A muestra la tinción de CD20 de control (201). La FIG. 5B muestra la tinción de control de FoxP3 (202). La FIG. 5C muestra la tinción de FoxP3 después de una etapa de tratamiento termoquímico (termoinactivación) después de que se aplicaron los anticuerpos primario y secundario para CD20 pero antes de que se aplicara el anticuerpo primario para FoxP3 (ejemplo 4.1).
- 40 La FIG. 6A muestra la tinción de control de CD3 (203). La FIG. 6B muestra la tinción de CD3 después de 5 ciclos de una etapa de termoinactivación. La tinción de CD3 fue comparable a la del control. La FIG. 6C muestra la tinción de control de CD8 (204). La FIG. 6D muestra la tinción de CD8 después de 5 ciclos de una etapa de termoinactivación. La tinción de CD8 fue comparable a la del control. La FIG. 6E muestra la tinción de control de CD68 (205). La FIG. 6F muestra la tinción de CD68 después de 5 ciclos de una etapa de termoinactivación. La tinción de CD68 fue comparable a la del control (ejemplo 5).
- 45 La FIG. 7A muestra la tinción de CD3 en una muestra de colon. El panel superior izquierdo muestra la tinción de CD3 de control (203). El panel superior derecho muestra un control en el que no se usó ningún anticuerpo primario para CD3. El panel inferior izquierdo y panel inferior derecho muestran los resultados cuando se usa una etapa de termoinactivación. La FIG. 7B muestra la tinción de HER2 en una muestra de mama. El panel superior izquierdo muestra la tinción de HER2 de control (206). El panel superior derecho muestra un control en el que no se usó  
50 ningún anticuerpo primario para HER2. El panel inferior izquierdo y panel inferior derecho muestran los resultados cuando se usa una etapa de termoinactivación. La FIG. 7C muestra la tinción de queratina 5 en una muestra de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC). El panel superior izquierdo muestra la tinción de queratina 5 de control (207). El panel superior derecho, panel inferior izquierdo y panel inferior derecho muestran los resultados cuando se usa una etapa de termoinactivación. La FIG. 7D muestra la tinción de Ki-67 en una muestra de mama. El panel superior izquierdo muestra la tinción de Ki-67 de control (208). El panel superior  
55 derecho muestra un control en el que no se usó ningún anticuerpo primario para Ki-67. El panel inferior izquierdo y el panel inferior derecho muestran los resultados cuando se usa una etapa de termoinactivación. La FIG. 7E muestra la tinción de ER en una muestra de mama. El panel izquierdo muestra la tinción de ER de control (209). El panel central y panel derecho muestran los resultados cuando se usa una etapa de termoinactivación. La FIG. 7F  
60 muestra la tinción de PDL1 en una muestra de CCECC. El panel superior izquierdo muestra la tinción de PDL1 de control (210). El panel superior derecho, el panel inferior izquierdo y el panel inferior derecho muestran los resultados cuando se usa una etapa de termoinactivación (ejemplo 8).
- 65 La FIG. 8A muestra la tinción de control de CD20 (201). La FIG. 8B muestra la tinción de FoxP3 de control (202). La FIG. 8C muestra la tinción de FoxP3 después de que se realizara una etapa de termoinactivación (ejemplo 9).

La FIG. 9 muestra los resultados del experimento 3 de la tabla 1 (véase el ejemplo 11). La FIG. 9A muestra la tinción de DAPI (212) (tinción nuclear). La FIG. 9B muestra autofluorescencia (DCC) (exposición de 100 ms). La FIG. 9C muestra la tinción positiva de PD-L1 (211) (otro portaobjetos) con R6G (la tinción muestra los contornos de las membranas). La FIG. 9D muestra la tinción de PD-L1 usando R6G después de una etapa de termoinactivación/desactivación térmica (exposición de 500 ms). Incluso con un tiempo de exposición prolongado de 500 ms, no se detectó ninguna señal de reacción cruzada por encima del nivel de fondo autofluorescente.

### Términos

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece una invención divulgada. Los términos en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. "Que comprende" quiere decir "que incluye". Por tanto, "que comprende A o B" quiere decir "que incluye A" o "que incluye B" o "que incluye A y B".

Los procedimientos y materiales adecuados para la práctica y/o las pruebas de los modos de realización de la divulgación se describen a continuación. Dichos procedimientos y materiales son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Se pueden usar otros procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Por ejemplo, los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica a la que pertenece la divulgación se describen en diversas referencias generales y más específicas, incluyendo, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos hasta 2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4.<sup>a</sup> ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999

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

Para facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

**Entidad de unión proteínica:** como se usa en el presente documento, el término "entidad de unión" se referirá a cualquier molécula proteínica que se puede unir específicamente a una estructura molecular específica. Los ejemplos incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como estructuras de unión específicas genomanipuladas, incluyendo las ADNECTIN (matriz basada en la 10.<sup>a</sup> fibronectina FN3; Bristol-Myers-Squibb Co.), AFFIBODY (matriz basada en el dominio Z de la proteína A de *S. aureus*; Affibody AB, Solna, Suecia), AVIMER (matriz basada en el dominio A/receptor de LDL; Amgen, Thousand Oaks, CA), dAb (matriz basada en el dominio de anticuerpos VH o VL; GlaxoSmithKline PLC, Cambridge, Reino Unido), DARP (matriz basada en proteínas de repetición de anquirina; Molecular Partners AG, Zúrich, CH), ANTICALIN (matriz basada en lipocalinas; Pieris AG, Freising, DE), NANOBODY (matriz basado en VHH (Ig de camélidos); Ablynx NV, Gante, BE), TRANS-BODY (matriz basada en transferrina; Pfizer Inc., New York, NY), SMIP (Emergent Biosolutions, Inc., Rockville, MD) y TETRANECTINS (matriz basada en el dominio de lectina tipo C (DLTC), tetranectina; Boreau Pharma A/S, Aarhus, DK). Las descripciones de dichas estructuras de unión específica genomanipuladas se revisan por Wurch *et al.*, *Development of Novel Protein Scaffolds as Alternatives to Whole Antibodies for Imaging and Therapy: Status on Discovery Research and Clinical Validation*, Current Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 9, pp. 502-509 (2008).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que presenta la actividad biológica o de unión deseada. Por tanto, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos de dominio único camelizados.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo, "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que conservan una o más regiones CDR. Los ejemplos de fragmentos de unión de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario, por ejemplo, sc-Fv, nanocuerpos y

anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo primario puede ser cualquiera de los ejemplos mencionados anteriormente de anticuerpos o entidades de unión. Un anticuerpo secundario es un agente de unión que se puede unir a un anticuerpo primario, por ejemplo, un agente de unión que se puede unir a una marca (por ejemplo, hapteno) en el anticuerpo primario, un agente de unión que se puede unir al anticuerpo primario directamente, etc.

**Poner en contacto:** disposición que permite la asociación entre dos o más restos, en particular la asociación física directa, por ejemplo, tanto en forma sólida como en forma líquida (por ejemplo, la disposición 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 sondas divulgadas en el presente documento).

**Marcador detectable:** una molécula o material que puede producir una señal (tal como una señal visual, eléctrica u otra) que indica la presencia y/o cantidad de una diana (tal como una proteína o ácido nucleico) en una muestra. Los marcadores detectables son bien conocidos por el experto en la técnica.

**Hapteno:** un hapteno es una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente no puede ser sustancialmente inmunógena excepto en combinación con una molécula transportadora. Son conocidos muchos haptenos y se usan con frecuencia para procedimientos analíticos, tales como dinitrofenilo, biotina, digoxigenina, fluoresceína, rodamina o los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 7.695.929

Otros haptenos se han desarrollado específicamente por Ventana Medical Systems, Inc., cesionario de la presente solicitud, incluyendo haptenos seleccionados de oxazoles, pirazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofuranos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenoides, cumarinas, ciclolignanos y combinaciones de los mismos, incluyendo los ejemplos de hapteno particulares de haptenos benzofurazano, nitrofenilo, 4-(2-hidroxifenil)-1H-benzo[b][1,4]diazepina-2(3H)-ona y 3-hidroxi-2-quinoxalinacarbamida. Se pueden acoplar varios haptenos diferentes a un vehículo polimérico. Además, los compuestos, tales como haptenos, se pueden acoplar a otra molécula usando un conector, tal como un conector NHS-PEG.

**Histoquímica (por ejemplo, inmunohistoquímica (IHQ)):** un procedimiento para determinar la presencia o distribución de una molécula diana en una muestra detectando la interacción de la molécula diana con un agente de unión específico, tal como un anticuerpo, que se puede detectar. Por ejemplo, una muestra se pone en contacto con un anticuerpo en condiciones que permitan la unión antígeno-anticuerpo. La unión anticuerpo-antígeno se puede detectar por medio de un marcador detectable conjugado al anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado a un anticuerpo secundario, que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta).

**Múltiple, multiplexado, multiplexación:** los modos de realización de la presente invención permiten que se detecten múltiples dianas en la misma muestra, por ejemplo, sustancialmente de forma simultánea o secuencial, según se desee.

**Unión específica:** un término que se refiere a la unión de un agente que se une preferentemente a una diana definida (tal como un anticuerpo secundario a un anticuerpo primario, un anticuerpo a una proteína o antígeno específico, etc.). Se pueden usar los formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que reaccionan específicamente con una proteína particular (tal como anticuerpos que se unen específicamente a la proteína HER2 o proteína ER). Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo.

**Sujeto:** cualquier organismo vertebrado pluricelular, tal como mamíferos humanos o no humanos (por ejemplo, sujetos veterinarios).

**Muestra celular:** cualquier muestra que contiene células intactas, tales como cultivos celulares, muestras de fluidos corporales o muestras quirúrgicas tomadas para interpretación patológica, histológica o citológica.

**Muestra tisular:** una muestra celular que conserva la relación espacial transversal entre las células como existían dentro del sujeto del que se obtuvo la muestra. La "muestra tisular" englobará tanto muestras tisulares principales (es decir, células y tejidos producidos por el sujeto) como xenoinjertos (es decir, muestras celulares exógenas implantadas en un sujeto).

**Muestra citológica:** una muestra celular en la que las células de la muestra se han desagregado parcial o completamente, de modo que la muestra ya no refleja la relación espacial de las células como existían en el sujeto del que se obtuvo la muestra celular. Los ejemplos de muestras citológicas incluyen raspados de tejido (tal como un raspado cervical), aspirados con aguja fina, muestras obtenidas por lavado de un sujeto, etcétera.

**Tinte:** cuando se usa como sustantivo, el término "tinte" se refiere a cualquier sustancia que se puede usar para

visualizar moléculas o estructuras específicas en una muestra celular para análisis microscópico, incluyendo la microscopía de campo claro, microscopía fluorescente, microscopía electrónica y similares. Cuando se usa como verbo, el término "teñir" se refiere a cualquier proceso que da como resultado el depósito de un tinte en una muestra celular.

5

### Descripción de la invención

En referencia ahora a la FIG. 1-9, la presente divulgación presenta procesos, procedimientos, composiciones y sistemas termoquímicos (de termoinactivación) para ayudar a evitar la reactividad cruzada de una proteína detectable (por ejemplo, una entidad de unión proteínica (PBE)) en un ciclo de tinción posterior. La presente invención puede reducir la cantidad de la proteína detectable y/o hacer que la proteína detectable sea inactiva o indetectable para los ciclos de tinción posteriores (por ejemplo, un lector capacitado no vería mucha, si es que la hay, reactividad cruzada). El procedimiento de tratamiento termoquímico permite que el marcador detectable (por ejemplo, visible) que se deposita sobre la muestra después de la incubación de la muestra con la proteína detectable permanezca en la muestra (o permanece la mayor parte del marcador detectable).

10

15

Cabe destacar que la muestra no se limita a una muestra celular tal como una muestra tisular (por ejemplo, una muestra tisular FFPE); en algunos modos de realización, la muestra no tiene células. Además, la presente invención no se limita a aplicaciones de inmunohistoquímica.

20

25

La muestra se puede poner en contacto primero con (o incubar con) una primera entidad de unión proteínica (PBE) exógena, por ejemplo, un anticuerpo, de manera que dé como resultado el depósito de la PBE en las proximidades de su diana. A continuación, la muestra se puede poner en contacto con (o incubarse con) reactivos de manera que dé como resultado el depósito específico de un resto detectable en las proximidades de la PBE. A continuación, la muestra se puede tratar con un procedimiento/proceso termoquímico (procedimiento de termoinactivación) para reducir la capacidad de la PBE de detectarse además en la muestra (por ejemplo, para eluir la PBE de la muestra, para desnaturalizar la PBE en la muestra, etc.).

30

### Tratamiento termoquímico

El procedimiento o proceso termoquímico (procedimiento de termoinactivación) de la presente invención comprende poner en contacto una muestra en un portaobjetos con un volumen de solución que comprende un tampón citrato con un pH de 5 a 7 y calentar el portaobjetos y la muestra y la solución que comprende el tampón por medio de calentar una fuente térmica (por ejemplo, una almohadilla térmica). Calentar la fuente térmica calienta eficazmente el portaobjetos, la muestra y el tampón (por ejemplo, elevando la temperatura de una temperatura de tampón inicial a una segunda temperatura).

35

40

La FIG. 1A muestra una representación esquemática del sustrato sólido (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) con la muestra situada encima de una fuente térmica (por ejemplo, almohadilla térmica). El volumen de solución con el tampón (por ejemplo charco) se sitúa encima de la muestra/sustrato sólido. El calor de la fuente térmica se puede dirigir desde la fuente térmica al sustrato sólido/muestra a la solución que comprende el tampón.

45

50

En algunos modos de realización, la fuente térmica comprende una almohadilla térmica. En algunos modos de realización, la fuente térmica está en contacto directo con el sustrato sólido. En algunos modos de realización, la fuente térmica está en contacto indirectamente con el sustrato sólido. En algunos modos de realización, la fuente térmica está muy próxima al sustrato sólido. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que debido a que la fuente térmica está en contacto directo, en contacto indirecto o bien muy próxima al sustrato sólido (por ejemplo, portaobjetos) con la muestra, la fuente térmica puede calentar el portaobjetos y la muestra y la solución que comprende el tampón a una temperatura, por ejemplo, una temperatura similar a la de la fuente térmica.

55

60

En algunos modos de realización, el tampón de la solución comprende citrato. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene un pH de 5 a 7. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene un pH de 5 a 6,5. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene un pH de al menos 4,5. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene un pH de al menos 5. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene un pH de al menos 5,5. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene un pH de 5 a 10, de 5 a 9, de 5 a 8,3, de 5 a 8, de 5 a 7, de 5 a 6,5, de 5,5 a 8, de 5,5 a 7, de 5,5 a 6,5, de 5,8 a 6,3, de 4 a 9, de 4 a 8, de 5 a 6, de 4 a 7,5, de 5,5 a 6,2, de 5,9 a 6,9, etc.

65

En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene una concentración de citrato de 5 mM a 20 mM. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene una concentración de citrato de 1 mM a 50 mM. En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón tiene una concentración de citrato de 8 mM, 10 mM, 12 mM, 14 mM, 15 mM, 18 mM, etc. En algunos modos de realización, el tampón comprende citrato y acetato. En algunos modos de realización, el tampón es citrato y acetato, y el citrato está a una concentración de 5 mM a 20 mM. El tampón puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste

en tampones acetato, MES, citrato, citrato fosfato, fosfato, tris, borato, bicarbonato/carbonato y carbonato.

5 En algunos modos de realización, la solución que comprende el tampón comprende un agente quelante, por ejemplo, citrato, EGTA, EDTA, fosfonato, etc. En algunos modos de realización, la solución que comprende el  
 10 tampón comprende además un tensioactivo. Los tensioactivos pueden incluir pero no se limitan a, dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de sodio (SLS), dodecilsulfato de amonio (ADS), dodecilsulfato de hidrógeno (HDS) y dodecilsulfato de tris(hidroximetil)aminometano, similares, o una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, el porcentaje de tensioactivo es de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, de un 0,01 % a un 5 %, de un 0,05 % a un 3 %, de un 0,1 % a un 1 %, etc. En algunos modos de realización, la solución que  
 15 comprende el tampón comprende además un detergente, por ejemplo, Colaterge LFD-C. En algunos modos de realización, el porcentaje de detergente (por ejemplo, p/v) es de un 1 % a un 15 %, por ejemplo, de un 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, de un 1 % a un 3 %, etc. La presente invención no se limita a los tensioactivos, tampones y concentraciones mencionados anteriormente de los mismos.

20 El volumen de solución que comprende el tampón, que se deposita sobre el sustrato sólido (por ejemplo, todo o una parte del sustrato sólido, por ejemplo, encima de la muestra), puede estar en el intervalo de aproximadamente 500  $\mu\text{l}$  a aproximadamente de 2 a 4 ml. Este volumen proporciona una proporción de volumen con respecto a área de superficie, en la que un determinado volumen de solución cubre una determinada área del sustrato sólido (por ejemplo, un portaobjetos). Por ejemplo, en algunos modos de realización, la solución proporciona una proporción  
 25 de volumen con respecto a área de superficie de 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 500  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de cobertura sobre la totalidad o bien una parte del sustrato sólido (por ejemplo, portaobjetos), por ejemplo, de 5  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{l}$  cubre cada centímetro cuadrado del sustrato sólido (o el área de la muestra sobre el sustrato sólido).

30 El volumen de solución puede ser un charco independiente. En algunos modos de realización, el volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 500  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En algunos modos de realización, el volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En algunos modos de realización, el volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 100  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

#### **Calentamiento de la fuente térmica y la solución que comprende el tampón**

35 La fuente térmica se calienta de una temperatura de fuente térmica inicial a una temperatura de fuente térmica diana o por encima durante un período de tiempo. El calentamiento de la fuente térmica da como resultado la elevación de la temperatura de la solución que comprende el tampón de una temperatura de tampón inicial a una segunda temperatura. La temperatura de fuente térmica inicial, la temperatura de fuente térmica diana, la temperatura de tampón inicial y/o la segunda temperatura pueden estar cada una por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón. La FIG. 1B muestra un esquema del calentamiento de la fuente térmica con el tiempo. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que debido a  
 40 que la fuente térmica está en contacto directo o bien muy próxima al portaobjetos con la muestra, la fuente térmica puede calentar el portaobjetos y la muestra (y tampón) a una temperatura similar a la de la fuente térmica.

45 La fuente térmica se calienta (por ejemplo, a una tasa particular, por ejemplo, una tasa lenta, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8 grados Celsius por minuto a aproximadamente 12 a 15 grados Celsius por minuto) de una temperatura de fuente térmica inicial (por ejemplo, de 18 °C a 42 °C) a una temperatura de fuente térmica diana (o por encima de la temperatura de fuente térmica diana), por ejemplo, de 80 °C a 98 °C, en la que la temperatura de fuente térmica diana (o la temperatura que está por encima de la temperatura de fuente térmica diana) es menor que el punto de ebullición de la solución que comprende el tampón. La fuente térmica se puede mantener a la temperatura de fuente térmica diana (o la temperatura por encima de la temperatura de fuente térmica diana)  
 50 durante un período de tiempo particular.

55 En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 50 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 45 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 42 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 40 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 37 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 35 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 32 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 30 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 28 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 25 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es menor de 22 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 18 °C a 42 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 20 °C a 37 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 22 °C a 30 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 15 °C a 42 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 20 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 25 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 30 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de tampón inicial es de 32 °C. En algunos modos de realización, la temperatura de





5 En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 9 a 11 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 8 a 12 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 8 a 15 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 5 a 15 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 10 a 15 grados Celsius por minuto.

10 En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 5 a 20 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 8 a 20 grados Celsius por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de al menos 5 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de al menos 8 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de al menos 10 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de menos de 20 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de menos de 15 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de menos de 12 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de menos de 10 grados centígrados por minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de menos de 5 grados centígrados por minuto.

30 En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 15 segundos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 30 segundos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 1 minuto. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 2 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 3 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 4 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 5 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 8 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima durante al menos 10 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 2 minutos a 10 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 2 minutos a 16 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 2 minutos a 20 minutos.

45 En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 5 minutos a 10 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 5 minutos a 16 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 5 minutos a 20 minutos. En algunos modos de realización, la fuente térmica está a la temperatura de fuente térmica diana o por encima de 8 minutos a 20 minutos.

50 En algunos modos de realización, la muestra se lava (una vez, dos veces, tres veces, más de tres veces, etc.) entre el tratamiento y la adición de una nueva PBE.

### 55 **Calentamiento de la muestra a la temperatura de muestra diana o temperatura de calentamiento**

El procedimiento comprende calentar la muestra con un volumen de solución que comprende tampón citrato con un pH de 5 a 7, cubriendo el volumen de solución la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  a 500  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , en el que la muestra se calienta a una temperatura de muestra diana (por ejemplo, el sustrato sobre el que se dispone la muestra se calienta a una temperatura de muestra diana de muestra particular, en el que la temperatura del sustrato sobre el que se dispone la muestra es probablemente la misma que la temperatura de la muestra) o la muestra se calienta a una temperatura de muestra de calentamiento, por ejemplo, la muestra se incuba en presencia de una temperatura de muestra de calentamiento, por ejemplo, la temperatura de muestra de calentamiento se refiere a la temperatura a la que se expone la muestra. Es posible que la temperatura de muestra de calentamiento no provoque necesariamente que la muestra alcance la misma temperatura, por ejemplo, dependiendo de cuánto tiempo se expone la muestra a la temperatura de muestra de calentamiento.

- 5 La muestra se puede calentar a la temperatura de muestra diana o en presencia de la temperatura de muestra de calentamiento durante un período de tiempo. El tiempo puede ser suficiente para reducir la capacidad de la primera PBE para detectarse además en la muestra (por ejemplo, reducir la presencia de la primera PBE, reducir la actividad y/o detectabilidad de la primera PBE). La temperatura de muestra diana y la temperatura de muestra de calentamiento están por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón. En algunos modos de realización, la temperatura de muestra diana y/o la temperatura de muestra de calentamiento son de 70 °C a 100 °C, a o por encima de 75 °C, a o por encima de 80 °C, a o por encima de 90 °C, etc.
- 10 El período de tiempo en que la muestra está a la temperatura de muestra diana o se calienta a la temperatura de muestra de calentamiento es de 1 a 20 minutos (por ejemplo, de 1 a 16 minutos, de 2 a 16 minutos, de 4 a 16 minutos, de 5 a 16 minutos, de 6 a 16 minutos, 18 minutos o menos, 10 minutos o menos, 8 minutos o menos, etc. Los teñidores de portaobjetos automatizados usados para los procedimientos de la presente invención pueden requerir tiempo adicional para calentar el portaobjetos/muestra a la temperatura de muestra diana, por ejemplo, el
- 15 portaobjetos/muestra puede estar a la temperatura de muestra diana durante el tiempo especificado anteriormente (un tiempo de mantenimiento), pero la etapa de calentamiento de la máquina para llevar el portaobjetos/muestra a la temperatura de muestra diana será más largo que el tiempo de mantenimiento.
- 20 En algunos modos de realización, la muestra se eleva a una temperatura de muestra diana de 90 °C durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, más de 10 minutos, etc. Como ejemplo, la muestra está a 37 °C y se eleva a 90 °C durante un período de 8 minutos (la temperatura aumenta lentamente hasta 90 °C). En algunos modos de realización, la muestra se eleva a una temperatura de muestra diana de 90 °C a 99 °C durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, más de 10 minutos, etc. En algunos modos de realización, la muestra se eleva a una temperatura de muestra diana de 80 °C a 90 °C durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, más de 10 minutos, etc. En algunos modos de realización, la muestra se eleva a una temperatura de muestra diana de 75 °C a 85 °C durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, más de 10 minutos, etc. En algunos modos de realización, la muestra se eleva a una temperatura de muestra diana de 75 °C a 90 °C durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, más de 10 minutos, etc. En algunos modos de realización, la muestra se eleva a una temperatura de muestra diana de 80 °C a 99 °C durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, más de 10 minutos, etc.
- 30 En algunos modos de realización, la muestra se calienta a una temperatura de muestra de calentamiento (por ejemplo, la muestra se expone a la temperatura de muestra de calentamiento) durante un período de 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos., 10 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, más de 10 minutos, más de 12 minutos, más de 14 minutos, etc.
- 40 En algunos modos de realización, el anticuerpo particular (anticuerpo primario) requiere una temperatura de muestra diana particular o temperatura de muestra de calentamiento, tiempo de tratamiento (tiempo de mantenimiento a la temperatura de muestra diana o temperatura de muestra de calentamiento) y/o combinación de pH para inactivación, por ejemplo, no todos los anticuerpos pueden requerir necesariamente la misma combinación de temperatura de muestra diana o temperatura de muestra de calentamiento, pH y tiempo de mantenimiento para la inactivación. Otros ejemplos de tiempos y temperaturas de tratamiento se muestran en la tabla 1 a continuación.
- 45 La presente invención no se limita a estos ejemplos.

**Tabla 1**

| <b>Ejemplo</b> | <b>Temperatura de muestra diana o temperatura de muestra de calentamiento (°C)</b> | <b>Tiempo de tratamiento (min)</b> | <b>pH de la solución que comprende el tampón</b> |
|----------------|--|------------------------------------|--|
| A              | 80   | 4                                  | 5,5  |
| B              | 85   | 4                                  | 5,5  |
| C              | 90   | 4                                  | 5,5  |
| D              | 95   | 4                                  | 5,5  |
| E              | 98   | 4                                  | 5,5  |
| F              | 100  | 4                                  | 5,5  |
| G              | 80   | 8                                  | 6,5  |
| H              | 85   | 8                                  | 6,5  |
| I              | 90   | 8                                  | 6,5  |
| J              | 95   | 8                                  | 6,5  |
| K              | 98   | 8                                  | 6,5  |

| Ejemplo | Temperatura de muestra diana o temperatura de muestra de calentamiento (°C) | Tiempo de tratamiento (min) | pH de la solución que comprende el tampón |
|---------|---|-----------------------------|---|
| L       | 100   | 8                           | 6,5                                       |
| M       | 80  | 10                          | 5,2                                       |
| N       | 85  | 10                          | 5,2                                       |
| O       | 90  | 10                          | 5,2                                       |
| P       | 95  | 10                          | 5,2                                       |
| Q       | 98  | 10                          | 5,2                                       |
| R       | 100   | 10                          | 5,8                                       |
| S       | 80  | 12                          | 5,8                                       |
| T       | 85  | 12                          | 5,8                                       |
| U       | 90  | 12                          | 5,8                                       |
| V       | 95  | 12                          | 5,8                                       |
| W       | 98  | 12                          | 5,8                                       |
| X       | 100   | 12                          | 5,8                                       |
| Y       | 80  | 16                          | 6,1                                       |
| Z       | 85  | 16                          | 6,1                                       |
| AA      | 90  | 16                          | 6,1                                       |
| BB      | 95  | 16                          | 6,1                                       |
| CC      | 98  | 16                          | 6,1                                       |
| DD      | 100   | 16                          | 6,1                                       |
| EE      | 80  | 18                          | 7,1                                       |
| FF      | 85  | 18                          | 7,1                                       |
| GG      | 90  | 18                          | 7,1                                       |
| HH      | 95  | 18                          | 7,1                                       |
| II      | 98  | 18                          | 7,1                                       |
| JJ      | 100   | 18                          | 7,1                                       |
| KK      | 80  | 20                          | 5,5                                       |
| LL      | 85  | 20                          | 5,5                                       |
| MM      | 90  | 20                          | 5,5                                       |
| NN      | 95  | 20                          | 5,5                                       |
| OO      | 98  | 20                          | 5,5                                       |
| PP      | 100   | 20                          | 5,5                                       |

- 5 En algunos modos de realización, los procedimientos de tratamiento termoquímico (desactivación térmica) de la presente invención comprenden calentar la muestra a una temperatura, por ejemplo, de 98 °C (por ejemplo, una temperatura nominal de 100 °C o temperatura real de 98 °C), sin embargo la presente invención no se limita a estas temperaturas. Por ejemplo, en algunos modos de realización, los procedimientos comprenden calentar la muestra a una temperatura nominal de 99 °C. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden calentar la muestra a una temperatura nominal de 98 °C. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden calentar la muestra a una temperatura nominal de 97 °C. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden calentar la muestra a una temperatura nominal de 96 °C, etc. En algunos modos de realización, la temperatura real es de 99 °C. En algunos modos de realización, la temperatura real es de 98 °C. En algunos modos de realización, la temperatura real es de 97 °C. En algunos modos de realización, la temperatura real es de 96 °C. En algunos modos de realización, la temperatura real es de 95 °C, etc.
- 10
- 15 En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 12 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 11 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 10 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 9 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 8 minutos o menos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 13 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 14 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 15 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 16 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 17 minutos. En algunos modos de realización, la muestra se calienta a la temperatura durante 18 minutos o más de 18 minutos.
- 20
- 25 En algunos modos de realización, el tiempo de calentamiento representa el tiempo en que la máquina comienza a

aumentar hasta la temperatura de muestra diana así como la cantidad de tiempo en que la muestra está a esa temperatura. En algunos modos de realización, el tiempo de calentamiento representa la cantidad de tiempo en que la muestra está a la temperatura. En algunos modos de realización, el tiempo de calentamiento representa el tiempo en que la máquina comienza a aumentar hasta la temperatura de muestra diana, la cantidad de tiempo en que la muestra está a la temperatura y la cantidad de tiempo en que la muestra comienza a enfriarse a medida que la muestra se prepara para la siguiente etapa del ensayo.

#### Entidades de unión proteínica (PBE)

El procedimiento comprende repetir las etapas con una segunda PBE (y opcionalmente una tercera PBE, una cuarta PBE, una quinta PBE, etc.) y repetir las etapas de tratamiento entre incubaciones con una PBE. No es necesario realizar el tratamiento después de la última incubación con PBE. Cada resto detectable se puede detectar (por ejemplo, visualizar) en la muestra en la localización que corresponde a la localización diana de la PBE. El procedimiento debe mantener la calidad de la muestra de modo que la morfología de muestra siga siendo aceptable como se determina por un lector capacitado.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende incubar la muestra con un primer anticuerpo primario e incubar la muestra con un primer anticuerpo secundario específico para el primer anticuerpo primario de manera que deposite un resto detectable en un sitio en el que el primer anticuerpo primario se une a una diana; tratar la muestra para reducir la capacidad del anticuerpo primario para detectarse además en la muestra como se describe anteriormente, repetir la incubación con al menos un segundo anticuerpo primario y un segundo anticuerpo secundario específico para el segundo anticuerpo primario; y repetir el tratamiento entre cada repetición de la incubación con anticuerpos primario/secundario.

En algunos modos de realización, el primer anticuerpo primario y el segundo anticuerpo primario comprenden cada uno una marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.). En algunos modos de realización, la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del primer anticuerpo primario y la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del segundo anticuerpo primario son iguales. En algunos modos de realización, la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del primer anticuerpo primario y la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) del segundo anticuerpo primario son diferentes. En algunos modos de realización, el segundo anticuerpo secundario es el mismo que el primer anticuerpo secundario, pero los anticuerpos secundarios tienen marcadores detectables diferentes.

El procedimiento de detección de al menos dos dianas (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, etc.) en la misma muestra en un solo sustrato sólido puede comprender incubar la muestra con una primera entidad de unión proteínica (PBE) exógena de manera que deposite un resto detectable en un sitio en el que la PBE se une a la diana de la PBE. Por ejemplo, esto puede comprender incubar la muestra con un primer anticuerpo primario y un primer anticuerpo secundario específico para el primer anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo secundario específico para una marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) en el primer anticuerpo primario, un anticuerpo secundario específico para la especie del anticuerpo primario, etc.). El anticuerpo secundario se puede marcar, por ejemplo, con un resto detectable. El resto detectable se puede depositar en el sitio en el que la PBE se une a su diana (por ejemplo, la diana a la que se une el anticuerpo primario). En algunos modos de realización, la muestra se incuba con un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario (por ejemplo, un anticuerpo secundario con una marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.)) específico para el anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo secundario puede ser anti-especie, anti-hapteno, etc.) y un anticuerpo terciario (por ejemplo, marcado) específico para el anticuerpo secundario (por ejemplo, el anticuerpo terciario puede ser anti-marca (por ejemplo, anti-hapteno), etc.).

Como se analiza previamente, la primera PBE puede comprender un primer anticuerpo primario. La muestra se puede incubar con un anticuerpo secundario (por ejemplo, con un marcador) específico para el primer anticuerpo y el marcador se deposita sobre la muestra (en la localización del anticuerpo primario, por ejemplo, el sitio diana). Además, la segunda PBE (y opcionalmente las PBE posteriores) también pueden comprender anticuerpos primarios y la muestra se puede incubar con anticuerpos secundarios (por ejemplo, marcados) específicos para esos anticuerpos primarios. En algunos modos de realización, los anticuerpos primarios comprenden cada uno una marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) (y los anticuerpos secundarios son específicos para las respectivas marcas). En algunos modos de realización, los anticuerpos secundarios son anticuerpos anti-especie y comprenden una marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.), y un anticuerpo terciario que está marcado se usa para depositar el resto detectable en la muestra. En algunos modos de realización, la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) de un primer anticuerpo primario y la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) de un segundo anticuerpo primario son iguales. En algunos modos de realización, las marcas (por ejemplo, haptenos, marcas de epítipos, etc.) de anticuerpos secundarios son las mismas. En algunos modos de realización, la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) de un primer anticuerpo primario y la marca (por ejemplo, un hapteno, marca de epítipo, etc.) de un segundo anticuerpo primario son diferentes. En algunos modos de realización, las marcas (por ejemplo, haptenos, marcas de epítipos, etc.) de los anticuerpos secundarios son diferentes. En algunos modos de realización, un primer anticuerpo secundario es el mismo que un segundo anticuerpo secundario excepto que los anticuerpos secundarios tienen marcadores detectables

diferentes. En algunos modos de realización, los anticuerpos terciarios son los mismos (por ejemplo, anti-marca, por ejemplo, anti-hapteno, por ejemplo, dirigidos a la misma marca/hapteno) pero difieren en los marcadores detectables.

## 5 Sistemas automatizados

Los procedimientos de la presente invención están automatizados. En algunos modos de realización, los procedimientos de la presente invención se realizan en un sistema cerrado (por ejemplo, un sistema automatizado), en el que los procedimientos no tienen etapas manuales. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, el término "sistema cerrado" se puede referir a un procedimiento automatizado preprogramado. El término "sistema cerrado" se puede referir a un procedimiento en el que cada etapa está automatizada, por ejemplo, cada etapa se realiza sin interrupción con una etapa manual. Por ejemplo, los procedimientos se pueden realizar en un sistema cerrado y la etapa de tratamiento termoquímico se integra en el sistema cerrado (el tratamiento termoquímico no es una etapa manual).

La presente invención también presenta sistemas programados para realizar los procedimientos de la presente invención. También se describe un teñidor de portaobjetos automatizado que no forma parte de la invención, el teñidor de portaobjetos automatizado programado para realizar los procedimientos divulgados. En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos automatizado comprende un procesador y una memoria acoplada al procesador. La memoria almacena instrucciones legibles por ordenador que, cuando se ejecutan por el procesador, hacen que el procesador realice diversas operaciones. Dichas operaciones pueden incluir pero no se limitan a: indicar al teñidor de portaobjetos para incubar o poner en contacto la muestra con al menos una primera PBE exógena (por ejemplo, anticuerpo primario, anticuerpo primario y anticuerpo secundario marcado) de manera que dé como resultado el depósito de la PBE en las proximidades de su diana; indicar al teñidor de portaobjetos para poner en contacto la muestra con reactivos de una manera que dé como resultado el depósito específico de un resto detectable en las proximidades de la PBE; indicar al teñidor de portaobjetos para poner en contacto la muestra con un volumen de solución que comprende un tampón citrato, la solución que comprende el tampón citrato está a una temperatura de tampón inicial que está por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón citrato; indicar al teñidor de portaobjetos para poner en contacto el sustrato sólido con una fuente térmica; e indicar al teñidor de portaobjetos para calentar la fuente térmica de una temperatura de fuente térmica inicial a al menos una temperatura de fuente térmica diana durante un período de tiempo, la solución que comprende el tampón citrato se eleva de la temperatura de tampón inicial a una segunda temperatura de tampón, en la que la temperatura de fuente térmica diana y la segunda temperatura de tampón están por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón citrato. En algunos modos de realización, las operaciones incluyen: indicar al teñidor de portaobjetos que repita el proceso con una segunda PBE o PBE adicionales. En algunos modos de realización, las operaciones incluyen: indicar al teñidor de portaobjetos que lave la muestra después del tratamiento termoquímico (por ejemplo, antes de la aplicación de una PBE posterior).

En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos comprende al menos un primer dosificador para dosificar la primera PBE sobre la muestra. En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos comprende al menos un segundo dosificador para dosificar la segunda PBE sobre la muestra. En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos comprende una pluralidad de dosificadores de anticuerpo. En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos comprende además un dosificador para dosificar la solución que comprende el tampón sobre la muestra. En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos comprende una fuente térmica (por ejemplo, almohadilla térmica). En algunos modos de realización, el teñidor de portaobjetos comprende un dosificador para dosificar un tampón de lavado sobre la muestra.

La presente invención también presenta un sistema que comprende un depósito de tampón adaptado para dosificar una solución que comprende un tampón sobre una muestra dispuesta en un portaobjetos; una fuente térmica; al menos un dosificador de anticuerpo (por ejemplo, un primer dosificador de anticuerpo para el primer anticuerpo primario, un segundo dosificador de anticuerpo para el segundo anticuerpo secundario, una pluralidad de dosificadores de anticuerpos, etc.) adaptado para poner en contacto la muestra con al menos un primer anticuerpo primario y un segundo anticuerpo primario; y un anticuerpo secundario que se puede unir tanto al primer anticuerpo primario como al segundo anticuerpo primario; y un módulo de control adaptado para indicar a los componentes (por ejemplo, el depósito de tampón, la fuente térmica, el dosificador de anticuerpo, etc.) que realicen un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. Los anticuerpos se pueden prediluir.

La presente descripción también presenta composiciones que no forman parte de la invención tales como composiciones que comprenden una muestra tisular marcada obtenida usando procedimientos de la presente invención. La presente descripción también presenta composiciones que comprenden un portaobjetos con una muestra tisular, en la que la muestra tisular comprende un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario y un marcador, en la que la muestra tisular se incuba a una temperatura de muestra diana o temperatura de muestra de calentamiento (por ejemplo, por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón) en presencia de una solución que comprende un tampón que tiene un pH de 5 o superior.

La presente invención también presenta procedimientos automatizados de marcaje múltiple. En algunos modos de

realización, los procedimientos comprenden calentar un portaobjetos que contiene una muestra celular marcada con un primer anticuerpo primario y un anticuerpo secundario que comprende un primer marcador detectable usando un tratamiento termoquímico como se describe en el presente documento. A continuación, la muestra celular termoinactivada se marca con un segundo anticuerpo primario y un segundo anticuerpo secundario que comprende un segundo marcador detectable. En algunos modos de realización, los anticuerpos secundarios difieren solo en la identidad del marcador detectable.

La presente invención también presenta procedimientos automatizados para el marcaje múltiple de una sola muestra celular. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden una pluralidad de etapas de marcaje y una etapa de termoinactivación realizada entre cada etapa de marcaje, en las que: cada etapa de marcaje comprende poner en contacto la muestra celular con un conjunto de uno o más anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios marcados detectablemente en condiciones suficientes para que cada anticuerpo primario se una específicamente a su diana y cada anticuerpo secundario se una al anticuerpo primario, en las que cada anticuerpo secundario se puede unir únicamente a un solo anticuerpo primario del conjunto; y cada etapa de termoinactivación es como se describe en el presente documento.

En algunos modos de realización, al menos dos de los conjuntos de anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios marcados detectablemente comprenden el mismo anticuerpo secundario que contiene un marcador detectable diferente. En algunos modos de realización, el mismo anticuerpo secundario es un anticuerpo secundario específico de especie. En algunos modos de realización, el mismo anticuerpo secundario es un anticuerpo específico de isotipo. En algunos modos de realización, el mismo anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-marca (por ejemplo, anticuerpo anti-hapteno, anticuerpo anti-marca de epítipo, etc.).

La presente invención también presenta un procedimiento para eliminar un par de anticuerpos primario/secundario en una muestra celular fijada. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende un procedimiento de tratamiento termoquímico de acuerdo con la presente invención.

Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los procedimientos y sistemas de la presente invención pueden ser beneficiosos para ensayos automatizados en dispositivos de tinción automatizados (por ejemplo, Ventana BenchMark, Dako, Leica Bond, etc.). Dichos dispositivos automatizados ya están adaptados para dosificar tampones y reactivos y para calentar muestras a diversas temperaturas (por ejemplo, 37 °C - 90 °C, 37 °C - 95 °C, 37 °C - 99 °C, etc.), mientras que dichos dispositivos automatizados no están adaptados para muestras de microondas o muestras térmicas a temperaturas muy altas tales como 130 °C.

Como se analiza previamente, los procedimientos de la presente invención están automatizados, por ejemplo, presentados en una máquina de tinción automatizada. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, en algunos modos de realización, el procedimiento no tiene que someter la muestra a microondas; en algunos modos de realización, el procedimiento no tiene tratamiento con vapor de formaldehído; en algunos modos de realización, el procedimiento no provoca deterioro en la calidad de la muestra.

Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los procedimientos de la presente invención utilizan tampones que no tienen alta osmolaridad, pH extremo y/o agentes caotrópicos. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los procedimientos de la presente invención ayudan a mantener la morfología del tejido y/o ayudan a reducir la reactividad cruzada si se usan anticuerpos primarios de la misma especie. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los procedimientos de la presente invención eliminan la necesidad de elegir un anticuerpo primario de diferentes especies. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los procedimientos de la presente invención permiten ensayos inmunohistoquímicos en sistemas de tinción de portaobjetos automatizados.

La presente invención se puede describir además por los ejemplos a continuación.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen ejemplos no limitantes de experimentos usando procedimientos, composiciones y sistemas de la presente invención.

Ejemplo 1: etapa de termoinactivación después de que se forma el complejo Ag/Ab 1.º/Ab 2.º: inactivar el complejo Ag/Ab 1.º/Ab 2.º en portaobjetos de amígdala. En el ejemplo 1, el antígeno es CD20, el anticuerpo primario es anti-CD20 de conejo y el anticuerpo secundario es anti-HRP de conejo caprino. Se usa la detección DAB (para detectar HRP de anticuerpo secundario). Diseño: después de la unión del anticuerpo primario (anti-CD20 de conejo), se aplica anti-HRP de conejo caprino, seguido de una etapa de tratamiento de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, etapa de tratamiento termoquímico, etapa de "termoinactivación"), y se usa la detección DAB. (El experimento de control no tuvo la etapa de termoinactivación antes de la etapa de detección DAB). Los resultados se muestran en la FIG. 2. La FIG. 2A muestra el experimento de control en el que no se usó ninguna etapa de termoinactivación entre la aplicación del anticuerpo secundario y la etapa de detección DAB. La FIG. 2B

muestra que una etapa de termoinactivación (en la que la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C; en este ejemplo, la almohadilla térmica/muestra estuvo a 95 °C durante aproximadamente 2,6 minutos y por encima de 90 °C durante aproximadamente 250 segundos) puede inactivar el complejo CD20/anti-CD20 de conejo/anti-HRP de conejo caprino. Cabe destacar que en este ejemplo, la máquina de tinción automatizada se programó para alcanzar una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C y el parámetro de programación para el ajuste de tiempo fue de 8 minutos. El ajuste de temperatura y tiempo en esta máquina de tinción automatizada en particular permitió que la almohadilla térmica/muestra estuviera a 95 °C durante aproximadamente 2,6 minutos y por encima de 90 °C durante aproximadamente 250 segundos. Cabe destacar que otras máquinas pueden requerir diferentes parámetros de programación para lograr temperaturas de fuente térmica diana (y duraciones) particulares, por ejemplo, para lograr una temperatura de fuente térmica de 95 °C durante aproximadamente de 2 a 3 minutos, algunas máquinas pueden necesitar un ajuste de tiempo mayor si la almohadilla térmica tiene una tasa de calentamiento lenta (por ejemplo, la almohadilla térmica puede necesitar más tiempo para alcanzar la temperatura de fuente térmica diana desde la temperatura de fuente térmica inicial). La presente invención no se limita a las temperaturas de fuente térmica diana, duraciones o parámetros de programación descritos en el presente documento. Una temperatura de fuente térmica diana de 90 °C (en la que la fuente térmica estuvo a 90 °C durante aproximadamente 2,5 minutos; la máquina se programó para estar a 90 °C y el ajuste de tiempo de la máquina fue de 8 minutos), y una temperatura de fuente térmica diana de 90 °C (en la que la fuente térmica estuvo a 90 °C durante aproximadamente 10,6 minutos; la máquina se programó para estar a 90 °C y el ajuste de tiempo de la máquina fue de 12 minutos) y una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C (en la que la fuente térmica estuvo a 95 °C durante aproximadamente 9,3 minutos; la máquina se programó para estar a 90 °C y el ajuste de tiempo de la máquina fue de 12 min) puede inactivar el complejo CD20/anti-CD20 de conejo/anti-HRP de conejo caprino (datos no mostrados). Cabe destacar que esta condición de termoinactivación puede indicar la pérdida de actividad enzimática de HRP, no necesariamente la desnaturalización/elución del complejo CD20/anti-CD20 de conejo/anti-HRP de conejo caprino.

Ejemplo 2: etapa de termoinactivación después de que se forma el complejo Ag/Ab 1.º (antes del Ab 2.º): inactivar el complejo Ag/Ab 1.º en portaobjetos de amígdala. En el ejemplo 2, el antígeno es CD20 y el anticuerpo primario es anti-CD20 de conejo. Diseño: se aplica anti-CD20 de conejo, seguido de una etapa de termoinactivación de acuerdo con la presente invención. A continuación, se aplica un anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino) seguido de una etapa de detección DAB. (El experimento de control no tuvo la etapa de termoinactivación después de la incubación del anticuerpo primario y antes de la incubación del anticuerpo secundario). Los resultados se muestran en la FIG. 3. La FIG. 1A muestra el experimento de control que no usó una etapa de termoinactivación después de la incubación del anticuerpo primario y antes de la incubación del anticuerpo secundario. La FIG. 3B muestra que una etapa de termoinactivación (una temperatura de fuente térmica diana de 100 °C durante 6 min) después de la aplicación del anticuerpo primario pero antes de la aplicación del anticuerpo secundario eliminó la tinción IHQ de CD20. En este ejemplo, la etapa de termoinactivación comprendió una temperatura de fuente térmica diana de 97 °C. La muestra estuvo a la temperatura de fuente térmica diana durante aproximadamente 90 segundos (la muestra también estuvo por encima de 90 °C durante aproximadamente 2,3 minutos). Cabe destacar que la máquina en realidad se programó a 100 °C, pero la temperatura real lograda fue de 97 °C.

Ejemplo 3: etapa de termoinactivación después de que se forma el complejo Ag/Ab 1.º/Ab 2.º: determinar si 100 °C durante 12 min puede inactivar el complejo Ag/Ab 1.º/Ab 2.º (por ejemplo, CD20/anti-CD20 de conejo/anti-HRP de conejo caprino) reapiando anti-HRP de conejo caprino después de la etapa de termoinactivación. Diseño: someter a prueba 3 concentraciones de Ab 1.º CD20 (1,04, 0,52 y 0,26 ug/ml) en casos de amígdala/colon. Los resultados se muestran en la FIG. 4. La FIG. 4A muestra un experimento de control sin etapa de termoinactivación (la concentración de anticuerpo fue de 1,04 ug/ml). La FIG. 4B muestra los resultados de una etapa de termoinactivación (temperatura de fuente térmica diana de 97 °C) realizada después de la aplicación de los anticuerpos primario y secundario pero antes de otra aplicación del anticuerpo secundario (y detección DAB posterior). La etapa de termoinactivación en la FIG. 4B inactivó el complejo Ag/Ab 1.º/Ab 2.º como se demuestra por la falta de tinción cuando se reapió anti-HRP de conejo caprino con detección DAB. Los resultados fueron los mismos cuando se usaron las otras concentraciones de anticuerpo (0,52 ug/ml o 0,26 ug/ml): la etapa de termoinactivación descrita anteriormente inactivó el complejo Ag/Ab 1.º/Ab 2.º ya que no se observó ninguna tinción cuando se reapió anti-HRP de conejo caprino con detección DAB (datos no mostrados).

Ejemplo 4.1: etapa de termoinactivación entre la detección de dos dianas (CD20 y FoxP3): determinar si las condiciones de termoinactivación pueden inactivar el complejo Ag-CD20 1.º/Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo/Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino pero permitir la detección de FoxP3 (Ag-FoxP3/Ab 1.º-Ab anti-FoxP3 de conejo/Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino/DAB), por ejemplo, demostrando señales FoxP3 y no señales CD20 en el 2.º ciclo de tinción. Diseño: aplicar el complejo Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo y Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino, a continuación realizar la etapa de termoinactivación (temperatura de fuente térmica diana de 97 °C), a continuación aplicar Ab 1.º-Ab anti-FoxP3 de conejo y Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino y posteriormente realizar una etapa de detección (por ejemplo, DAB). Los resultados se muestran en la FIG. 5. La FIG. 5A muestra la tinción de CD20 como control (sin etapa de termoinactivación, sin tinción de FoxP3). La FIG. 5B muestra la tinción de FoxP3 como control (sin etapa de termoinactivación, sin tinción de CD20). La FIG. 5C muestra los resultados de la tinción de FoxP3 cuando se usó la etapa de termoinactivación como se describe anteriormente (por ejemplo, después de que

se aplicaran los anticuerpos primario y secundario para CD20 pero antes de que se aplicara el anticuerpo primario para FoxP3). La FIG. 5C muestra que FoxP3 demostró una tinción comparable al control cuando se usó la etapa de termoinactivación como se describe anteriormente. Los resultados sugieren que el complejo Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo/Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino en el 1.º ciclo de tinción se inactivó con éxito, por lo tanto sin tinción de CD20 de la reactividad cruzada de *Ab 2.º-Ab anti-HRP de conejo caprino (2.º ciclo) a Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo (1.º ciclo)*. Los resultados también sugieren que el antígeno FoxP3 NO se vio afectado negativamente por la etapa de termoinactivación.

Ejemplo 4.2: etapa de termoinactivación entre la detección de dos dianas (CD20 y CD3): determinar si las condiciones de termoinactivación pueden inactivar el complejo Ag-CD20 1.º/Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo/Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino pero permitir la detección de CD3 (Ag-CD3 2.º/Ab 1.º-anti-CD3 de conejo/Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino/DAB), por ejemplo, demostrando señales CD3 y no señales CD20 en el 2.º ciclo de tinción. Diseño: aplicar el complejo Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo y Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino, a continuación realizar una etapa de termoinactivación (temperatura de fuente térmica diana de 97 °C), a continuación aplicar los reactivos del 2.º ciclo de tinción (Ab 1.º-anti-CD3 de conejo, Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino y DAB). Resultados: como FoxP3 en el ejemplo 4.1 y la FIG. 5, CD3 demostró una tinción comparable al control en la etapa de termoinactivación (datos no mostrados). Los resultados sugieren que el complejo Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo/Ab 2.º-anti-HRP de conejo caprino en el 1.º ciclo de tinción se inactivó con éxito, por lo tanto sin tinción de CD20 de la reactividad cruzada de *Ab 2.º-Ab anti-HRP de conejo caprino (2.º ciclo) a Ab 1.º-Ab anti-CD20 de conejo (1.º ciclo)*. Los resultados también sugieren que el antígeno CD3 NO se vio afectado negativamente por la etapa de termoinactivación.

Ejemplo 5: efecto de la etapa de termoinactivación sobre los antígenos (CD3, CD8, CD20, CD68 y FoxP3): evaluar si la etapa de termoinactivación tiene un impacto negativo sobre los antígenos. Diseño: se sometió a prueba de 1 a 5 ciclos de termoinactivación en la tinción IHQ de cada diana CD3, CD8, CD20, CD68 y FoxP3. La FIG. 6 muestra los resultados de 5 ciclos de una etapa de termoinactivación (temperatura de fuente térmica diana de 97 °C). La FIG. 6A muestra la tinción de control de CD3. La FIG. 6B muestra la tinción de CD3 después de 5 ciclos de la etapa de termoinactivación descrita anteriormente. La tinción de CD3 fue comparable a la del control (las etapas de termoinactivación no tuvieron un impacto negativo sobre la tinción de CD3). La FIG. 6C muestra la tinción de control de CD8. La FIG. 6D muestra la tinción de CD8 después de 5 ciclos de la etapa de termoinactivación descrita anteriormente. La tinción de CD8 fue comparable a la del control (las etapas de termoinactivación no tuvieron un impacto negativo sobre la tinción de CD8). La FIG. 6E muestra la tinción de control de CD68. La FIG. 6F muestra la tinción de CD68 después de 5 ciclos de la etapa de termoinactivación descrita anteriormente. La tinción de CD68 fue comparable a la del control (las etapas de termoinactivación no tuvieron un impacto negativo sobre la tinción de CD68).

Ejemplo 6.1: efecto de la etapa de termoinactivación sobre la detección de complejo en el núcleo: evaluar si la termoinactivación puede inactivar el complejo Ag-FoxP3/anti-FoxP3 de conejo/anti-HRP de conejo caprino en el núcleo (en muestras de colon). Diseño: someter a prueba diversas condiciones de termoinactivación: temperatura de fuente térmica diana de 95 °C (a 95 °C durante aproximadamente 2,5 minutos), temperatura de fuente térmica diana de 95 °C (a 95 °C durante aproximadamente 9,3 minutos), temperatura de fuente térmica diana de 100 °C (a 100 °C durante aproximadamente 90 segundos) y temperatura de fuente térmica diana 100 °C (a 100 °C durante más de 90 segundos). Se aplica el anticuerpo primario para FoxP3 (conejo) (1 ug/ml), a continuación se aplica el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino) seguido de una etapa de termoinactivación. A continuación, se reaplica el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino) seguido de detección (DAB). Resultados (no mostrados): las siguientes condiciones de termoinactivación inactivaron el complejo Ag-FoxP3/anti-FoxP3 de conejo/anti-HRP de conejo caprino (no se observó ninguna tinción de FoxP3): temperatura de fuente térmica diana de 95 °C (a 95 °C durante aproximadamente 2,5 minutos), temperatura de fuente térmica diana de 95 °C (a 95 °C durante aproximadamente 9,3 minutos), temperatura de fuente térmica diana de 100 °C (a 100 °C durante aproximadamente 90 segundos) y temperatura de fuente térmica diana de 100 °C (a 100 °C durante más de 90 segundos). Esto demuestra que una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C es suficiente (por ejemplo, durante aproximadamente 2,5 minutos, 9,3 minutos, etc.) ya que se demuestra que no hay tinción después de la etapa de termoinactivación. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, es posible que la abundancia del antígeno pueda dictar la dureza de la condición de termoinactivación necesaria a diferencia de la localización del antígeno (por ejemplo, membrana frente a núcleo). Por ejemplo, un antígeno de menor abundancia (por ejemplo, FoxP3) puede no necesitar condiciones de termoinactivación tan duras como un antígeno de alta abundancia (por ejemplo, CD20).

Ejemplo 6.2: efecto de la etapa de termoinactivación sobre la detección de complejo en el citoplasma: evaluar si la termoinactivación puede inactivar el complejo Ag-CD68/anti-CD68 de conejo/anti-HRP de conejo caprino en el citoplasma (en muestra de amígdala o colon). Diseño: someter a prueba diversas condiciones de termoinactivación. Se aplica el anticuerpo primario para CD68 (conejo) (1 ug/ml), a continuación se aplica el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino) seguido de una etapa de termoinactivación. A continuación, se reaplica el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino) seguido de detección (DAB). Resultados (no mostrados): las siguientes condiciones de termoinactivación inactivaron el complejo Ag-CD68/anti-CD68 de conejo/anti-HRP de conejo caprino (no se observó ninguna tinción de CD68): temperatura de fuente térmica diana

de 95 °C (a 95 °C durante aproximadamente 2,5 minutos), temperatura de fuente térmica diana de 95 °C (a 95 °C durante aproximadamente 9,3 minutos), temperatura de fuente térmica diana de 100 °C (a 100 °C durante aproximadamente 90 segundos) y temperatura de fuente térmica diana de 100 °C (a 100 °C durante más de 90 segundos). Esto demuestra que una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C es suficiente, ya que se demuestra que no hay tinción después de la etapa de termoinactivación. Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo, es posible que la abundancia del antígeno pueda dictar la dureza de la condición de termoinactivación necesaria a diferencia de la localización del antígeno (por ejemplo, membrana frente a núcleo). Por ejemplo, un antígeno de menor abundancia (por ejemplo, CD68) puede no necesitar condiciones de termoinactivación tan duras como un antígeno de alta abundancia (por ejemplo, CD20).

Ejemplo 7: evaluar si la termoinactivación con otros tampones (por ejemplo, tampón de reacción basado en Tris) tiene un impacto sobre los antígenos (por ejemplo, marcadores de membrana CD3, CD8 y CD20). Diseño: Etapa 1: aplicar la etapa de termoinactivación a la muestra (1 ciclo de la temperatura de fuente térmica diana de 95 °C usando el tampón de reacción basado en Tris). Etapa 2: realizar la IHQ habitual para los marcadores usando 6 ug/ml de CD3, CD8 o CD20 (conejo), a continuación anti-HRP de conejo caprino y DAB para la detección. Resultados (no mostrados): 1 ciclo de 95 °C durante 8 min con el tampón de reacción basado en Tris redujo la tinción de CD3, CD8 y CD20 en comparación con el control.

Ejemplo 8: evaluar la termoinactivación con tampón citrato y otros marcadores: para confirmar además la eficacia de la etapa de termoinactivación usando un tampón basado en citrato (por ejemplo, CC2 de Ventana Medical Systems, Inc.) en múltiples marcadores en múltiples tipos de tejido. Diseño: sometidos a prueba CD3 (SP162) en colon, HER2 (4B5) en mama, queratina 5 en CCE de cabeza y cuello, Ki-67 en mama, ER en mama, PDL1 (SP263) en CCE de cabeza y cuello.

**Tabla 2**

| Ab          | Nombre SP | localización celular | Kd             | procedimiento | Nota      |
|-------------|-----------|----------------------|----------------|---------------|-----------|
| PD-L1       | SP263     | membrana             | 1,5 x 10E-11 M | ELISA manual  |           |
| ER          | SP1       | núcleo               | 2 x 10E-10 M   | Biacore       | hibridoma |
| Queratina 5 | SP27      | citoplasma           | 1 x 10E-12 M   | Biacore       |           |

Los resultados se muestran en la FIG. 7. La FIG. 7A muestra la tinción de CD3 en la muestra de colon. El panel superior izquierdo muestra la tinción de CD3 de control. El panel superior derecho muestra un control en el que no se usó ningún anticuerpo primario para CD3. El panel inferior izquierdo muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 80 °C. El panel inferior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 85 °C. Ambas condiciones de termoinactivación fueron eficaces. La FIG. 7B muestra la tinción de HER2 en la muestra de mama. El panel superior izquierdo muestra la tinción de HER2 de control. El panel superior derecho muestra un control en el que no se usó ningún anticuerpo primario para HER2. El panel inferior izquierdo muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 80 °C. El panel inferior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 85 °C. Ambas condiciones de termoinactivación fueron eficaces. La FIG. 7C muestra la tinción de queratina 5 en la muestra de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC). El panel superior izquierdo muestra la tinción de queratina 5 de control. El panel superior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 90 °C. El panel inferior izquierdo muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 90 °C. El panel inferior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C. Las tres condiciones de termoinactivación fueron eficaces. La FIG. 7D muestra la tinción de Ki-67 en una muestra de mama. El panel superior izquierdo muestra la tinción de Ki-67 de control. El panel superior derecho muestra un control en el que no se usó ningún anticuerpo primario para Ki-67. El panel inferior izquierdo muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 80 °C. El panel inferior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 85 °C. Ambas condiciones de termoinactivación fueron eficaces. La FIG. 7E muestra la tinción de ER en una muestra de mama. El panel izquierdo muestra la tinción de ER de control. El panel central muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 90 °C. El panel derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 95 °C. Ambas condiciones de termoinactivación fueron eficaces. La FIG. 7F muestra la tinción de PDL1 en una muestra de CCECC. El panel superior izquierdo muestra la tinción de PDL1 de control. El panel superior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 80 °C. El panel inferior izquierdo muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 85 °C. El panel inferior derecho muestra los resultados cuando la etapa de termoinactivación usó una temperatura de fuente térmica diana de 90 °C. Las tres condiciones de termoinactivación fueron eficaces.

**Ejemplo 9: evaluar la eficacia de la termoinactivación en la detección de TSA conjugada con fluoróforo:** confirmar que una condición de termoinactivación (tampón citrato (CC2), temperatura de fuente térmica diana de 97 °C) funciona en la detección de TSA conjugada con fluoróforo (TSA-fluoróforos) (además de la detección DAB como se describe anteriormente). Diseño: se aplica el anticuerpo primario para CD20 (conejo, marcador de membrana) (1 ug/ml), a continuación se aplica el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino) seguido de un ciclo de una etapa de termoinactivación (usando tampón citrato (CC2) con una temperatura de fuente térmica diana de 97 °C). A continuación, se aplica el anticuerpo primario para FoxP3 (conejo, marcador de núcleos) (1 ug/ml), y a continuación se aplica el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo caprino), seguido de detección TSA-Cy5. Cabe destacar el uso del mismo anticuerpo secundario. La FIG. 8 muestra los resultados. La FIG. 8A muestra la tinción de control de CD20. La FIG. 8B muestra la tinción de FoxP3 de control. La FIG. 8C muestra la tinción de FoxP3 después de que se realizara la etapa de termoinactivación como se describe anteriormente. La etapa de termoinactivación descrita anteriormente (tampón citrato (CC2), temperatura de fuente térmica diana de 97 °C) inactivó el complejo CD20/GaR-HRP, como se demuestra por la presencia solo de tinción de núcleos (FoxP3). No se observó ninguna tinción de membrana, lo que habría sido indicativa de CD20.

**Ejemplo 10: IHQ fluorescente múltiple 5-ple (usando anticuerpos primarios de la misma especie y anticuerpos secundarios anti-especie).** Se aplicaron condiciones de termoinactivación (temperatura de fuente térmica diana de 90 °C durante 5 min) a un ensayo IHQ fluorescente 5-ple (CD3, CD8, CD20, CD68, FoxP3) (en una muestra de amígdala) usando anticuerpos primarios de conejo para cada marcador, anti-HRP de conejo caprino para los anticuerpos secundarios de cada marcador, y TSA conjugada con fluoróforo (TSA-fluoróforos) para la detección (TSA-DCC para CD3, TSA-Texas Red para CD8, TSA-FITC para CD20, TSA-R6G para CD68 y TSA-Cy5 para FoxP3). Resultados (no mostrados): el ciclo inicial de 5-ple completamente automatizados con anticuerpos primarios de la misma especie por etapas de termoinactivación mostró que funcionaba.

**Ejemplo 11: evaluación de la etapa de termoinactivación en el ensayo múltiple con PD-L1:** se usó la muestra de CPNM (caso CPNM 150637) para ensayos múltiples usando el clon de anticuerpo para PD-L1 SP142 a 7 µg/ml. Se sometió a prueba el anticuerpo para PD-L1 en diferentes posiciones en un ensayo múltiple (5-ple) (por ejemplo, la 3.ª posición, la 4.ª posición). La tabla 3 a continuación enumera 14 experimentos diferentes realizados. PD-L1 estuvo en la posición 3 en los experimentos 1-3, 7-9 y 13. PD-L1 estuvo en la posición 4 en los experimentos 2-6, 10-12 y 14. Cabe destacar que 90103 (usado como los otros "anticuerpos" (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5)) es el diluyente del anticuerpo para PD-L1 (pero sin anticuerpo para PD-L1). La eficacia del proceso de termoinactivación se evaluó con R6G, una molécula fluorescente con alta sensibilidad y baja autofluorescencia, y las posibles moléculas fluorescentes posteriores de cianina 5 (Cy5) e isotiocianato de fluoresceína (FITC). Como se muestra en la tabla 3, la "molécula de detección" usada en la 1.ª detección (Fluor1) fue citrato, y en la 2.ª detección (Fluor2) y 3.ª detección (Fluor3) fue tiramida (amplificación de señal de tiramida, TSA). Los experimentos 1, 4, 7, 10, 13 y 14 usaron un tiempo de incubación de PD-L1 de 16 minutos. Los experimentos 2, 5, 8 y 11 usaron un tiempo de incubación de PD-L1 de 24 minutos.

Los experimentos 3, 6, 9 y 12 usaron un tiempo de incubación de PD-L1 de 32 minutos.

**Tabla 3**

|    | PDL1 Inc. | Ab1   | Fluor1  | Ab2   | Fluor2   | Ab3   | Fluor3   | Ab4   | Fluor4   | Ab5   | Fluor5   | Objetivo                          |
|----|-----------|-------|---------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-----------------------------------|
| 1  | 16        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | R6G      | 90103 | Dil. TSA | PD-L1 en 3, HD eval. por R6G      |
| 2  | 24        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | R6G      | 90103 | Dil. TSA |                                   |
| 3  | 32        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | R6G      | 90103 | Dil. TSA |                                   |
| 4  | 16        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | R6G      | PD-L1 en 4, HD eval. por R6G      |
| 5  | 24        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | R6G      |                                   |
| 6  | 32        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | R6G      |                                   |
| 7  | 16        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | Cy5      | 90103 | FITC     | PD-L1 en 3, HD eval. por Cy5/FITC |
| 8  | 24        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | Cy5      | 90103 | FITC     |                                   |
| 9  | 32        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | Cy5      | 90103 | FITC     |                                   |
| 10 | 16        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | FITC     | PD-L1 en 4, HD eval. por FITC     |
| 11 | 24        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | FITC     |                                   |
| 12 | 32        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | PDL1  | Dil. TSA | 90103 | FITC     |                                   |
| 13 | 16        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | 90103 | R6G      | 90103 | Dil. TSA | R6G autoFL                        |
| 14 | 16        | 90103 | Citrato | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | 90103 | Dil. TSA | 90103 | R6G      | Ctrl                              |

La FIG. 9 muestra los resultados del experimento 3 de la tabla 3. La FIG. 9A muestra tinción de DAPI (tinción nuclear). La FIG. 9B muestra autofluorescencia (DCC) (exposición de 100 ms). La FIG. 9C muestra la tinción

positiva de PD-L1 (otro portaobjetos) con R6G (la tinción muestra los contornos de las membranas). La FIG. 9D muestra la tinción de PD-L1 usando R6G después de una etapa de termoinactivación/desactivación térmica de la presente invención (exposición de 500 ms). Incluso con un tiempo de exposición prolongado de 500 ms, no se detectó ninguna señal de reacción cruzada por encima del nivel de fondo autofluorescente. Los resultados fueron los mismos para el experimento 6 y el experimento 9 de la tabla 1 (datos no mostrados).

Cabe destacar que la presente invención no se limita al anticuerpo para PD-L1 particular usado en el presente documento. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el anticuerpo para PD-L1 es el clon SP263. Además, la presente invención no se limita a los tiempos de incubaciones particulares usados en el presente documento (por ejemplo, 16 minutos, 24 minutos, 32 minutos). En algunos modos de realización, el anticuerpo se incuba durante menos de 16 minutos (por ejemplo, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 15 minutos). En algunos modos de realización, el anticuerpo se incuba durante más de 16 minutos (por ejemplo, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos, 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos, 30 minutos, 31 minutos). En algunos modos de realización, el anticuerpo se incuba durante más de 32 minutos.

Las condiciones óptimas para el tratamiento termoquímico (desactivación térmica) pueden depender de varios factores. Por ejemplo, un sistema de detección de mayor sensibilidad (por ejemplo, TSA, FITC) se puede beneficiar del uso de condiciones HD más rigurosas. En algunos modos de realización, las condiciones de HD más rigurosas pueden ser beneficiosas si un marcador particular se expresa altamente en un tejido o muestra particular. En algunos modos de realización, las condiciones de HD más rigurosas pueden ser beneficiosas si el complejo anticuerpo-diana es muy estable. Por tanto, los estudios específicos de anticuerpos/marcadores pueden ser útiles para determinar las condiciones de tratamiento termoquímico (desactivación térmica) óptimas.

El alcance de la invención solo se limita por las siguientes reivindicaciones. Los números de referencia enumerados en las reivindicaciones son ejemplares y solo para facilitar la revisión por la oficina de patentes, y no son limitantes de ninguna manera. En algunos modos de realización, las figuras presentadas en la presente solicitud de patente se dibujan a escala, incluyendo los ángulos, proporciones de dimensiones, etc. En algunos modos de realización, las figuras son solo representativas y las reivindicaciones no se limitan por las dimensiones de las figuras. En algunos modos de realización, las descripciones de las invenciones descritas en el presente documento que usan la frase "que comprende" incluyen modos de realización que se podrían describir como "que consiste en" y, como tal, se cumple el requisito de descripción escrita para reivindicar uno o más modos de realización de la presente invención que usan la frase "que consiste en".

Los números de referencia enumerados en las reivindicaciones a continuación son únicamente para facilitar el examen de la presente solicitud de patente, y son ejemplares, y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de las reivindicaciones a los rasgos característicos particulares que tienen los correspondientes números de referencia en los dibujos.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento automatizado para detectar al menos dos dianas en la misma muestra en un solo sustrato sólido, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 a. poner en contacto la muestra con al menos una primera entidad de unión proteínica (PBE) exógena de manera que dé como resultado el depósito de la primera PBE en las proximidades de su diana;
- 10 b. poner en contacto la muestra con reactivos de manera que dé como resultado el depósito específico de un resto detectable en las proximidades de la primera PBE; y
- c. tratar la muestra para reducir la capacidad de la primera PBE para detectarse además en la muestra
- 15 poniendo en contacto la muestra con un volumen de solución que comprende un tampón citrato con un pH de 5 a 7 y poner en contacto el sustrato sólido con una fuente térmica, el volumen de solución cubre la muestra en una proporción de volumen con respecto a área de superficie de  $5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  a  $500 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , la solución que comprende el tampón citrato está a una temperatura de tampón inicial que está por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón citrato; y
- 20 calentando la fuente térmica de una temperatura de fuente térmica inicial a al menos una temperatura de fuente térmica diana durante un período de tiempo, la solución que comprende el tampón citrato se eleva de la temperatura de tampón inicial a una segunda temperatura de tampón, la temperatura de fuente térmica diana y la segunda temperatura de tampón están por debajo del punto de ebullición de la solución que comprende el tampón citrato;
- 25 d. repetir (a) y (b) con al menos una segunda PBE; y
- e. repetir (c) entre cada repetición de (a) y (b);
- 30 en el que después de (d), cada resto detectable se puede detectar en la muestra en una localización que corresponde a la localización de la diana de la PBE.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el calor de la fuente térmica calienta el sustrato sólido y la muestra, y el calor del sustrato sólido y la muestra calienta el tampón.
- 35 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución que comprende el tampón citrato tiene un pH de 5 a 6,5.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de tampón inicial es de  $18^\circ\text{C}$  a  $42^\circ\text{C}$ .
- 40 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de fuente térmica inicial es de  $18^\circ\text{C}$  a  $42^\circ\text{C}$ .
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de fuente térmica diana es de al menos  $80^\circ\text{C}$ .
- 45 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana a una tasa de 5 a 15 grados Celsius por minuto.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución que comprende el tampón citrato tiene una concentración de citrato de 5 mM a 20 mM o en el que la solución que comprende el tampón citrato comprende además un tensioactivo o en el que el volumen de solución es un charco independiente.
- 50 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fuente térmica está a o por encima de la temperatura de fuente térmica diana durante al menos 15 segundos o en el que el período de tiempo en que la fuente térmica se calienta de la temperatura de fuente térmica inicial a al menos la temperatura de fuente térmica diana es de al menos 3 minutos.
- 55 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera PBE comprende un primer anticuerpo primario y (b) comprende incubar la muestra con un primer anticuerpo secundario específico para el primer anticuerpo primario de manera que dé como resultado el depósito específico del primer anticuerpo secundario en las proximidades del primer anticuerpo primario; y una segunda PBE comprende un segundo anticuerpo primario y (d) comprende incubar la muestra con un segundo anticuerpo secundario específico para el segundo anticuerpo primario de manera que dé como resultado el depósito específico del segundo anticuerpo secundario en las proximidades del segundo anticuerpo primario.
- 60 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el primer anticuerpo primario comprende una marca.
- 65

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento se realiza en un sistema cerrado.

13. Un sistema que comprende:

5

a. un depósito de tampón adaptado para dosificar un tampón citrato sobre una muestra dispuesta en un portaobjetos;

10

b. una fuente térmica adaptada para calentar el portaobjetos con la muestra, calentándose la fuente térmica de una temperatura de fuente térmica inicial a una temperatura de fuente térmica diana;

c. al menos un dosificador de anticuerpo adaptado para poner en contacto la muestra con

15

i. al menos un primer anticuerpo primario y un segundo anticuerpo primario; y

ii. un anticuerpo secundario que se puede unir tanto al primer anticuerpo primario como al segundo anticuerpo primario; y

20

d. un módulo de control adaptado para indicar a (a)-(c) que realice un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

14. El sistema de la reivindicación 13, en el que el sistema comprende un primer dosificador de anticuerpo para el primer anticuerpo primario y un segundo dosificador de anticuerpo para el segundo anticuerpo secundario y un tercer dosificador de anticuerpo para el anticuerpo secundario.

25

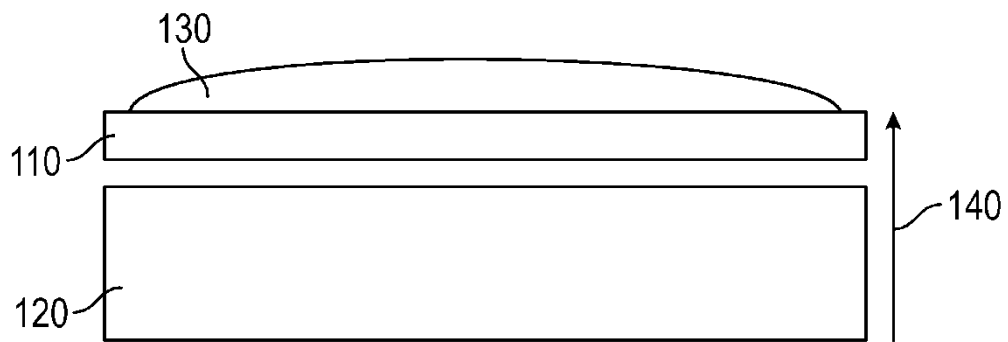


FIG. 1A

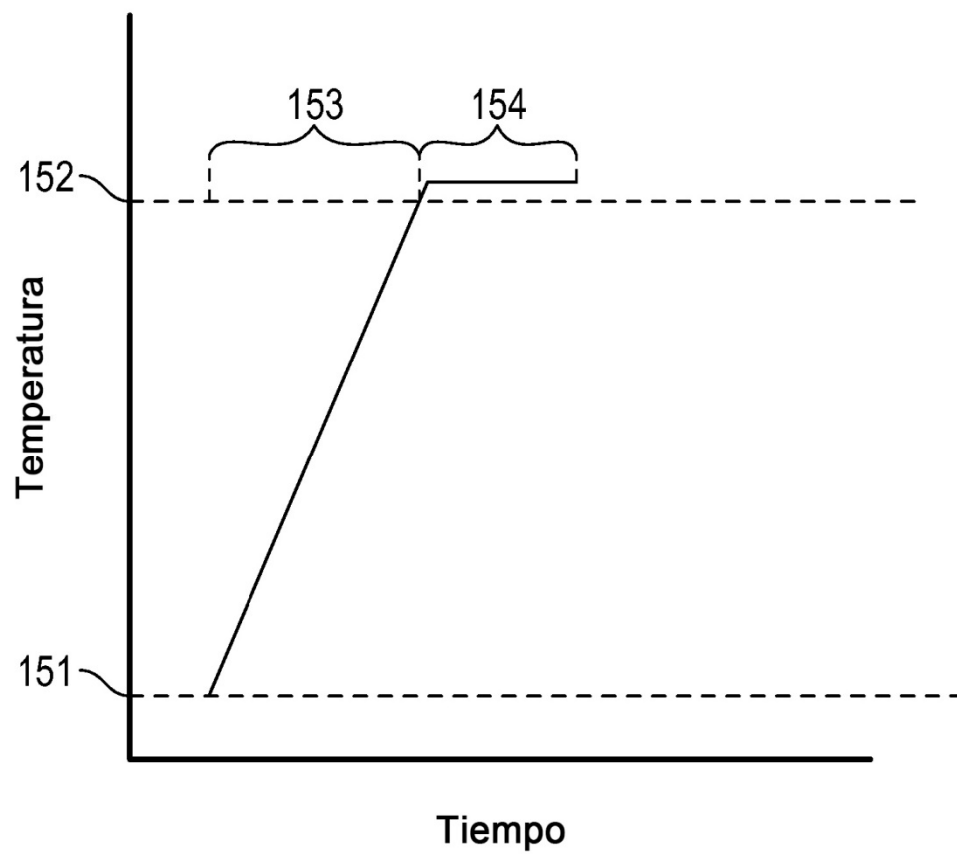
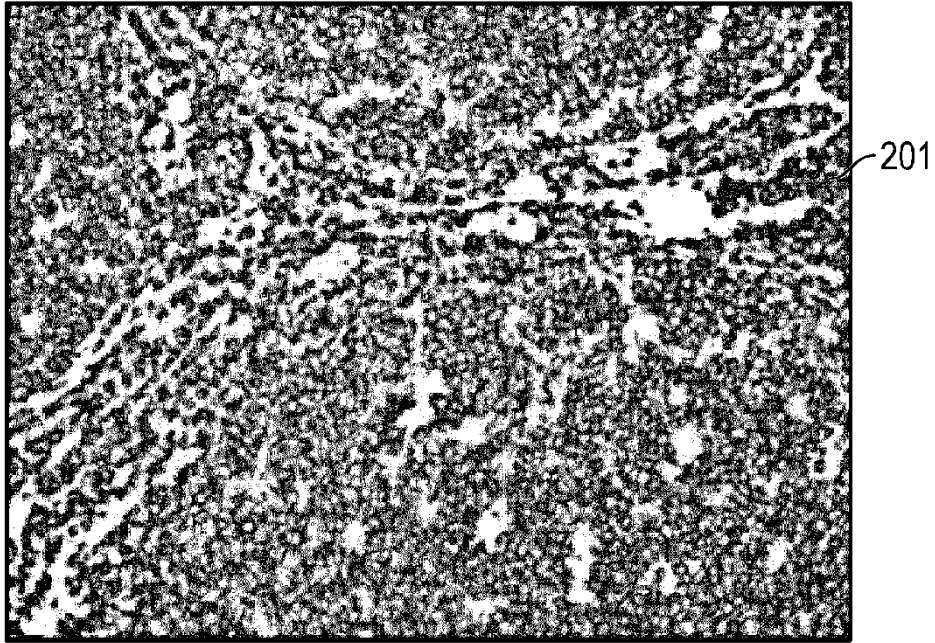
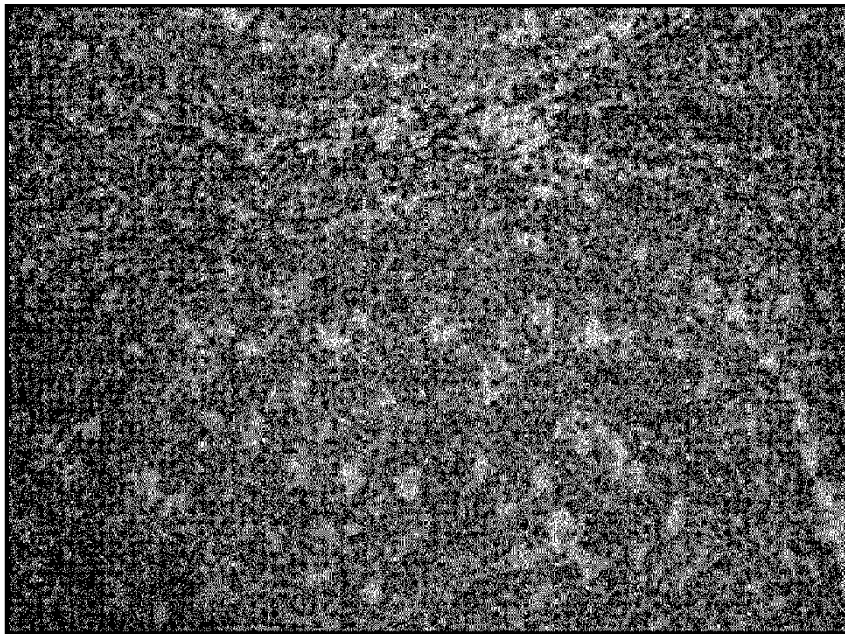


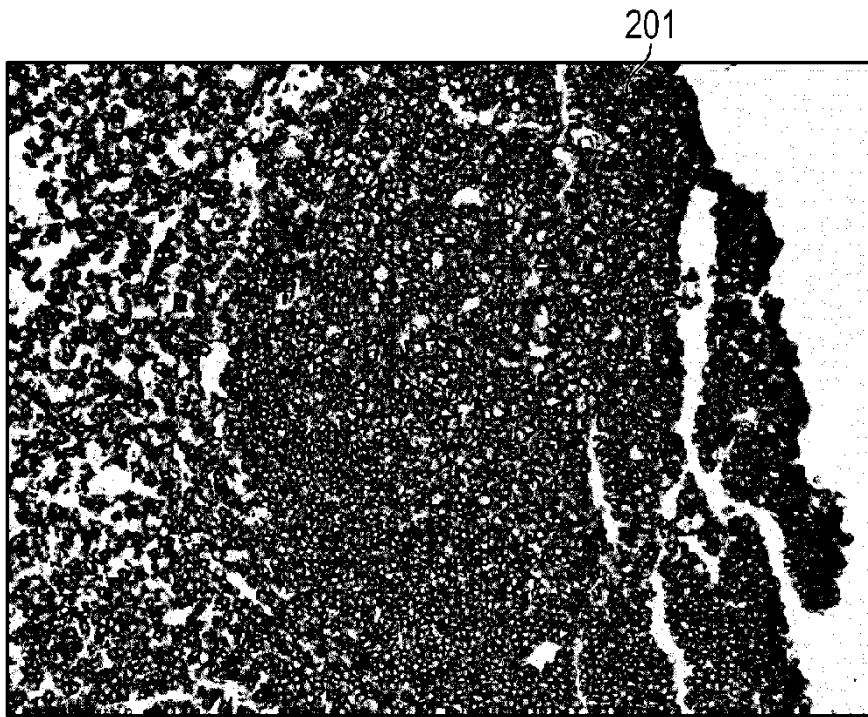
FIG. 1B



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

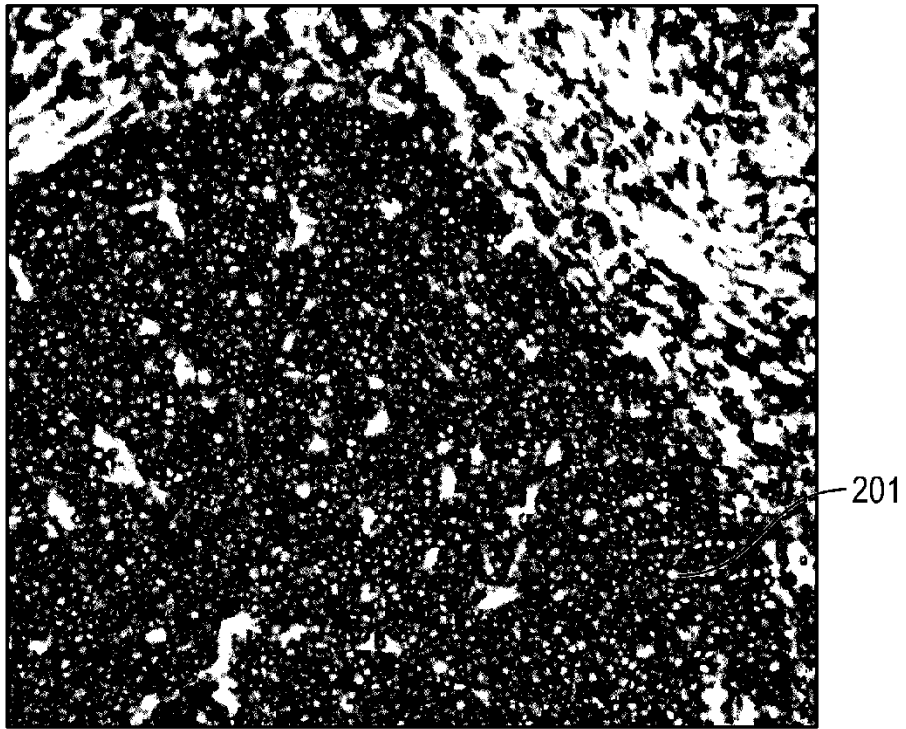


FIG. 4A

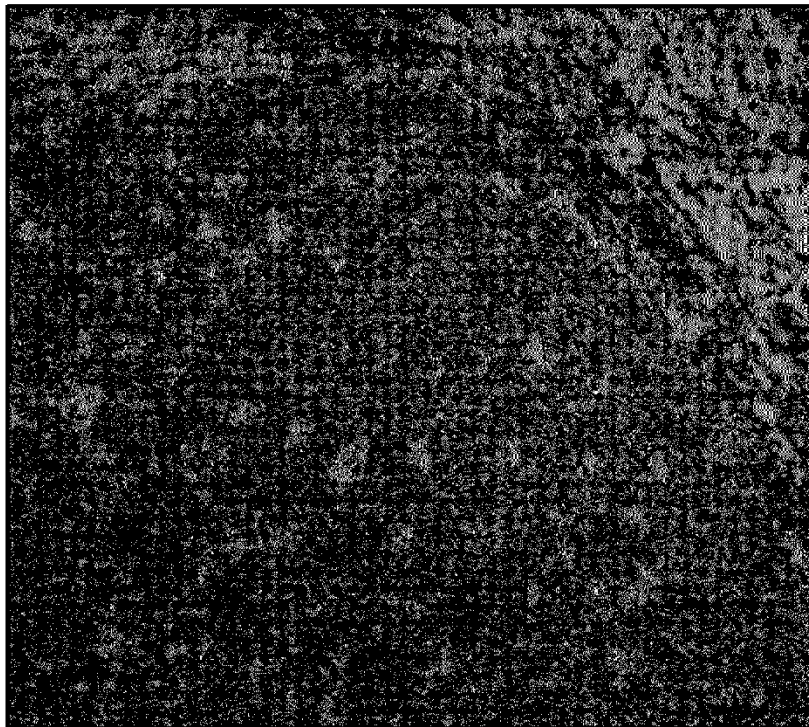
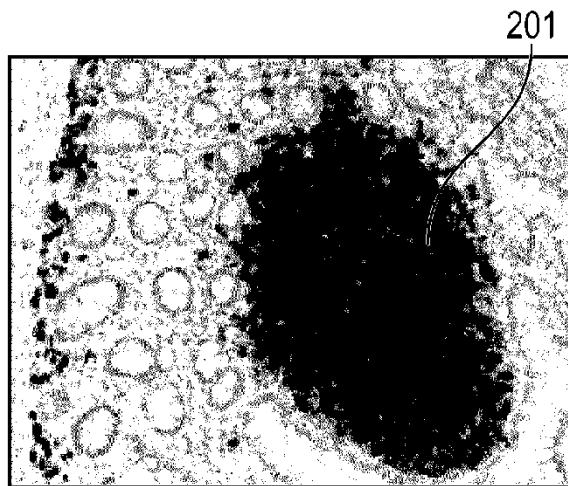
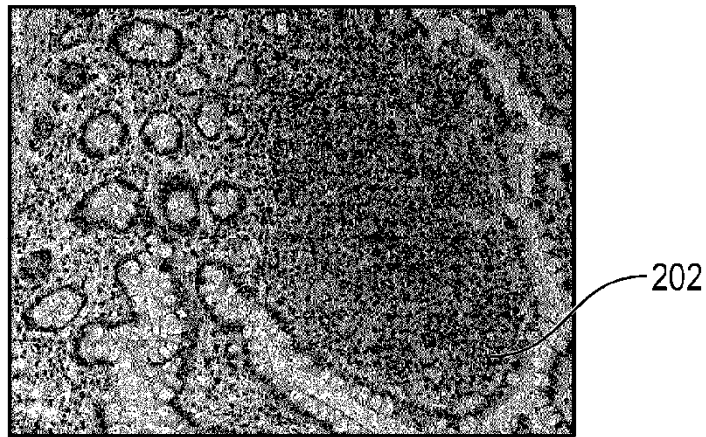


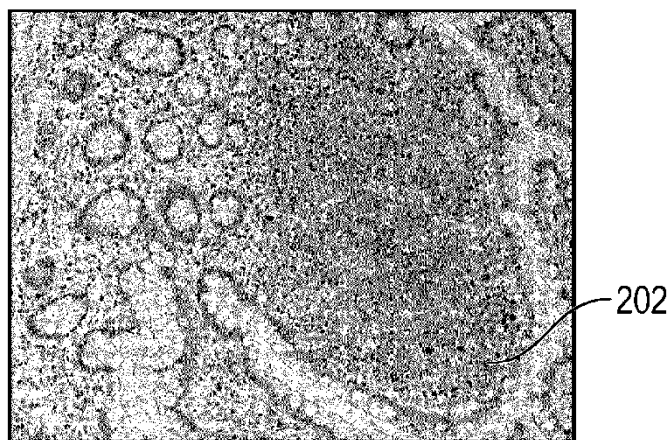
FIG. 4B



**FIG. 5A**



**FIG. 5B**



**FIG. 5C**



FIG. 6A

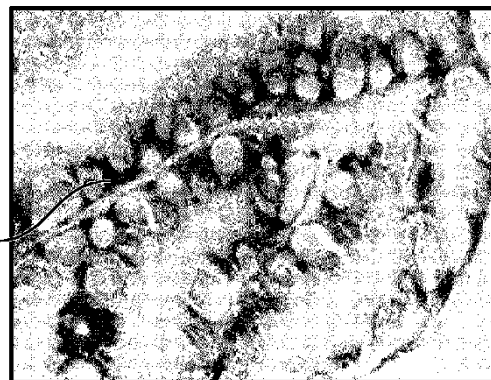


FIG. 6B



FIG. 6C

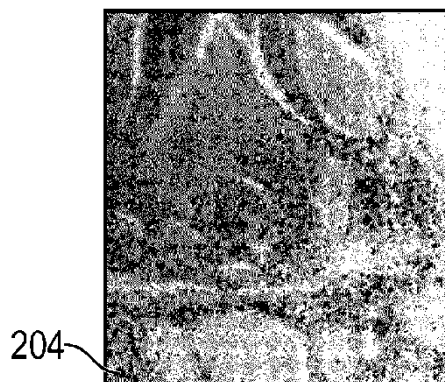


FIG. 6D



FIG. 6E

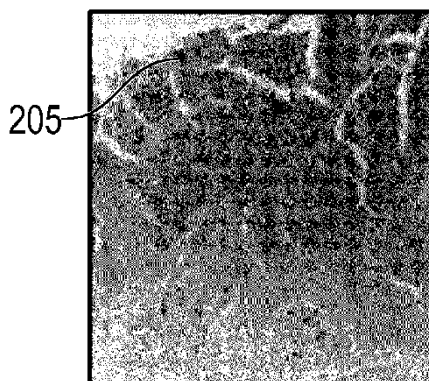


FIG. 6F

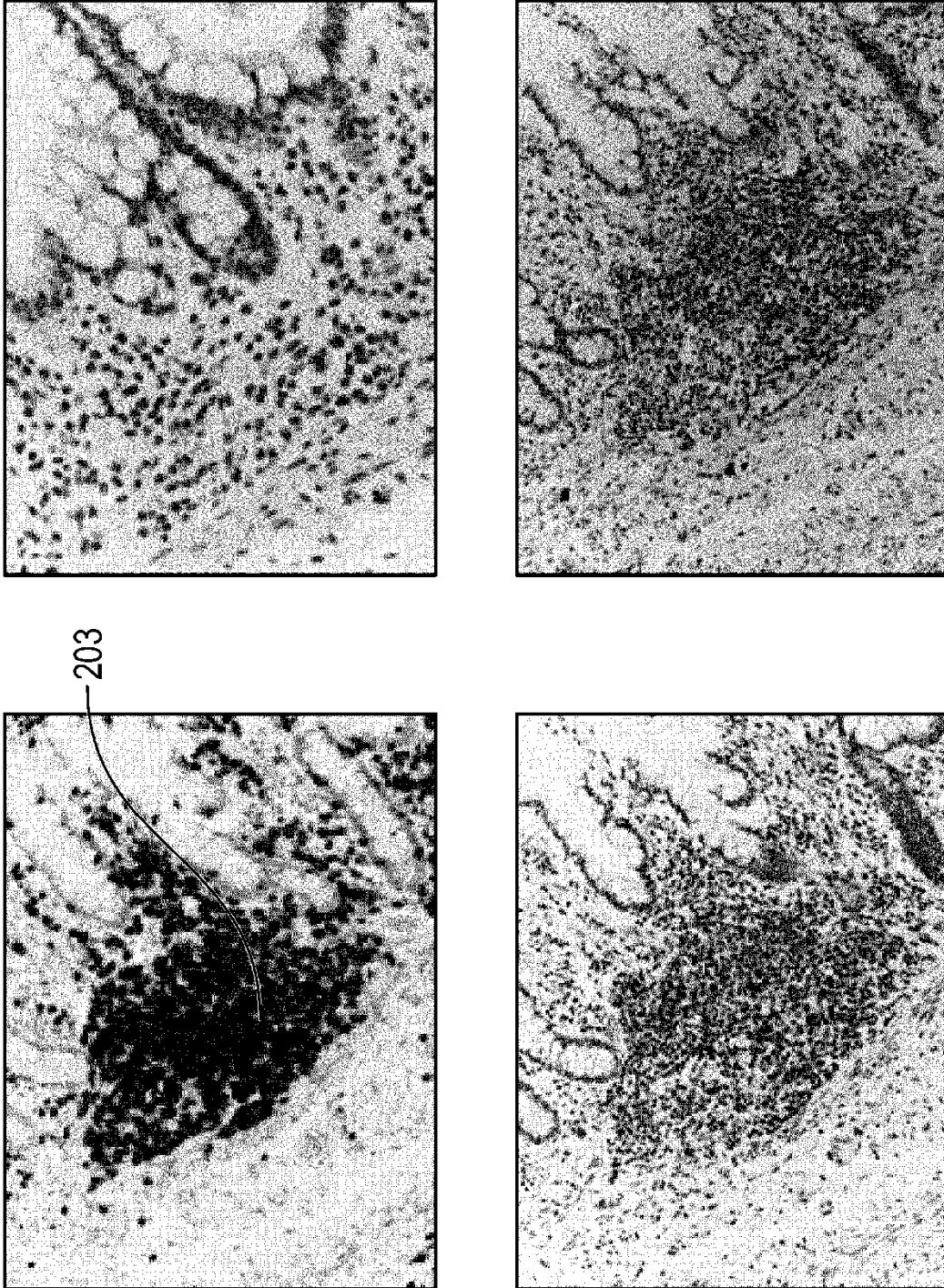


FIG. 7A

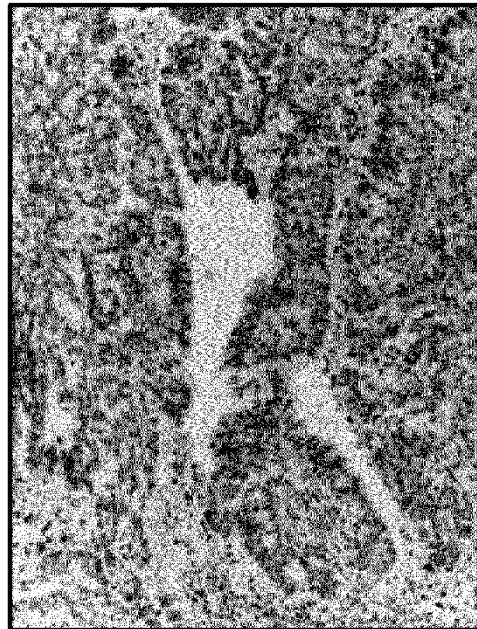
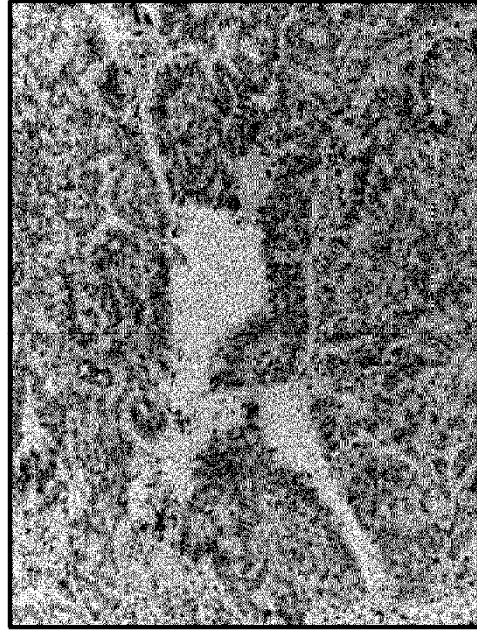


FIG. 7B

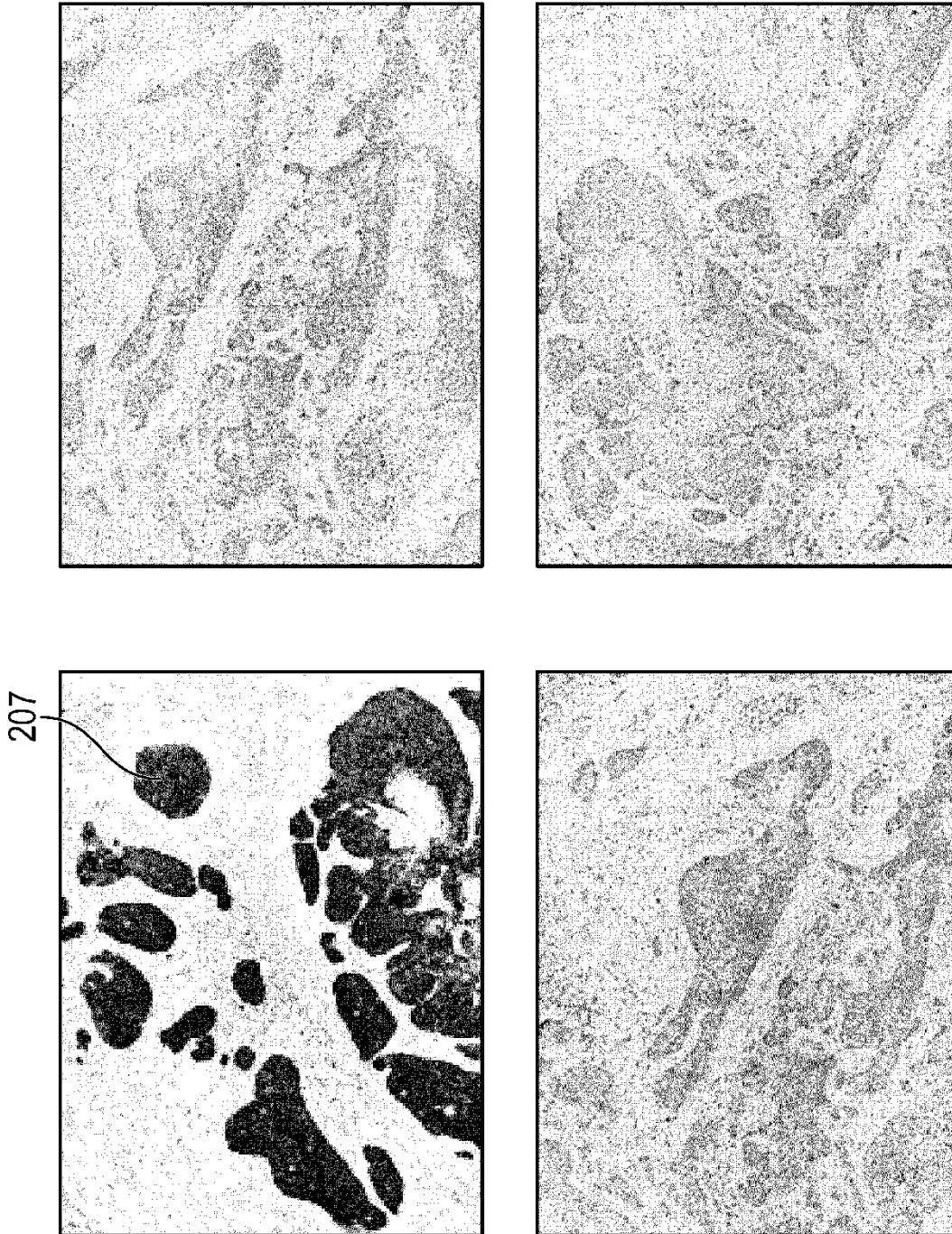


FIG. 7C

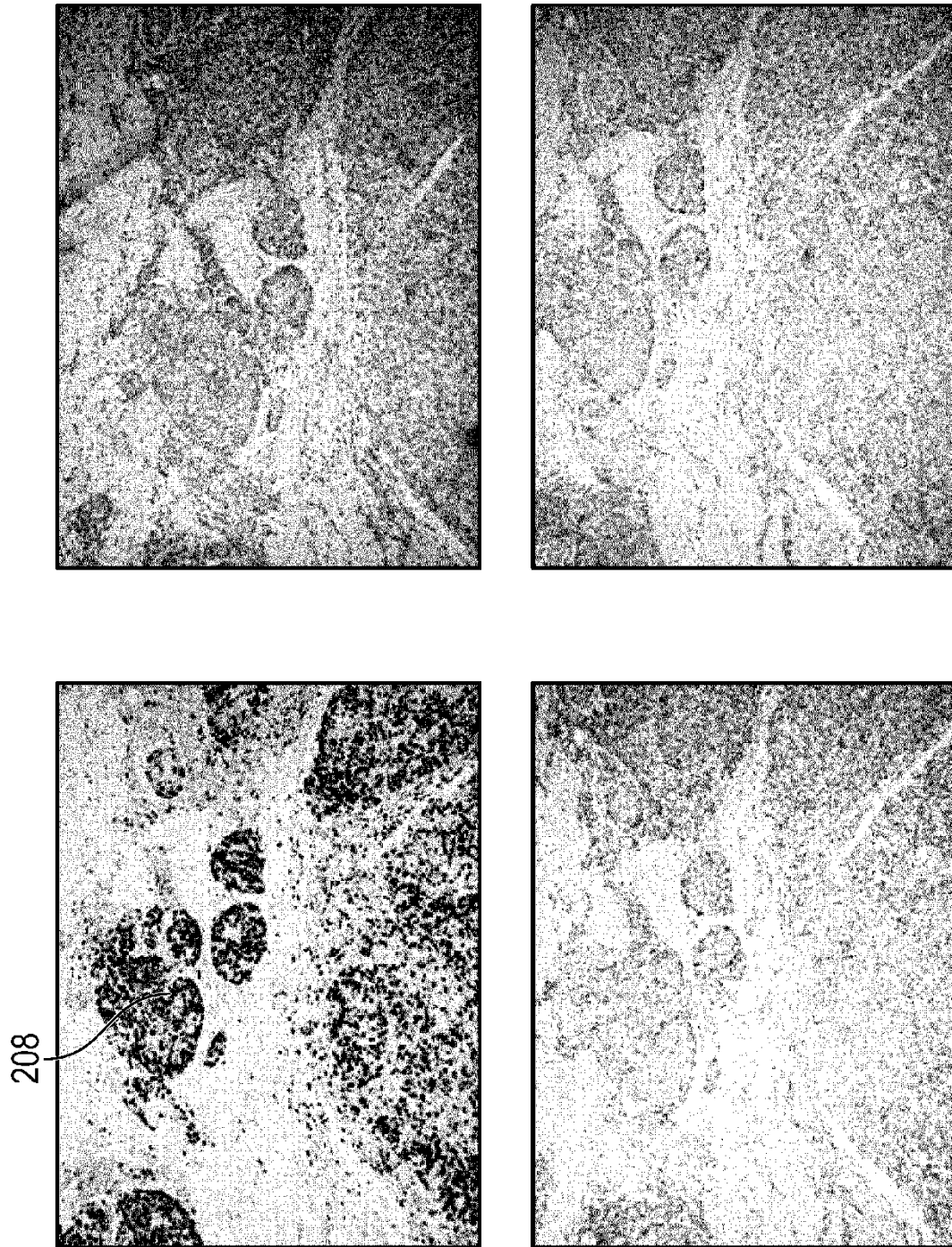


FIG. 7D

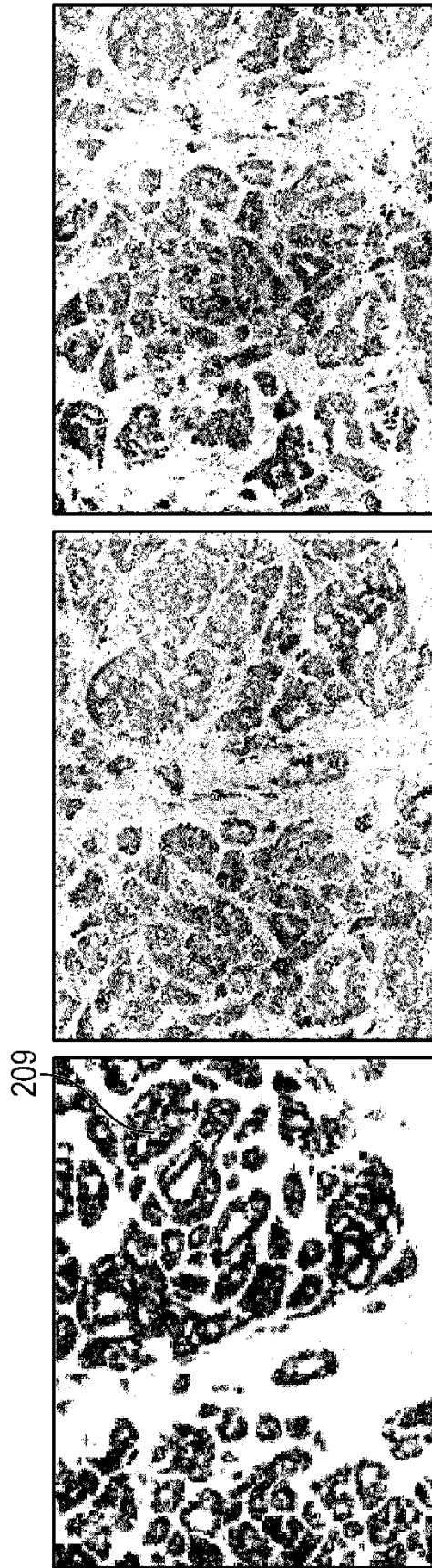


FIG. 7E

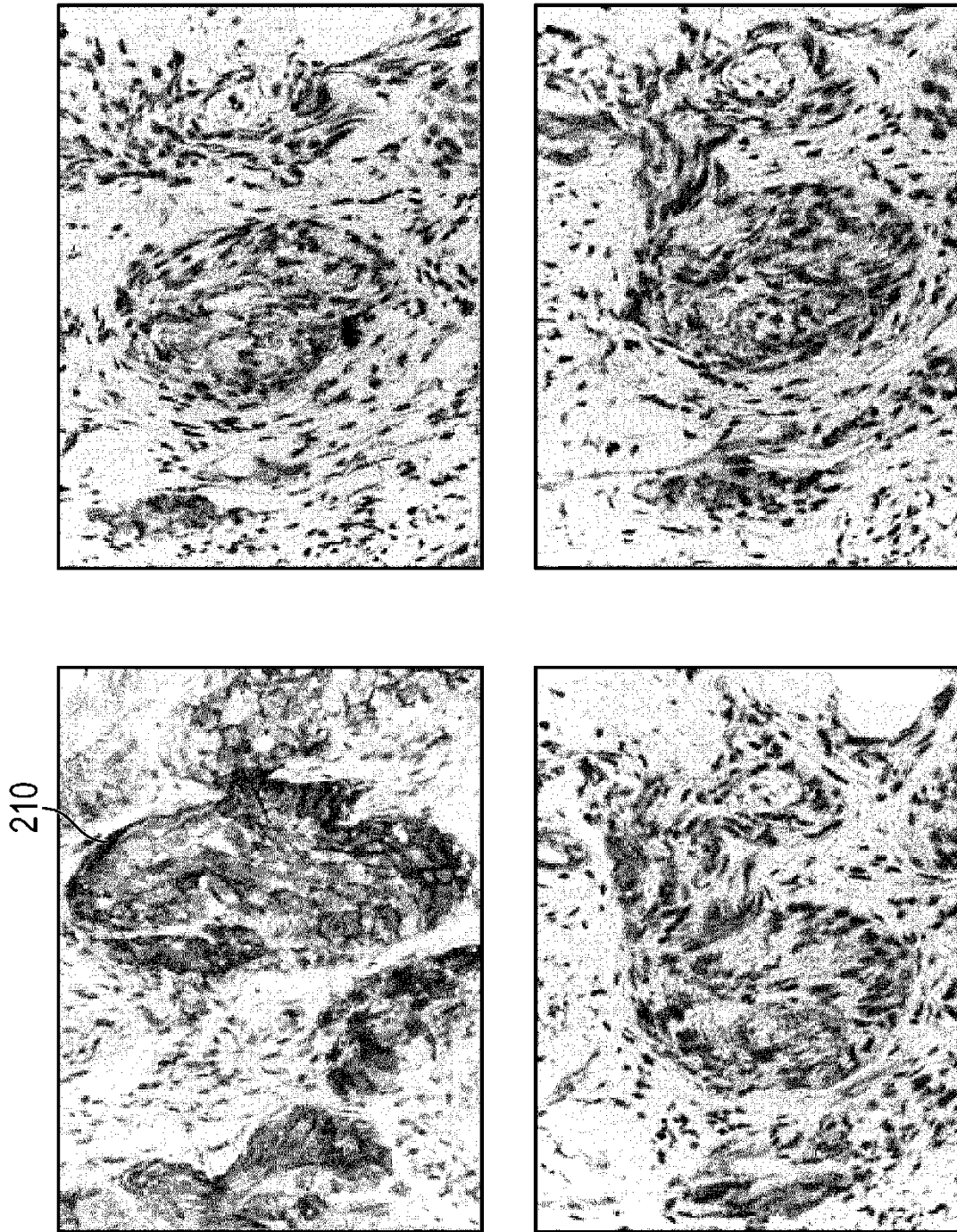


FIG. 7F

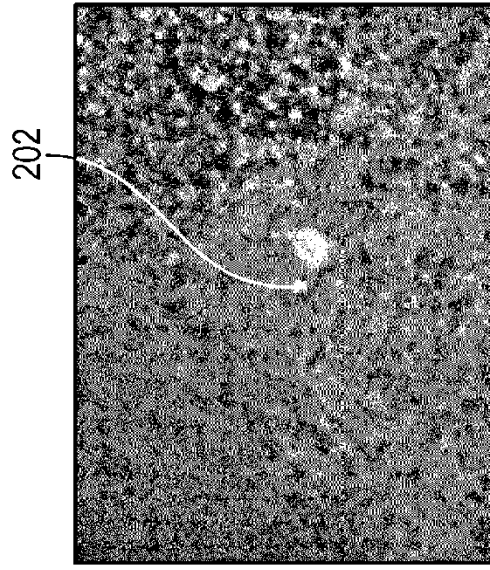


FIG. 8C

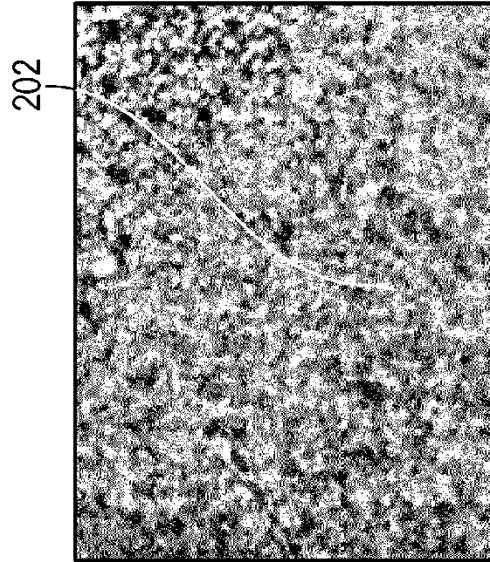


FIG. 8B

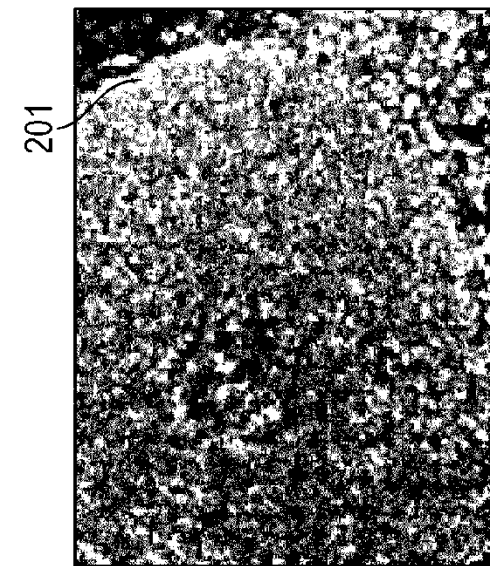


FIG. 8A

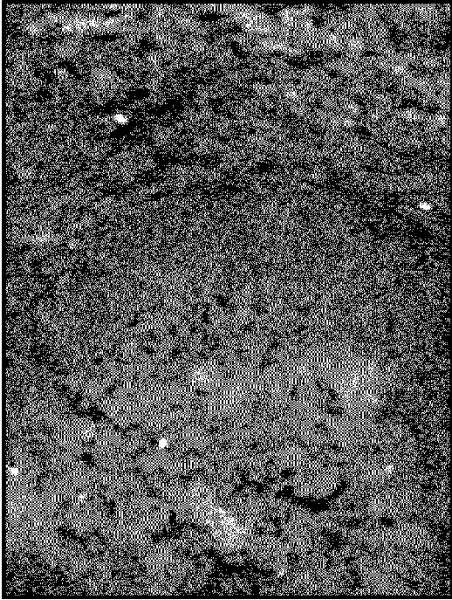


FIG. 9B

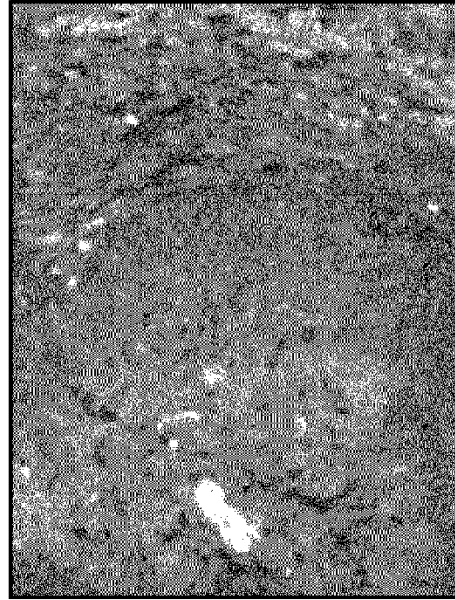


FIG. 9D

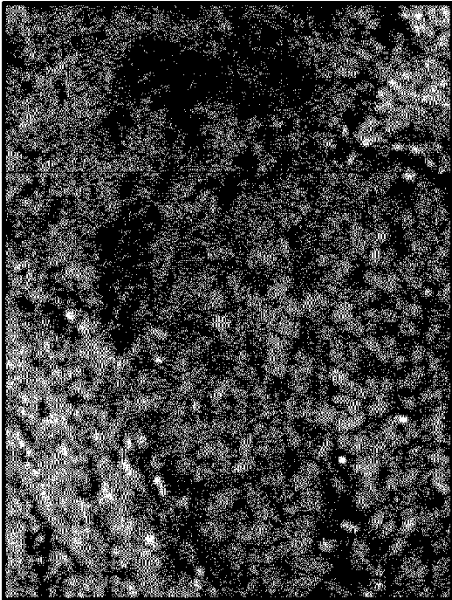


FIG. 9A

212

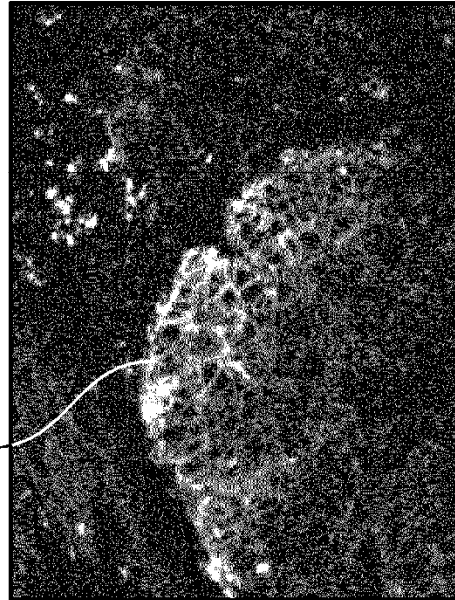


FIG. 9C

211