



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014015603-4 B1



(22) Data do Depósito: 03/12/2012

(45) Data de Concessão: 28/04/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA SONDAGEM DE MÚLTIPLOS ALVOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E PARA ANÁLISE DA AMOSTRA BIOLÓGICA DE MULTIPLEXAÇÃO DE ALTA PRODUTIVIDADE.

(51) Int.Cl.: C12Q 1/48.

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2011 US 13/336409.

(73) Titular(es): GENERAL ELECTRIC COMPANY.

(72) Inventor(es): ARUNKUMAR NATARAJAN; ANUP SOOD; LAKSHMI SIREESHA KANUMALLE; KWOK PONG CHAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2012067527 de 03/12/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/095896 de 27/06/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/06/2014

(57) Resumo: MÉTODOS PARA SONDAGEM DE MÚLTIPLOS ALVOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E PARA ANÁLISE DA AMOSTRA BIOLÓGICA DE MULTIPLEXAÇÃO DE ALTA PRODUTIVIDADE Métodos que compreendem o uso de branqueamento químico fotoativado para a detecção de múltiplos alvos em uma amostra biológica são fornecidos. Os métodos incluem as etapas de proporcionar uma amostra biológica, incluindo múltiplos alvos, ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal a partir da sonda. O método inclui ainda as etapas de contactar a amostra que compreende a sonda ligada a um reagente de transferência de elétrons e irradiar a amostra, iniciando-se assim uma fotorreação que inativa substancialmente a sonda por branqueamento químico fotoativado. O método inclui ainda as etapas de ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal a partir da sonda. O processo de ligação, observação e branqueamento pode ser iterativamente repetido.

“MÉTODOS PARA SONDAÇÃO DE MÚLTIPLOS ALVOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E PARA ANÁLISE DA AMOSTRA BIOLÓGICA DE MULTIPLEXAÇÃO DE ALTA PRODUTIVIDADE”

FUNDAMENTOS

[0001] Vários métodos podem ser utilizados em biologia e na medicina para observar diferentes alvos em uma amostra biológica. Por exemplo, a análise de proteínas em seções histológicas e outras preparações citológicas podem ser realizadas utilizando as técnicas de histoquímica, imuno-histoquímica (IHQ), ou imunofluorescência. Análise de proteínas em amostras biológicas pode também ser realizada utilizando imunoenaios de estado sólido, por exemplo, utilizando as técnicas de western blots, ou utilizando ensaios baseados em células que podem ser realizadas, por exemplo, por citometria de fluxo.

[0002] Muitas das técnicas atuais podem detectar apenas alguns alvos de uma vez (tais como IHC ou Western blots baseados em fluorescência, onde o número de alvos detectáveis é limitado pelo sistema de detecção à base da fluorescência) em uma única amostra. Uma análise mais aprofundada de alvos pode requerer a utilização de amostras biológicas adicionais a partir da fonte, limitando a capacidade para determinar as características relativas dos alvos, tais como a presença, ausência, concentração e/ou a distribuição espacial dos múltiplos alvos biológicos na amostra biológica. Além disso, em certos casos, uma quantidade limitada de amostra pode estar disponível para a análise ou a amostra individual pode requerer uma análise mais profunda.

[0003] Os métodos de análise iterativamente uma amostra individual estão descritas na Patente US N°. 7.629.125 e Patente US N°. 7.741.046. Em particular, a Patente US N° 7.741.046 proporciona métodos de detecção de múltiplos alvos em uma amostra biológica, que envolvem o uso de oxidação para a inativação de geradores de sinais (por exemplo, para o branqueamento de corantes fluorescentes). A reação de oxidação é realizada por utilização de

reagentes oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio.

[0004] Além disso, um sinal pode ser inativado por exposição contínua do gerador de sinal de irradiação, isto é, pela fotodegradação. Semelhante para sinalizar inativação por oxidação, este processo pode ser demorado e pode não prosseguir até estar completo, resultando em razão reduzida de sinal-para-ruído. Além disso, a exposição contínua da amostra a irradiação pode danificar a amostra biológica. Assim, continua a existir uma necessidade de métodos mais rápidos, mais leves e mais sensíveis para análise sequencial de alvos biológicos.

BREVE DESCRIÇÃO

[0005] Aqui divulgados são novos métodos para análise de amostras de multiplexação de alto rendimento. Os métodos utilizam, por exemplo, um processo de ciclo de sinal, em que em cada ciclo, uma etapa de fotorreação permite que os mesmos geradores de sinal, por exemplo, fluoróforos, sejam reutilizados no ciclo subsequente, para detectar os marcadores adicionais, por exemplo, proteínas. Estes métodos podem ser utilizados, por exemplo, para analisar sequencialmente uma amostra biológica para discernir, entre outras coisas, a presença, a ausência, a concentração e/ou a distribuição espacial dos múltiplos alvos biológicos em uma amostra biológica. A etapa de fotorreação pode incluir a aplicação de um agente de transferência de elétrons, por exemplo, um sal de borato, e iniciar uma fotorreação, por exemplo, por irradiação da amostra com luz visível, para inativar o gerador de sinal, por exemplo, corante fluorescente.

[0006] Em algumas formas de realização, as vantagens dos métodos divulgados podem incluir a destruição rápida de sinal em cada ciclo. Por exemplo, em alguns casos, resfriamento brusco é observado em cerca de 20 segundos, em comparação com mais de 15 minutos em métodos convencionais. Em algumas formas de realização, os métodos descritos podem também ser caracterizados pela ausência de fluorescência residual,

mesmo em alvos de alta expressão resultando, por exemplo, no aumento da razão de sinal-para-ruído. Além disso, os métodos descritos não danificam a amostra biológica ou os seus componentes, por exemplo, os epítomos, de tal modo que a mesma amostra pode ser usada para muitas dezenas de ciclos. Além disso, em algumas formas de realização, quando em comparação com a fotodegradação direta de corantes fluorescentes, os métodos descritos são vantajosos porque não requerem luz de alta potência, que pode danificar os componentes da amostra biológica.

[0007] Em algumas formas de realização, a presente invenção é um método de sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, compreendendo:

- (a) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra biológica, incluindo múltiplos alvos;
- (b) observar um sinal a partir de pelo menos uma sonda ligada na etapa (a);
- (c) contactar a amostra compreendendo a sonda ligada da etapa (a) com um reagente de transferência de elétrons;
- (d) irradiar a amostra da etapa (c);
- (e) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra da etapa (d); e
- (f) observar um sinal a partir da sonda ligada na etapa (e).

[0008] Em algumas formas de realização, a sonda na etapa (a) compreende um gerador de sinal óptico, e o sinal observado na etapa (b) é um sinal óptico. Em outras formas de realização, o gerador de sinal óptico é um gerador de sinal fluorescente, e o sinal óptico observado na etapa (b) é um sinal fluorescente.

[0009] Em algumas formas de realização, a etapa (a) inclui a ligação de mais do que uma sonda para dois ou mais alvos.

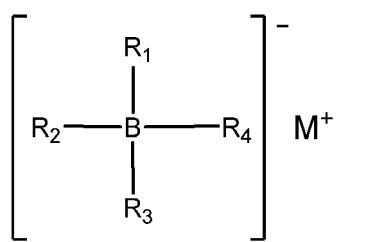
[00010] Em algumas formas de realização, a irradiação da amostra na

etapa (d) é realizada na presença de um tampão. Em algumas formas de realização, a irradiação é realizada a um pH de 5 a 9. Em algumas formas de realização, a irradiação é realizada a um pH de 6 a 8.

[00011] Em algumas formas de realização, a irradiação da amostra na etapa (d) é realizada a uma temperatura de 4 a 50°C. Em uma forma de realização preferida, a irradiação da amostra é realizada a uma temperatura de 20 a 30°C.

[00012] Em algumas formas de realização, a irradiação da amostra na etapa (d) é realizada por exposição da amostra a luz de 350 nm -1,3 μM em comprimento de onda. Em algumas formas de realização, a irradiação da amostra é realizada através da exposição da amostra a luz de 400 a 700 nm de comprimento de onda.

[00013] Em algumas formas de realização, o reagente de transferência de elétrons é um sal de borato. Em algumas formas de realização, o sal de borato é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

cada um de R₁; R₂ e R₃ é, de forma independente, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma arila ou uma heteroarila, em que a referida alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro,

R₄ é uma alquila, uma alquenila, ou uma alquinila, em que a referida alquila, alquenila ou alquinila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄)

alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (Cl-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro, e

M⁺ é selecionado dentre o grupo consistindo de cátions orgânicos e inorgânicos.

[00014] Em algumas formas de realização, cada um de R₁; R₂ e R₃ é arila. Em algumas formas de realização, a arila é fenila. Em algumas formas de realização, a fenila é uma fenila não substituída.

[00015] Em algumas formas de realização, R₄ é um grupo alquila opcionalmente substituída. Em algumas formas de realização, R₄ é butila não substituída.

[00016] Em algumas formas de realização, cada um de R₁; R₂ e R₃ é um grupo arila opcionalmente substituída e R₄ é um grupo alquila opcionalmente substituída. Em uma outra forma de realização, cada um de R₁; R₂, e R₃ é fenila não substituída e R₄ é butila não substituída, e o sal de borato é sal de borato de trifenilbutila.

[00017] Em algumas formas de realização, M⁺ é um cátion inorgânico. Em algumas formas de realização, o cátion é inorgânico de Li⁺, Na⁺ ou K⁺.

[00018] Em algumas formas de realização, a sonda compreende um ligante e um gerador de sinal. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal é um gerador de sinal fluorescente. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal fluorescente compreende um corante de cianina. Em algumas formas de realização, o corante de cianina é Cy3 ou Cy5.

[00019] Em algumas formas de realização, o corante de cianina é Cy3; a irradiação da amostra na etapa (e) é realizada por meio de filtros ópticos, compreende a exposição da amostra a luz de 520 a 580 nm de comprimento de onda; e resulta em fotoexcitação seletiva de Cy3.

[00020] Em algumas formas de realização, o corante de cianina é Cy5; a irradiação da amostra na etapa (e) é realizada por meio de filtros ópticos; compreende a exposição da amostra a luz de 620 a 680 nm de comprimento

de onda; e resulta em fotoexcitação seletiva de Cy5.

[00021] Em algumas formas de realização, a amostra biológica na etapa (a) compreende organelas celulares, células inteiras ou seções de tecido. Em algumas formas de realização, a amostra é constituída por proteínas, hidratos de carbono ou os ácidos nucleicos.

[00022] Em algumas formas de realização, as etapas (c) a (f) são repetidas uma ou mais vezes. Em algumas formas de realização, as etapas (c) a (f) são repetidas pelo menos 5, pelo menos 15, pelo menos 30, pelo menos 60, pelo menos 100 ou pelo menos 150 vezes. Em algumas formas de realização, as etapas (c) a (f) são repetidas de 25 a 30 vezes. Em outras formas de realização, as etapas (c) a (f) são repetidas de 2 a 10 vezes.

[00023] Em algumas formas de realização, as etapas (c) e (d) são realizadas durante cerca de 20 segundos a cerca de 60 minutos. Em algumas formas de realização, as etapas (c) e (d) são realizadas durante cerca de 20 segundos a cerca de 15 minutos. Em algumas formas de realização, as etapas (c) e (d) são realizadas durante cerca de 20 segundos a cerca de 5 minutos.

[00024] Em algumas formas de realização, as etapas (c) e (d) são realizadas a uma temperatura de 4 a 50°C. Em uma forma de realização preferida, as etapas (c) e (d) são realizadas a uma temperatura de 20 a 30°C.

[00025] Em algumas formas de realização, o método compreende ainda a medição de um ou mais valores de intensidade do sinal observado na etapa de observação (b), etapa (f), ou as etapas (b) e (f). Em algumas formas de realização, o método compreende ainda correlacionar o valor da intensidade com uma quantidade de alvo presente na amostra.

[00026] Em algumas formas de realização, a sonda na etapa (a) e a sonda na etapa (e) compreendem cada uma, um gerador de sinal. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal na etapa (a) é o mesmo como o gerador de sinal na etapa (e). Em outras formas de realização, o gerador de sinal na etapa (a) é diferente do gerador de sinal na etapa (e).

[00027] Em algumas formas de realização, os sinais observados na etapa (b) e na etapa (f) são ambos detectáveis em um único canal de detecção. Em outras formas de realização, o sinal observado na etapa (b) ou na etapa (f) é, independentemente, detectável em diferentes canais de detecção.

[00028] Em algumas formas de realização, os componentes da amostra biológica, que sejam diferentes da sonda não são significativamente modificados.

[00029] Em algumas formas de realização, nenhum sinal detectável é observado após a etapa (d).

[00030] Em algumas formas de realização, o gerador de sinal dispõe de um cromóforo, ou uma marcação ativa de Raman.

[00031] Em algumas formas de realização, a presente invenção é um método de sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, compreendendo:

(a) ligar múltiplas sondas de múltiplos alvos presentes na amostra biológica;

(b) observar um primeiro conjunto de sinais a partir do primeiro conjunto de sondas ligadas na etapa (a);

(c) contactar a amostra compreendendo a sonda ligada da etapa (a) com um reagente de transferência de elétrons;

(d) irradiar a amostra da etapa (c);

(e) gerar um segundo conjunto de sinais a partir do segundo conjunto de sondas ligadas na etapa (a);

(f) observar o segundo conjunto de sinais.

[00032] Em algumas formas de realização, a irradiação da amostra na etapa (d) inicia uma fotorreação que inativa substancialmente o gerador de sinal por branqueamento químico fotoativado. Em algumas formas de realização, a fotorreação compreende a transferência de elétrons intermoleculares. Em outras formas de realização, a fotorreação compreende a

transferência de elétrons intramolecular.

[00033] Em algumas formas de realização, o gerador de sinal é irreversivelmente modificado. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal é irreversivelmente modificado por uma fotorreação, que inativa o gerador de sinal por branqueamento químico fotoativado.

[00034] Em algumas formas de realização, a presente invenção é um método de análise de amostra biológica de multiplexação de alto rendimento, o método compreendendo:

um processo de ciclo de sinal, em que em cada ciclo, coloração e formação de imagens é seguido por aplicação de um reagente de transferência de elétrons e irradiação da amostra biológica.

[00035] Em algumas formas de realização, o método permite o ciclo de sinal rápido, sem modificar significativamente os componentes da amostra biológica, que sejam diferentes da sonda.

[00036] Em algumas formas de realização, a presente invenção é um kit para sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, compreendendo:

sondas múltiplas compreendendo um ligante acoplado a um gerador de sinal;

um reagente de transferência de elétrons que, quando em contato com o gerador de sinal, é capaz de branqueamento do gerador de sinal após irradiação.

[00037] Em algumas formas de realização, a presente invenção é uma série de pelo menos duas imagens que descrevem os alvos biológicos opticamente marcados em que:

as imagens são obtidas no processo de sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, em que o processo compreende:

(a) ligar pelo menos uma sonda óptica a um ou mais alvos presentes na amostra biológica, incluindo múltiplos alvos;

- (b) observar um sinal a partir da sonda óptica ligada na etapa (a);
- (c) contactar a amostra que contém a sonda óptica ligada da etapa (a) com um reagente de transferência de elétrons;
- (d) irradiar a amostra da etapa (c);
- (e) ligar pelo menos uma sonda óptica a um ou mais alvos presentes na amostra da etapa (d); e
- (f) observar um sinal a partir da sonda óptica ligada na etapa (e).

[00038] Em algumas formas de realização, a presente invenção é um método de sondagem de alvos em uma amostra biológica, compreendendo:

- (a) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra biológica, incluindo múltiplos alvos;
- (b) observar um sinal a partir da sonda ligada na etapa (a);
- (c) contactar a amostra compreendendo a sonda ligada da etapa (a) com um reagente de transferência de elétrons; e
- (d) irradiar a amostra da etapa (c).

[00039] Em algumas formas de realização, a presente invenção é um método de sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, compreendendo:

- (a) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra biológica, incluindo múltiplos alvos;
- (b) ligar pelo menos uma sonda de controle a um ou mais alvos presentes na amostra;
- (c) observar um sinal a partir da sonda ligada na etapa (a) e um sinal de controle a partir da sonda de controle ligada na etapa (b);
- (d) contactar a amostra na etapa (c) com um reagente de transferência de elétrons que é capaz de reagir seletivamente com a sonda e não a sonda de controle;

(e) irradiar a amostra da etapa (d);

(f) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra da etapa (e); e

(g) observar um sinal a partir da sonda ligada na etapa (f).

[00040] Em algumas formas de realização, as etapas (a) e (b) são realizadas simultaneamente. Em algumas formas de realização, a etapa (g) compreende ainda observar um sinal a partir da sonda de controle ligada na etapa (b).

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00041] A FIGURA 1 é uma imagem em tons de cinza de um gráfico que mostra a absorção de corante Cy3, a 550 nm, após incubação com diferentes concentrações de sal de lítio de borato de trifenilbutila e a irradiação durante 4 ou 10 minutos.

[00042] A FIGURA 2 mostra imagens em tons de cinza de amostras coradas com citoqueratina conjugada por Cy3 antes e após o branqueamento químico fotoativado.

[00043] A FIGURA 3 mostra imagens em tons de cinza de amostras coradas com pan caderina conjugada por Cy5 antes e após o branqueamento químico fotoativado.

[00044] A FIGURA 4 mostra uma imagem em tons de cinza de espectro de fluorescência do corante BODIPY antes e depois do branqueamento químico fotoativado.

[00045] A FIGURA 5 mostra uma imagem em tons de cinza de um espectro de fluorescência do corante de rodamina, antes e depois do branqueamento químico fotoativado.

[00046] A FIGURA 6 mostra uma imagem em tons de cinza de um espectro de fluorescência de corante 1,3-dicloro-7-hidroxi-9,9-dimetil-2(9H)-acridinona (DDAO) antes e depois do branqueamento químico fotoativado.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Definições

[00047] As formas singulares “um” “uma” e “o” incluem referentes plurais a menos que o contexto indique claramente o contrário. A aproximação de linguagem, tal como aqui utilizado ao longo do relatório descritivo e reivindicações, pode ser aplicada para modificar qualquer representação quantitativa que pode permissivelmente variar sem resultar em uma mudança na função de base a que ela está relacionada. Deste modo, um valor modificado por um termo tal como “cerca de” não deve ser limitado ao valor preciso especificado. Salvo indicação em contrário, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, propriedades, tais como peso molecular, as condições de reação, etc utilizado no relatório descritivo e reivindicações são para ser entendidas como sendo modificados em todos os casos pelo termo “cerca de”. Por conseguinte, a menos que indicado em contrário, os parâmetros numéricos apresentados no relatório descritivo seguinte e reivindicações em anexo são aproximações, que podem variar dependendo das propriedades desejadas procuradas a ser obtidas pela presente invenção. No mínimo, cada parâmetro numérico deve pelo menos ser interpretado a luz do número de algarismos significativos relatados e pela aplicação de técnicas comuns de arredondamento.

[00048] Tal como aqui utilizado, o termo “alquila” se refere a grupos alifáticos saturados, incluindo grupos alquila de cadeia linear (por exemplo, metila, etila, propila, butila, pentila, hexila, heptila, octila, nonila, decila, etc), grupo alquila de cadeia ramificada (isopropila, terc-butila, isobutila, etc.). Em certas formas de realização, uma alquila de cadeia linear ou cadeia ramificada tem seis ou menos átomos de carbono na sua cadeia principal (por exemplo, C₁-C₆ para cadeia linear, C₃-C₆ para cadeia ramificada), ou quatro ou menos átomos de carbono na sua cadeia principal (por exemplo, C₁-C₄ para cadeia linear, C₃-C₄ para cadeia ramificada). O termo “C₁-C₆” alquila se refere a grupos alquila contendo de 1 a 6 átomos de carbono. O termo “C₁-C₄” alquila

se refere a grupos alquila contendo de 1 a 4 átomos de carbono. Além disso, o termo alquila inclui tanto as “alquilas não substituídas” e “alquilas substituídas”, a última das quais se refere a unidades de alquila com substituintes substituindo um átomo de hidrogênio em um ou mais carbonos da cadeia principal de hidrocarboneto. Tais substituintes podem incluir, por exemplo, (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, amino (incluindo (C₁-C₄) alquilamino e (C₁-C₄) dialquilamino), hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro. As cicloalquilas podem ainda ser substituídas, por exemplo, com os substituintes descritos acima.

[00049] Tal como aqui utilizado, o termo “alquenila” se refere a grupos alifáticos insaturados análogos em comprimento e possível substituição às alquilas anteriormente descritas, mas que contêm pelo menos uma ligação dupla. Por exemplo, o termo “alquenila” inclui grupos alquenila de cadeia linear (por exemplo, etilenila, propenila, butenila, pentenila, hexenila, heptenila, octenila, nonenila, decenila, etc), grupos alquenila de cadeia ramificada. Além disso, o termo “alquenila” inclui tanto “alquenas não substituídas” quanto “alquenas substituídas”, a última das quais se refere a radicais alquenila com substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos da cadeia principal de hidrocarboneto. Tais substituintes podem incluir, por exemplo, (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, amino (incluindo (C₁-C₄) alquilamino e (C₁-C₄) dialquilamino), hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro.

[00050] Tal como aqui utilizado, o termo “alquinila” se refere a grupos alifáticos insaturados análogos em comprimento e possível substituição às alquilas anteriormente descritas, mas que contêm pelo menos uma ligação tripla. Por exemplo, o termo “alquinila” inclui grupos alquinila de cadeia linear (por exemplo, etinila, propinila, butinila, pentinila, hexinila, heptinila, octinila, noninila, decinila, etc), ou grupos alquinila de cadeia ramificada. Além disso, o termo “alquinila” inclui tanto “alquinas não substituídas” e

“alquinilas substituídas”, a última das quais se refere a radicais alquinila com substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos da cadeia principal de hidrocarboneto. Tais substituintes podem incluir, por exemplo, (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, amino (incluindo (C₁-C₄) alquilamino e (C₁-C₄) dialquilamino), hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro.

[00051] Tal como aqui utilizado, o termo “alcoxi” se refere a um grupo alquila substituída e não substituída, alquenila, e alquinila ligadas de forma covalente a um átomo de oxigênio. Exemplos de grupos alcoxi incluem, mas não estão limitados a, grupos metoxi, etoxi, isopropiloxi, propoxi, butoxi, e pentoxi. Em certas formas de realização, um alcoxi de cadeia linear ou de cadeia ramificada, com 4 ou menos átomos de carbono na sua cadeia principal (por exemplo, C₁-C₄ de cadeia linear, C₃-C₄ de cadeia ramificada). O termo alquila “Q-C₄” se refere a grupos alquila contendo de 1 a 4 átomos de carbono.

[00052] Tal como aqui utilizado, o termo “amina” ou “amino” se refere a compostos ou substituintes em que um átomo de nitrogênio, é ligado covalentemente a pelo menos um carbono ou heteroátomo. O termo inclui “alquilamino”, que compreende os grupos e compostos em que o nitrogênio está ligado a pelo menos um grupo alquila adicional. O termo “dialquil amino” inclui grupos em que o átomo de nitrogênio está ligado a pelo menos dois grupos alquila adicionais. Em certas formas de realização, estes grupos alquila possuem quatro ou menos átomos de carbono na sua cadeia principal (por exemplo, C₁-C₄ de cadeia linear, C₃-C₄ de cadeia ramificada). O termo (C₁-C₄)-amino se refere a grupos e compostos, em que o nitrogênio está ligado a pelo menos um grupo adicional de alquila C₁-C₄. O termo (C₁-C₄) dialquilamino se refere a grupos e compostos, em que o nitrogênio está ligado a pelo menos dois outros grupos alquila C₁-C₄.

[00053] Tal como aqui utilizado, o termo “arila” se refere a grupos, por exemplo, os grupos aromáticos de anel único de 5 e 6 membros, que podem

incluir de zero a quatro heteroátomos, por exemplo, benzeno, fenila, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isooxazol, piridina, pirazina, piridazina, e pirimidina, e outros semelhantes. Além disso, o termo “arila” inclui grupos arila multicíclicos, por exemplo, tricíclicos, bicíclicos, por exemplo, naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofeno, metilenodioxifenila, quinolina, isoquinolina, naftiridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, desazapurina ou indolizina. Aqueles grupos arila possuindo heteroátomos na estrutura anelar podem também ser referidos como “heterociclos de arila”, “heteroarilas” ou “heteroaromáticos”. O anel aromático pode ser substituído em uma ou mais posições do anel com tais substituintes como os descritos acima, como por exemplo, (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, amino (incluindo (C₁-C₄) alquilamino e (C₁- C₄) dialquilamino), hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro. Os grupos arila também podem ser fundidos ou ligados em ponte com anéis alicíclicos ou heterocíclicos que não são aromáticos, de modo a formar um policiclo (por exemplo, tetralina). O termo heteroarila inclui compostos cíclicos insaturados tais como azirina, oxireno, ditiete, pirrolina, pirrol, furano, di-hidrofurano, di-hidrotiofeno, tiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, tiazol, isotiazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4, triazol, ditiazol, tetrazol, piridina, pirano, pirimidina, pirano, tiapirano, diazina, tiazina, dioxina, triazina e tetrazeno.

[00054] Tal como aqui utilizado, o termo “anticorpo” se refere a uma imunoglobulina que se liga especificamente e é, portanto, definido como complementar com uma organização espacial e polar particular de outra molécula. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal e pode ser preparado por técnicas que são bem conhecidas na técnica, tais como imunização de um hospedeiro e coleta de soros (policlonal) ou por preparação de linhas de células híbridas contínuas e coleta da proteína segregada (monoclonal), ou por clonagem e expressão de sequências de nucleotídeos ou

de versões mutadas desta, que codifica pelo menos para as sequências de aminoácidos necessárias para a ligação específica de anticorpos naturais. Os anticorpos podem incluir uma imunoglobulina completa ou um fragmento do mesmo, que as imunoglobulinas incluem as várias classes e isotipos, tais como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM. Os fragmentos de anticorpos funcionais podem incluir porções de um anticorpo capaz de reter a ligação de afinidade semelhante à do anticorpo de comprimento completo (por exemplo, Fab, Fv e F(ab '). Sub.2, ou Fab'). Além disso, agregados, polímeros e conjugados de imunoglobulinas ou seus fragmentos podem ser utilizados, onde a afinidade de ligação, desde que apropriado para uma molécula particular, seja substancialmente mantida.

[00055] Tal como aqui utilizado, o termo “ligante” se refere a uma molécula que pode se ligar a um ou mais alvos presentes na amostra biológica. Um ligante pode se ligar especificamente a um alvo. Os ligantes adequados podem incluir um ou mais dos peptídeos naturais ou modificados, proteínas (por exemplo, anticorpos, aficorpos, ou aptâmeros), ácidos nucleicos (por exemplo, polinucleotídeos, DNA, RNA, ou aptâmeros); polissacarídeos (por exemplo, lectinas, açúcares), lípidos, enzimas, substratos de enzimas ou inibidores, ligandos, receptores, antígenos ou haptenos. Um ligante adequado pode ser selecionado dependendo da amostra a ser analisada e dos alvos disponíveis para a detecção. Por exemplo, um alvo na amostra pode incluir um ligando e o ligante pode incluir um receptor, ou um alvo pode incluir um receptor e o ligante pode incluir um ligando. De modo semelhante, um alvo pode incluir um antígeno e o ligante pode incluir um anticorpo ou fragmento de anticorpo, ou vice-versa. Em algumas formas de realização, um alvo pode incluir um ácido nucleico e o ligante pode incluir um ácido nucleico complementar. Em algumas formas de realização, tanto o alvo e o ligante podem incluir proteínas capazes de se ligarem umas às outras.

[00056] Tal como aqui utilizado, o termo “amostra biológica” se refere

a uma amostra obtida de um indivíduo biológico, incluindo a amostra de tecido biológico ou de origem do fluido obtidos *in vivo* ou *in vitro*. Tais amostras podem ser, mas não estão limitadas a, fluido corporal (por exemplo, sangue, plasma sanguíneo, soro ou urina), órgãos, tecidos, frações, células isoladas a partir de mamíferos, incluindo os humanos e organelas celulares. As amostras biológicas podem também incluir seções da amostra biológica, incluindo tecidos (por exemplo, porções seccionadas de um órgão ou de tecido). As amostras biológicas pode também incluir extratos de uma amostra biológica, por exemplo, um antígeno ou um ácido nucleico a partir de um fluido biológico (por exemplo, sangue ou urina). As amostras biológicas podem compreender proteínas, hidratos de carbono ou ácidos nucleicos.

[00057] A amostra biológica pode ser de origem procariótica, origem arqueal ou origem eucariótica (por exemplo, insetos, protozoários, aves, peixes, répteis). Em algumas formas de realização, a amostra biológica é de mamífero (por exemplo, rato, camundongo, vaca, cão, burro, porquinho da índia ou coelho). Em certas formas de realização, a amostra biológica é de origem primata (por exemplo, exemplo, chimpanzé, ou humano).

[00058] Tal como aqui utilizado, o termo “sonda de controle” se refere a um agente que tem um ligante acoplado a um gerador de sinal ou a um gerador de sinal capaz de manchar diretamente, de tal modo que o gerador de sinal de sinal retenha pelo menos 80 por cento após o contato com um reagente de transferência de elétron e subsequente irradiação. Um gerador de sinal adequado em uma sonda de controle não é substancialmente inativado, por exemplo, substancialmente branqueados por branqueamento químico fotoativado, quando em contato com o reagente de transferência de elétrons e subsequentemente irradiados. Os exemplos adequados de geradores de sinal podem incluir um fluoróforo, que não sofre de branqueamento de acordo com as condições utilizadas (por exemplo, DAPI).

[00059] Tal como aqui utilizado, o termo “enzima” se refere a uma

molécula de proteína, que pode catalisar uma reação química de um substrato. Em algumas formas de realização, uma enzima adequada catalisa uma reação química do substrato para formar um produto da reação que se pode ligar a um receptor (por exemplo, os grupos fenólicos) presente na amostra. Um receptor pode ser exógeno (isto é, um receptor aderido extrinsecamente na amostra ou no suporte sólido) ou endógeno (receptores presentes intrinsecamente na amostra ou no suporte sólido). Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidases, oxidases, fosfatases, esterases e glicosidasas. Os exemplos específicos de enzimas adequadas incluem rábano peroxidase, fosfatase alcalina, β -D-galactosidase, lipase e glucose oxidase.

[00060] Tal como aqui utilizado, o termo “substrato de enzima” se refere a um composto químico que é quimicamente catalisado por uma enzima para formar um produto da reação. Em algumas formas de realização, o produto de reação é capaz de se ligar a um receptor presente na amostra. Em algumas formas de realização, os substratos de enzimas utilizados nos métodos aqui descritos podem incluir substratos não cromogênicos ou não quimioluminescentes. Um gerador de sinal pode ser ligado ao substrato da enzima, como uma etiqueta.

[00061] Tal como aqui utilizado, o termo “reagente de transferência de elétrons” se refere a um reagente que pode se envolver em uma fotorreação com uma molécula capaz de se submeter à fotoexcitação. Este termo também se refere a uma composição que compreende um reagente que pode se envolver em uma fotorreação com uma molécula capaz de se submeter à fotoexcitação. Em algumas formas de realização, a molécula capaz de se submeter à fotoexcitação pode ser um gerador de sinal. Em algumas formas de realização, o reagente de transferência de elétrons pode doar um elétron para o gerador de sinal no decurso de uma fotorreação. Em formas de realização alternativas, o reagente de transferência de elétrons pode aceitar um elétron a partir do gerador de sinal no decurso de uma fotorreação.

[00062] Em algumas formas de realização, o reagente de transferência de elétrons que doa um elétron para o gerador de sinal no decurso de uma fotorreação pode ser um sal de borato. Em uma outra forma de realização, o sal de borato é borato de trifenilbutila.

[00063] Em formas de realização alternativas, o reagente de transferência de elétrons que aceita um elétron a partir da molécula fotoexcitada, pode ser um sal de ônio [por exemplo, hexafluorofosfato de difeniliodônio (DPI) ou tetrafluoroborato de dimetilfenacilsulfônio (DMPS)], ou butiltrifenilborato de tetrabutílamônio (TBAB).

[00064] Tal como aqui utilizado, o termo “fluoróforo” ou “gerador de sinal fluorescente” se refere a um composto químico que, quando excitado por exposição a um comprimento de onda particular de luz, emite luz a um comprimento de onda diferente. Os fluoróforos podem ser descritos em termos do seu perfil de emissão, ou “cor.” Fluoróforos verdes (por exemplo, Cy3, FITC, e Oregon Green) podem ser caracterizados pela sua emissão a comprimentos de onda geralmente na gama de 515 a 540 nanômetros. Fluoróforos vermelhos (por exemplo, Vermelho Texas, Cy5 e tetrametilrodamina) podem ser caracterizados pela sua emissão a comprimentos de onda geralmente na gama de 590 a 690 nanômetros. Os exemplos de fluoróforos incluem, mas não estão limitados a, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfônico, acridina, derivados de acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno 1-sulfônico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil) fenil] naftalimida-3,5 dissulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil) maleimida, antranilamida, Brilliant Yellow, cumarina, derivados de cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-trifluorometilcoumarin (Coumaran 151), cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5', 5'-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (bromopirogalol vermelho), 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-

estilbeno-2, 2'-dissulfônico, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2, 2'-dissulfônico, cloreto de 5-[dimetilamino] naftaleno-1-sulfonila (DNS, cloreto de dansila), fluoresceína e os seus derivados tal como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-dichlorotriazin-2-il) aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), QFITC (XRITC); derivado de fluorescamina (fluorescente em reação com aminas); IR144, IR1446; isotiocianato de Malaquita Verde, 4-metilumbeliferona; orto cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de Fenol, B-ficoeritrina; derivado de o-ftaldialdeído (fluorescente em reação com aminas); pireno e derivados, tais como pireno, butirato de pireno e 1-pireno-butirato de succinimidila; Reative Red 4 (Cibacron.RTM. Vermelho Brilhante 3B-A), rodamina e derivados, tais como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), sulfonil cloreto de lissamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 e o derivado de sulfonil cloreto de sulforrodamina 101 (Vermelho Texas); N, N, N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA); tetrametil rodamina, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico e derivados de quelatos de lanatídeo, cianinas, corantes pirélio, esquarainas, 1,3-dicloro-7-hidroxi-9,9-dimetil-2(9H)-acridinona (DDAO), e dimetilacridinona (DAO). Em algumas formas de realização, o fluoróforo pode ser corante de cianina, rodamina, BODIPY, ou 1,3-dicloro-7-hidroxi-9,9-dimetil-2 (9H)-acridinona (DDAO). Em uma forma de realização preferida, o fluoróforo é um corante de cianina. Em uma outra forma de realização, o corante de cianina é Cy3 ou Cy5.

[00065] Tal como aqui utilizado, o termo “*in situ*”, geralmente se refere a um evento que ocorre no local de origem, por exemplo, no órgão ou tecido intacto ou em um segmento representativo de um órgão ou tecido. Em algumas formas de realização, análise *in situ* de alvos pode ser realizada em

células derivadas de uma variedade de fontes, incluindo um organismo, um órgão, amostra de tecido, ou uma cultura de células. A análise *in situ* proporciona informação contextual que pode ser perdida quando o alvo é removido do seu local de origem. Por conseguinte, na análise *in situ* de alvos descreve a análise de sonda ligada a alvo localizado dentro de uma célula completa ou uma amostra de tecido, quer a membrana celular é totalmente intacta ou parcialmente intacta onde a sonda ligada ao alvo permanece dentro da célula. Além disso, os métodos aqui descritos podem ser usados para analisar os alvos *in situ* em amostras de células ou de tecidos que são fixados ou não fixados.

[00066] Tal como aqui utilizados, os termos “irradiação” ou “irradiar” se referem ao ato ou processo de expor uma amostra ou uma solução para a radiação não ionizante. Em algumas formas de realização, a irradiação não ionizante tem comprimentos de onda entre 350 nm e 1,3 µm. Em formas de realização preferidas, a radiação não ionizante é a luz visível de comprimento de onda de 400 a 700 nm. A irradiação pode ser realizada por exposição de uma amostra ou de uma solução para uma fonte de radiação, por exemplo, uma lâmpada, capaz de emitir radiações de um determinado comprimento de onda ou uma faixa de comprimentos de onda. Em algumas formas de realização, uma molécula capaz de se submeter à fotoexcitação é fotoexcitada, como um resultado da irradiação. Em algumas formas de realização, a molécula capaz de se submeter à fotoexcitação é um gerador de sinal, por exemplo, um gerador de sinal fluorescente. Em algumas formas de realização, a irradiação de um gerador de sinal fluorescente inicia uma fotorreação entre o gerador de sinal fluorescente e o reagente de transferência de elétrons. Em algumas formas de realização, a irradiação inicia uma fotorreação substancialmente inativa o gerador de sinal por branqueamento químico fotoativado.

[00067] Os filtros ópticos podem ser usados para restringir a irradiação

de uma amostra ou uma solução para um determinado comprimento de onda ou uma faixa de comprimentos de onda. Em algumas formas de realização, os filtros ópticos podem ser usados para restringir a irradiação de uma estreita faixa de comprimentos de onda de fotoexcitação seletiva de uma ou mais moléculas capazes de se submeter à fotoexcitação. O termo “fotoexcitação seletiva” se refere a um ato ou um processo, pelo qual uma ou mais moléculas capazes de se submeter à fotoexcitação é fotoexcitada, na presença de uma ou mais outras moléculas capazes de se submeter à fotoexcitação que permanece no estado eletrônico do solo após a irradiação.

[00068] Em algumas formas de realização, a molécula capaz de se submeter à fotoexcitação é um corante fluorescente, por exemplo, um corante de cianina. Em uma outra forma de realização, a irradiação limitada a uma gama de comprimentos de onda entre 520 a 580 nm é utilizada para fotoexcitação seletiva de um corante Cy3. Em uma outra forma de realização, a irradiação limitada a uma gama de comprimentos de onda entre 620 a 680 nm é utilizada para a fotoexcitação seletiva de um corante Cy5. Em formas de realização alternativas, a irradiação de uma amostra a um comprimento de onda específico pode também ser conseguida através da utilização de um laser.

[00069] Tal como aqui utilizado, o termo “peroxidase” se refere a uma classe de enzimas que catalisa uma reação de oxidação de um substrato da enzima, juntamente com um doador de elétrons. Os exemplos de enzimas peroxidase incluem rábano peroxidase, citocromo C peroxidase, glutathione peroxidase, microperoxidase, mieloperoxidase, lactoperoxidase ou peroxidase de soja.

[00070] Tal como aqui utilizado, o termo “substrato de peroxidase” faz referência a um composto químico que é quimicamente catalisado por peroxidase para formar um produto da reação. Em algumas formas de realização, os substratos de peroxidase utilizados nos métodos aqui descritos

podem incluir substratos não cromogênicos ou não quimioluminescentes. Um gerador de sinal fluorescente pode ser ligado ao substrato de peroxidase como um marcador.

[00071] Tal como aqui utilizado, o termo “branqueamento”, “branqueamento químico fotoativado” ou “branqueamento químico fotoinduzido” se refere a um ato ou um processo através do qual um sinal gerado por um gerador de sinal é modificado no decurso de uma fotorreação. Em certas formas de realização, o gerador de sinal é irreversivelmente alterado.

[00072] Em algumas formas de realização, o sinal é diminuído ou eliminado como um resultado de branqueamento químico fotoativado. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal é completamente branqueado, isto é, a intensidade do sinal diminui em cerca de 100 %. Em algumas formas de realização, o sinal é um sinal óptico, e o gerador de sinal é um gerador de sinal óptico. O termo “branqueamento fotoativado químico” pretende-se excluir a fotodegradação, ou perda de sinal (por exemplo, o sinal fluorescente), que pode ocorrer na ausência de reagente de transferência de elétrons, por exemplo, após a irradiação contínua de um gerador de sinal, tal como um fluoróforo, ou após a sua exposição à luz continuada.

[00073] Tal como aqui utilizado, o termo “fotoexcitação” se refere a um ato ou um processo pelo qual uma molécula de transição de um estado eletrônico do solo para um estado eletrônico animado mediante a absorção de energia de radiação, por exemplo, após irradiação. Moléculas fotoexcitadas podem participar de reações químicas, por exemplo, em reações de transferência de elétrons. Em algumas formas de realização, uma molécula capaz de se submeter à fotoexcitação é um gerador de sinal, por exemplo, um gerador de sinal fluorescente.

[00074] Tal como aqui utilizado, o termo “fotorreação” ou uma “reação fotoinduzida” se refere a uma reação química que é iniciada e/ou

procede como resultado da fotoexcitação de pelo menos um reagente. Os reagentes em uma fotorreação podem ser um reagente de transferência de elétrons e uma molécula capaz de se submeter à fotoexcitação. Em algumas formas de realização, uma fotorreação pode envolver a transferência de elétrons a partir de um reagente de transferência de elétrons para a molécula que sofreu fotoexcitação, ou seja, a molécula fotoexcitada. Em formas de realização alternativas, uma fotorreação pode também envolver uma transferência de elétrons a partir da molécula que tenha sido submetido à fotoexcitação para o reagente de transferência de elétrons. Em algumas formas de realização, a molécula capaz de se submeter à fotoexcitação é um gerador de sinal fluorescente, por exemplo, um fluoróforo. Em algumas formas de realização, a fotorreação resulta em modificação irreversível de um ou mais componentes da fotorreação. Em algumas formas de realização, a fotorreação inativa substancialmente o gerador de sinal por branqueamento químico fotoativado.

[00075] Em algumas formas de realização, a fotorreação pode envolver uma transferência de elétron intramolecular entre o reagente de transferência de elétrons e a molécula fotoexcitada, por exemplo, a transferência de elétrons ocorre quando a ligação entre o reagente de transferência de elétrons e a molécula fotoexcitada é transitória, formando pouco antes da transferência de elétrons e desligando após a transferência de elétrons.

[00076] Em algumas formas de realização, a fotorreação pode envolver a transferência de elétrons intramolecular entre o reagente de transferência de elétrons e a molécula fotoexcitada, por exemplo, a transferência de elétron ocorre quando o reagente de transferência de elétrons e a molécula fotoexcitada, foram ligados em conjunto, por exemplo, por ligações covalentes ou interações eletrostáticas, antes do início do processo de transferência de elétrons. A fotorreação que envolve a transferência de elétrons intramolecular pode ocorrer, por exemplo, quando a molécula capaz

de sofrer fotoexcitação e o reagente de transferência de elétrons carregam cargas opostas e formam um complexo realizado por interações eletrostáticas. Por exemplo, um corante catiônico, por exemplo, um corante de cianina catiônico e ânion de borato de trifenilbutila podem formar um complexo, em que a transferência de elétron intramolecular pode ocorrer entre a cianina e porções de borato, após irradiação.

[00077] Tal como aqui utilizado, o termo “sonda” se refere a um agente que tem um ligante e um marcador, tal como um gerador de sinal ou uma enzima. Em algumas formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são incorporados em uma única entidade. O ligante e o marcador podem estar ligados diretamente (por exemplo, por meio de uma molécula fluorescente incorporada no ligante) ou indiretamente (por exemplo, através de um ligante) e aplicada a uma amostra biológica em uma única etapa. Em formas de realização alternativas, o ligante e o marcador são incorporados em entidades discretas (por exemplo, um anticorpo primário capaz de ligar um alvo e uma enzima ou um anticorpo secundário marcado com gerador de sinal capaz de ligar o anticorpo primário). Quando o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são entidades separadas, podem ser aplicados a uma amostra biológica em uma única etapa ou em várias etapas. Tal como aqui utilizado, o termo “sonda fluorescente” se refere a um agente que tem um ligante acoplado a um gerador de sinal fluorescente. Em algumas formas de realização, a sonda pode incluir um gerador de sinal óptico, de tal modo que o sinal observado é um sinal óptico. Em algumas formas de realização, a sonda pode incluir um gerador de sinal fluorescente, de tal modo que o sinal observado é um sinal fluorescente.

[00078] Tal como aqui utilizado, o termo “gerador de sinal” se refere a uma molécula capaz de proporcionar um sinal detectável usando uma ou mais técnicas de detecção (por exemplo, espectrometria, calorimetria, espectroscopia ou inspeção visual). Os exemplos adequados de um sinal

detectável podem incluir um sinal óptico, e o sinal elétrico. Os exemplos de geradores de sinal incluem um ou mais de um cromóforo, um fluoróforo, ou um marcador ativo de Raman. Como indicado acima, no que diz respeito à sonda, o gerador de sinal e o ligante podem estar presentes em uma única entidade (por exemplo, uma proteína de ligação ao alvo com um marcador fluorescente) em algumas formas de realização. Alternativamente, o ligante e o gerador de sinal podem ser entidades discretas (por exemplo, uma proteína receptora e um anticorpo marcado contra essa proteína receptora particular) que se associam umas com as outras, antes ou após a introdução da amostra.

[00079] Em algumas formas de realização, o gerador de sinal pode ser um gerador de sinal óptico. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal óptico pode ser um gerador de sinal fluorescente, por exemplo, um fluoróforo. Em formas de realização preferidas, o gerador de sinal fluorescente pode ser um corante de cianina, por exemplo, Cy3, Cy5 ou Cy7. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal, por exemplo, um fluoróforo, poderá ser cobrado. Em uma forma de realização, o gerador de sinal é um corante fluorescente catiônico.

[00080] Tal como aqui utilizado, o termo “suporte sólido” se refere a um artigo no qual um alvo presente na amostra biológica pode ser imobilizado e subsequentemente detectado por métodos aqui descritos. Os alvos podem ser imobilizados no suporte sólido por adsorção física, por formação de uma ligação covalente, ou por combinações dos mesmos. Um suporte sólido pode incluir um polímero, um vidro, ou um material metálico. Exemplos de suportes sólidos incluem uma membrana, uma placa de microtitulação, uma esfera, um filtro, uma tira de teste, uma lâmina, uma lamela e um tubo de ensaio.

[00081] Tal como aqui utilizado, o termo “ligação específica” se refere ao reconhecimento específico de uma de duas moléculas diferentes entre si em relação a substancialmente menos reconhecimento de outras moléculas.

As moléculas podem ter áreas nas suas superfícies ou em cavidades que dão origem a um reconhecimento específico entre as duas moléculas resultantes de uma ou mais das interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou de interações hidrofóbicas. Exemplos de ligação específicos incluem, mas não estão limitados a, interações anticorpo-antígeno, interações enzima-substrato, interações de polinucleotídeos, e assim por diante. Em algumas formas de realização, uma molécula de ligante pode ter uma constante de associação de equilíbrio intrínseca (K_A) para o alvo menor do que cerca de 10^5 M^{-1} , sob condições ambientais, tais como um pH de cerca de 6 a cerca de 8 e a temperatura variando entre cerca de 0°C a cerca de 37°C .

[00082] Tal como aqui utilizado, o termo “alvo” se refere ao componente de uma amostra biológica que pode ser detectado quando presente na amostra biológica. O alvo pode ser qualquer substância para a qual existe um ligante específico que ocorre naturalmente (por exemplo, um anticorpo), ou para o qual um agente de ligação específica pode ser preparado (por exemplo, uma pequena molécula ligante ou um aptâmero). Em geral, uma ligante pode se ligar a um alvo por intermédio de uma ou mais partes químicas discretas do alvo ou de um componente estrutural tridimensional do alvo (por exemplo, estruturas 3D resultantes do peptídeo de dobragem). O alvo pode incluir um ou mais dos peptídeos naturais ou modificados, proteínas (por exemplo, anticorpos, aficorpos, ou aptâmeros), ácidos nucleicos (por exemplo, polinucleotídeos, DNA, RNA, ou aptâmeros); polissacarídeos (por exemplo, lectinas ou açúcares), lípidos, enzimas, substratos de enzimas, ligandos, receptores, antígenos, ou haptenos. Em algumas formas de realização, os alvos podem incluir proteínas ou ácidos nucleicos.

[00083] A invenção inclui configurações que se relacionam geralmente aos métodos aplicáveis em aplicações analíticas, de diagnóstico ou prognóstico, como detecção de analitos, células ativadas por fluorescência

(FACS), histoquímica, imuno-histoquímica ou imunofluorescência. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser particularmente aplicável em histoquímica, imunomarcação, imuno-histoquímica, imunoenaios ou imunofluorescência. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser particularmente aplicáveis em técnicas de immunoblotting, por exemplo, Western blots ou imunoenaios, tais como ensaios de imunossorção ligados a enzima (ELISA).

[00084] Os métodos divulgados se referem geralmente a detecção de múltiplos alvos em uma única amostra biológica. Em algumas formas de realização, métodos de detecção de múltiplos alvos em uma única amostra biológica, utilizando o mesmo canal de detecção são revelados. Os alvos podem estar presentes na superfície das células em suspensão, sobre a superfície de citologia, na superfície de cortes histológicos, na superfície de microarranjos de DNA, na superfície de microarranjos de proteína, ou sobre a superfície de suportes sólidos (tais como géis, blots, lâminas de vidro, grânulos, ou placas de ELISA).

[00085] Os métodos aqui divulgados podem permitir a detecção de uma pluralidade de alvos na mesma amostra biológica com pouco ou nenhum efeito na integridade da amostra biológica. Detectar os alvos em uma mesma amostra biológica pode fornecer mais informações espaciais sobre os alvos na amostra biológica. Métodos aqui descritos podem também ser aplicáveis em aplicações analíticas onde uma quantidade limitada de amostra biológica pode estar disponível para a análise e a mesma amostra pode ter que ser processada para análise múltipla. Métodos aqui descritos também podem facilitar a análise de múltiplas amostras de estado sólido (por exemplo, cortes de tecido) ou amostras aderidas a um suporte sólido (por exemplo, blots) sem substancialmente remover as sondas e os alvos. Além disso, o mesmo canal de detecção pode ser utilizado para a detecção de alvos diferentes na amostra, permitindo menos requisitos químicos para análises de múltiplos alvos. Os

métodos podem facilitar ainda mais a análises baseadas em métodos de detecção que pode ser limitado no número de alvos simultaneamente detectáveis por causa das limitações de sinais resolúveis. Por exemplo, utilizando a detecção baseada em fluorescência, o número de alvos que podem ser detectados simultaneamente pode estar limitado a cerca de cinco, como apenas cerca de cinco sinais fluorescentes podem ser resolvidos com base nas suas propriedades de excitação e emissão de comprimentos de onda. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem permitir a detecção de mais do que cinco alvos utilizando o sistema de detecção à base fluorescente.

[00086] Em algumas formas de realização, o método é uma produtividade elevada de multiplexação análise da amostra biológica, que inclui um processo de ciclo de sinal, em que em cada ciclo, a coloração e a formação de imagens são seguidas por aplicação de um reagente de transferência de elétrons e a irradiação da amostra biológica. O método permite o rápido ciclo de sinal sem modificar significativamente os componentes da amostra biológica, que sejam diferentes da sonda.

[00087] Em algumas formas de realização, o método de detecção de múltiplos alvos em uma amostra biológica inclui a detecção sequencial de alvos na amostra biológica. O método geralmente inclui as etapas de detectar um primeiro conjunto de alvos presentes na amostra biológica, de branqueando do sinal a partir do primeiro conjunto de alvos de branqueamento químico fotoinduzido. Em algumas formas de realização, o método inclui ainda a detecção de um segundo conjunto de alvos na amostra biológica. O método pode ainda incluir a repetição da etapa de branqueamento químico fotoinduzido de sinal a partir do segundo conjunto de alvos, seguidos pela detecção de um terceiro conjunto de alvos presentes na amostra biológica, e assim por diante.

[00088] Em algumas formas de realização, o método inclui as etapas de

contato de uma amostra biológica com uma primeira sonda e ligação física de uma primeira sonda a um primeiro alvo. O método inclui ainda observar um primeiro sinal a partir da primeira sonda. Um reagente de transferência de elétrons é aplicado à sonda, e a amostra, incluindo o reagente de transferência de elétrons e a sonda, é irradiada, iniciando-se assim uma fotorreação que modifica o primeiro sinal. O método inclui ainda o contato da amostra biológica com uma segunda sonda e ligação física da segunda sonda a um segundo alvo na amostra biológica seguida de observação de um segundo sinal a partir da segunda sonda.

[00089] Em algumas formas de realização, o método também inclui as etapas de contato de uma amostra biológica com uma pluralidade de múltiplos conjuntos de sondas e ligação física da pluralidade de sondas a uma pluralidade de alvos. O método inclui ainda observar um primeiro conjunto de sinais a partir do primeiro conjunto de uma pluralidade de sondas. Um reagente de transferência de elétrons é aplicado a uma pluralidade de sondas, e a amostra é irradiada, iniciando-se assim uma fotorreação que modifica o primeiro conjunto de sinais a partir do primeiro conjunto de uma pluralidade de sondas. O método inclui ainda a geração de um segundo conjunto de sinais a partir do segundo conjunto de uma pluralidade de alvos e observação a partir do segundo conjunto de sinais. A geração do segundo conjunto de sinais pode compreender associar o segundo conjunto de sondas com uma porção separada que compreende gerador de sinal. Por exemplo, o segundo conjunto de sondas pode compreender uma etiqueta de biotina, e a unidade que compreende gerador de sinal pode também compreender estreptavidina capaz de se ligar a etiqueta de biotina. Alternativamente, a geração do segundo conjunto de sinais pode compreender desmascarar a unidade geradora de sinal, por exemplo, ao modificar a distância entre o par de resfriador brusco de fluoróforo. Em ainda outra forma de realização, o segundo conjunto de sinais pode surgir a partir de hibridação de sondas de ácidos nucleicos

marcadas para sequências complementares não marcadas no segundo conjunto de sondas.

[00090] Em outras formas de realização, o método inclui as etapas de proporcionar uma amostra incluindo múltiplos alvos e a ligação pelo menos uma sonda que tem um ligante acoplado a uma enzima a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda fazer reagir a sonda ligada com um substrato de enzima acoplado a um gerador de sinal e observar um sinal do gerador de sinal. Um reagente de transferência de elétrons que inativa substancialmente o gerador de sinal de ambos e a enzima, no decurso de uma fotorreação é aplicado à amostra. O método também inclui uma etapa separada opcional de inativação da enzima. A etapa de inativação de enzimas pode incluir, por exemplo, a aplicação de um reagente de inativação da enzima. O método inclui ainda a ligação pelo menos uma sonda subsequente que tem um ligante acoplado a uma enzima a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda fazer reagir a sonda ligada com um substrato de enzima acoplado a um gerador de sinal e observar um sinal do gerador de sinal.

[00091] Ainda em outras formas de realização, o método inclui as etapas de proporcionar uma amostra biológica, incluindo múltiplos alvos e a ligação de pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda observar um sinal a partir da sonda ligada. A sonda ligada é contactado com um reagente de transferência de elétrons, e a amostra compreende a sonda ligada e o reagente de transferência de elétrons é irradiado, branqueando, assim, a sonda. O método inclui ainda ligar pelo menos uma sonda subsequente a um ou mais alvos presentes na amostra, seguido pela observação de um sinal a partir da sonda ligada subsequente.

[00092] Ainda em outras formas de realização, o método inclui as etapas de proporcionar uma amostra biológica, incluindo múltiplos alvos e ligar pelo menos uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na

amostra. O método inclui ainda ligar pelo menos uma sonda de controle a um ou mais alvos na amostra. A sonda ligada é contactada com um reagente de transferência de elétrons, e a amostra compreendendo a sonda ligada e o reagente de transferência de elétrons é irradiada, branqueando, assim, a sonda e não a sonda de controle. O método inclui ainda ligar pelo menos uma sonda subsequente a um ou mais alvos presentes na amostra, seguido pela observação de um sinal a partir da sonda ligada subsequente.

[00093] Ainda em outras formas de realização, os métodos descritos acima proporcionam uma série de pelo menos duas imagens que descrevem os alvos biológicos opticamente marcados.

Amostras Biológicas

[00094] Uma amostra biológica, de acordo com uma forma de realização da invenção pode ser sólida ou líquida. Os exemplos adequados de amostras biológicas podem incluir, mas não estão limitados a, culturas, sangue, plasma, soro, saliva, fluido cefalorraquidiano, fluido pleural, leite, linfa, saliva, sémen, urina, fezes, lágrimas, saliva, aspirados de agulha, seções externas da pele, respiratório, intestinal e genito-urinário, tumores, órgãos, culturas de células ou constituintes de culturas de células ou seções de tecidos sólidos. As culturas celulares podem incluir a cultura mista de células, colônias de células-tronco ou culturas derivadas de diferentes linhas de câncer ou células primárias. Em algumas formas de realização, a amostra biológica pode ser analisada tal como está, isto é, sem a colheita e/ou isolamento do alvo de interesse. Em uma forma de realização alternativa, a colheita e isolamento de alvos podem ser realizados antes da análise. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser particularmente adequados para a análise *in vitro* de amostras biológicas.

[00095] A amostra biológica pode incluir qualquer das amostras acima mencionadas, independentemente do seu estado físico, tais como, mas não limitados a, sendo congelada ou corada ou tratadas de outra forma. Em

algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir compostos que não são naturalmente misturados com a amostra na natureza, tais como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos, ou outros semelhantes.

[00096] Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma amostra de tecido ou seção, uma célula inteira, um constituinte celular, por exemplo, organela celular, uma citospina, ou uma mancha celular. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica, inclui essencialmente uma amostra de tecido. Uma amostra de tecido pode incluir um conjunto de células semelhantes obtidas a partir de um tecido de um indivíduo biológico, que pode ter uma função semelhante. Em algumas formas de realização, uma amostra de tecido pode incluir um conjunto de células semelhantes obtidas a partir de um tecido de um humano. Os exemplos adequados de tecidos humanos incluem, mas não estão limitados a, (1) o epitélio; (2) os tecidos conjuntivos, incluindo vasos sanguíneos, ossos e cartilagens; (3) tecido muscular; e (4) tecido nervoso. A fonte da amostra de tecido pode ser obtida a partir de tecido sólido, um órgão congelado e/ou conservado ou amostra de tecido fresco ou de biópsia ou aspirado; sangue ou quaisquer componentes do sangue; fluidos corporais, tais como fluido espinhal cerebral, fluido amniótico, fluido peritoneal ou fluido intersticial; ou células de qualquer outro momento da gestação ou desenvolvimento do indivíduo. Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode incluir células primárias ou de cultura ou linhas celulares.

[00097] Em algumas formas de realização, uma amostra biológica, inclui seções de tecido a partir de amostras de tecidos saudáveis ou doentes (por exemplo, seções de tecido a partir do cólon, o tecido da mama, da próstata). A seção de tecido pode incluir uma única peça ou parte de uma amostra de tecido, por exemplo, uma fatia fina de tecido ou células de corte a partir de uma amostra de tecido. Em algumas formas de realização, podem ser

adotadas várias seções de amostras de tecido e submetidas à análise, uma vez que os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para análise do mesmo corte da amostra de tecido relativamente a pelo menos dois alvos diferentes (a nível molecular ou morfologia). Em algumas formas de realização, o microarranjo de tecido pode ser usado. Em algumas formas de realização, a mesma seção da amostra de tecido pode ser analisada relativamente a pelo menos cinco alvos diferentes (a nível molecular ou morfologia). Em algumas formas de realização, a mesma seção da amostra de tecido pode ser analisada no que diz respeito a mais do que cinco alvos diferentes (a nível molecular ou morfologia). Em algumas formas de realização, a mesma seção da amostra de tecido pode ser analisada a níveis tanto morfológicos quanto moleculares.

[00098] A seção de tecido, se utilizada como uma amostra biológica pode ter uma espessura em uma gama que é menor do que cerca de 100 micrômetros, em uma gama que é menor do que cerca de 50 micrômetros, em uma gama que é menor do que cerca de 25 micrômetros, ou na gama que é menor do que cerca de 10 micrômetros.

[00099] Em algumas formas de realização, a amostra biológica pode compreender uma ou mais das proteínas, hidratos de carbono ou os ácidos nucleicos. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica ou os alvos na amostra biológica podem ser aderidos a um suporte sólido. Um suporte sólido pode incluir microarranjos (por exemplo, microarranjos de DNA ou RNA), géis, blots, lâminas de vidro, grânulos, ou placas de ELISA. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica ou os alvos na amostra biológica, pode ser colado em uma membrana selecionada de nylon, nitrocelulose e difluoreto de polivinilideno. Em algumas formas de realização, o suporte sólido pode incluir uma superfície de plástico selecionado a partir de poliestireno, policarbonato e polipropileno.

Alvos

[000100] Um alvo pode estar presente na superfície de uma amostra

biológica (por exemplo, um antígeno de superfície de uma seção de tecido) ou presente no volume da amostra (por exemplo, um anticorpo em uma solução tampão). Em algumas formas de realização, um alvo pode estar inerentemente presente na superfície de uma amostra biológica e a amostra biológica pode ter que ser processada para tornar o alvo disponível sobre a superfície (por exemplo, a recuperação de antígenos, a digestão enzimática, a recuperação de epítipo, ou bloqueio). Em algumas formas de realização, o alvo pode estar presente em um fluido corporal tal como sangue, plasma sanguíneo, soro ou urina. Em algumas outras formas de realização, o alvo pode ser fixo em um tecido, quer na superfície de uma célula, ou dentro de uma célula.

[000101] Conveniência de alvos a serem analisados pode ser determinada pelo tipo e natureza da análise necessária para a amostra biológica. Em algumas formas de realização, um alvo pode proporcionar informação sobre a presença ou ausência de um analito na amostra biológica. Em outra forma de realização, um alvo pode proporcionar informação sobre o estado de uma amostra biológica. Por exemplo, se a amostra biológica compreende uma amostra de tecido, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para detectar alvos que podem ajudar na comparação de diferentes tipos de células ou tecidos, comparando diferentes fases de desenvolvimento, detectando a presença de uma doença ou anomalia, ou determinando o tipo de doença ou anormalidade.

[000102] Os alvos podem incluir um ou mais dos peptídeos, proteínas (por exemplo, anticorpos, aficorpos, ou aptâmeros), ácidos nucleicos (por exemplo, polinucleotídeos, DNA, RNA, ou aptâmeros); polissacarídeos (por exemplo, lectinas ou açúcares), lípidos, enzimas, substratos de enzimas, ligandos, receptores, antígenos, ou haptenos. Em algumas formas de realização, os alvos podem essencialmente incluir proteínas ou ácidos nucleicos. Em outras formas de realização, vários tipos de alvos, por exemplo, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lípidos, enzimas, substratos de enzimas,

ligandos, receptores, antígenos ou haptenos podem ser detectados e/ou analisados na mesma amostra biológica em um ou vários ciclos. Um ou mais dos alvos acima mencionados podem ser característicos de células particulares, enquanto que outros alvos podem estar associados a uma doença ou condição particular. Em algumas formas de realização, os alvos que podem ser detectados e analisados utilizando os métodos aqui divulgados podem incluir, mas não estão limitados a alvos de receptores, os alvos de prognóstico, alvos de receptor de hormônio ou de hormônio, alvos linfoides, alvos tumorais, alvos associados ao ciclo celular, alvos de tumor e tecido neural, ou alvos de diferenciação de aglomerado.

[000103] Os exemplos adequados de alvos prognósticos podem incluir alvos enzimáticos, tais como galactosil transferase II, enolase específica neuronal, ATPase-2 de próton, ou a fosfatase de ácido.

[000104] Os exemplos adequados de alvos de receptor de hormônio ou de hormônio podem incluir gonadotrofina coriônica humana (HCG), hormônio adrenocorticotrófico, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno prostático específico (PSA), receptor de estrogênio, receptor de progesterona, receptor de andrógeno, receptor de complemento gC_{1q} -R/p33, IL-2, receptor de neurotrofina p75, receptor de PTH, receptor da hormônio da tiroide ou receptor de insulina.

[000105] Os exemplos adequados de alvos linfoides podem incluir alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, alvo de células B, bC_{1-2} , bC_{1-6} , antígeno de linfócito B de 36 kD, BM1 (alvo mieloide), BM2 (alvo mieloide), galectina-3, granzima B, antígeno HLA classe I, antígeno HLA classe II (DP), antígeno HLA classe II (DQ), antígeno HLA classe II (DR), defensinas de neutrófilos humanos, imunoglobulina A, imunoglobulina D, imunoglobulina G, imunoglobulina M, cadeia leve kappa, cadeia leve kappa, cadeia leve lambda, o antígeno de linfócitos/histócito, alvo de macrófagos, muramidase (lisozima), p80 linfoma anaplásico quinase, alvo de células plasmáticas,

inibidor de protease de leucócito de secreção, receptor de antígeno de células T (JOVI 1), receptor de antígeno de células T (JOVI 3), desoxinucleotidil transferase terminal ou alvo de células B não aglomeradas.

[000106] Os exemplos adequados de alvos tumorais podem incluir alfa-fetoproteína, a apolipoproteína D, BAG-1 (proteína RAP46), CA19-9 (sialil Lewisa), CA50 (antígeno de mucina associado a carcinoma), CA125 (antígeno do câncer do ovário), CA242 (antígeno de mucina associado a tumor), cromogranina A, clusterin (apolipoproteína J), antígeno de membrana epitelial, antígeno relacionado ao epitélio, antígeno específico epitelial, proteína-15 de fluido de doença cística bruta, antígeno específico de hepatócito, heregulin, mucina gástrica humana, glóbulo de gordura do leite humano, MAGE-1, metaloproteinases de matriz, melan A, alvo de melanoma (HMB45), mesotelina, metalotioneína, fator de transcrição de microftalmia (MITF), glicoproteína de núcleo Muc-1. glicoproteína Muc-1, glicoproteína Muc-2, glicoproteína Muc-5AC, glicoproteína Muc-6, mieloperoxidase, (alvo Rabdmiossarcoma) Mito-3, Myf-4 (alvo Rabdmiossarcoma), MyoD1 (alvo Rabdmiossarcoma), a mioglobina, proteína nm23, placentário fosfatase alcalina, pré-albumina, antígeno específico da próstata, fosfatase ácida prostática, peptídeo prostática inibina, PTEN, alvo de carcinoma de células renais, antígenos mucinosos de intestino delgado, tetranectinas, fator de transcrição tireoidiano 1, inibidor de tecido de metaloproteinase 1 de matriz, células de metaloproteinase 2 de matriz, tirosinase, proteína-1relacionada com tirosinase, vilina ou fator de von Willebrand.

[000107] Os exemplos adequados de alvos associados com ciclo celular podem incluir fator-1 de ativação de apoptose protease, BC₁-w, bC₁-x, bromodeoxiuridina, CAK (ativador de quinase CDK), proteína vom susceptibilidade a apoptose celular (CAS), caspase 2, caspase 8, CPP32 (caspase-3), CPP32 (caspase-3), quinases dependentes de ciclina, ciclina A, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, ciclina E, ciclina G, fator de

fragmentação do DNA (N-terminal), Fas (CD95), proteína de domínio de morte associada a Fas, Fas ligante, Fen-1, IPO-38, MC₁-1, proteínas de manutenção de minicromossoma, proteína de reparo de desconjugação (MSH2), poli (ADP-ribose) polimerase, antígeno nuclear de proliferação celular, proteína PL6, proteína p27, p34cdc2, proteína p57 (Kip2), proteína p105, Stat 1 alfa, topoisomerase I, topoisomerase II alfa, topoisomerase III alfa, ou topoisomerase II beta.

[000108] Os exemplos adequados de alvos de tecido neural e tumor podem incluir alfa B cristalina, alfa-internexina, alfa sinucleína, proteína precursora de amiloide, beta-amiloide, calbindina, colina acetiltransferase, transportador de aminoácidos excitatórios 1, GAP43, proteína ácida fibrilar glial, glutamato 2 receptor, a proteína básica da mielina, receptor de fator de crescimento de nervo (gp75), alvo neuroblastoma, neurofilamentos 68 kD, neurofilamentos 160 kD, neurofilamentos 200 kD, enolase específica do neurônio, receptor de acetilcolina nicotínica alfa4, receptor de acetilcolina nicotínica beta2, periferina, produto do gene da proteína 9 , proteína S-100, serotonina, SNAP-25, sinapsina I, sinaptofisina, tau, triptofano hidroxilase, tirosina hidroxilase ou ubiquitina.

[000109] Os exemplos adequados de alvos de diferenciação de fragmentação podem incluir CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3delta, CD3epsilon, CD3gamma, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8alpha, CD8beta, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26 , CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD46, CD47 , CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65 , CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d,

CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CDw93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD115, CD116, CD117, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CDw125, CD126, CD127, CDw128a, CDw128b, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CDw150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, e TCR-zeta.

[000110] Outros alvos prognósticos podem incluir centrômero proteína-F (CENP-F), Giantin, involucrina, lamin A & C (XB 10), LAP-70, mucina, proteínas complexas poro nuclear, proteína corporal lamelar p180, ran, r, catepsina D, proteína Ps2, HeR₂-neu, P53, S100, antígeno alvo epitelial (EMA), TdT, MB2, MB3, PCNA, ou Ki67.

SONDAS

[000111] Conforme definido anteriormente, a sonda se refere a um agente que tem um ligante e um marcador, tal como um gerador de sinal ou uma enzima.

[000112] Em algumas formas de realização, um ligante e um marcador (gerador de sinal ou uma enzima) podem ser acoplados um ao outro diretamente (isto é, sem quaisquer ligadores). Em outras formas de realização, um ligante e um marcador (gerador de sinal ou uma enzima) podem ser acoplados uns aos outros através de um ligante. Tal como aqui utilizado, “acoplado”, geralmente se refere a duas entidades (por exemplo, ligante e gerador de sinal) estavelmente ligadas uma a outra por qualquer meio físico-químico. A natureza do acoplamento pode ser tal que não prejudique

substancialmente a eficácia de qualquer das entidades. Um ligante e um marcador podem estar acoplados um ao outro através de interações covalentes ou não-covalentes. Interações não covalentes podem incluir, mas não estão limitadas a, interações hidrofóbicas, interações iônicas, interações de ligação-hidrogênio, interações de elevada afinidade (tais como, a complexação biotina-avidina ou biotina-estreptavidina) ou outras interações de afinidade.

[000113] Em algumas formas de realização, um ligante e um marcador (gerador de sinal ou uma enzima) podem ser ligados quimicamente um ao outro por meio de grupos funcionais capazes de reagir e formar uma ligação, sob condições adequadas. Os exemplos adequados de combinações de grupos funcionais podem incluir, mas não estão limitados a, éster de amina e aminas ou anilinas; acilazida e aminas ou anilinas; halogenetos de acila e aminas, anilinas, álcoois, fenóis ou; acilnitrila e álcoois ou fenóis; aldeído e aminas ou anilinas; halogeneto de alquila e aminas, anilinas, álcoois, fenóis ou tiois; sulfonato de alquila e de tiois, álcoois ou fenóis; anidrido e álcoois, fenóis, aminas ou anilinas; halogeneto de arila e tiois; aziridina e tiois ou tioéteres; ácido carboxílico e aminas, anilinas, álcoois ou halogenetos de alquila; diazoalcano e ácidos carboxílicos; epóxido e tiois; haloacetamida e tiois; halotriazina e aminas, anilinas ou fenóis; hidrazina e aldeídos ou cetonas; hidroxilamina e aldeídos ou cetonas; éster de imido e aminas ou anilinas; isocianato e aminas ou anilinas; e isotiocianato e aminas ou anilinas. Um grupo funcional, em um par de grupos funcionais acima mencionados pode estar presentes em um ligante e um grupo funcional correspondente pode estar presente no gerador de sinal ou na enzima. Por exemplo, um ligante pode incluir um ácido carboxílico e o gerador de sinal ou a enzima pode incluir uma amina, anilina, o álcool ou haleto de acila, ou vice-versa. A conjugação entre o ligante e o gerador de sinal ou a enzima pode ser efetuada, neste caso, através da formação de uma amida ou de uma ligação de éster.

[000114] Em algumas formas de realização, o ligante pode ser marcado

intrinsecamente com um gerador de sinal (por exemplo, se o ligante for uma proteína, durante a síntese utilizando um aminoácido marcado de forma detectável) ou uma enzima (por exemplo, se o ligante é uma enzima). Um ligante que seja marcado intrinsecamente pode não requerer um gerador de sinal ou uma enzima separada de modo a ser detectado. Pelo contrário, o marcador intrínseco pode ser suficiente para tornar a sonda detectável. Em formas de realização alternativas, o ligante pode ser marcado pela ligação específica a um gerador de sinal ou uma enzima (ou seja, marcado extrinsecamente).

[000115] Em algumas formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são incorporados em uma única entidade. Em formas de realização alternativas, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são incorporados em entidades discretas (por exemplo, um anticorpo primário capaz de ligar um alvo e uma enzima ou um anticorpo secundário marcado com gerador de sinal capaz de se ligar ao anticorpo primário ou um hapteno marcado com anticorpo primário capaz de ligar um alvo e uma enzima ou um sinal marcado com gerador de anticorpo anti-hapteno capaz de ligar o hapteno marcado com o anticorpo primário). Quando o ligante e o gerador de sinal ou a enzima são entidades separadas, podem ser aplicados a uma amostra biológica em uma única etapa ou em várias etapas. Em algumas formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são entidades separadas que estão pré-fixadas, antes da aplicação para a amostra biológica e aplicadas para a amostra biológica em uma única etapa. Em ainda outras formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são entidades separadas que são aplicadas para a amostra biológica de modo independente e se combinam a seguir à aplicação.

PASTAS

[000116] Os métodos aqui descritos envolvem o uso de ligantes que se ligam fisicamente ao alvo de um modo específico. Em algumas formas de

realização, um ligante pode se ligar a um alvo com especificidade suficiente, isto é, um ligante pode se ligar a um alvo com maior afinidade do que a qualquer outra molécula. Em algumas formas de realização, o ligante pode se ligar a outras moléculas, mas a ligação pode ser de tal modo que a ligação não específica pode ser a ou perto dos níveis de fundo. Em algumas formas de realização, a afinidade do ligante para o alvo de interesse pode estar em uma gama que pelo menos 2 vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos de 10 vezes, ou mais do que a sua afinidade para outras moléculas. Em algumas formas de realização, ligantes com a maior afinidade diferencial podem ser usados, embora possam não ser aqueles com a maior afinidade para o alvo.

[000117] Em algumas formas de realização, a ligação entre o alvo e o ligante pode ser afetada pela ligação física. A ligação física pode incluir a ligação efetuada usando interações não-covalentes. Interações não covalentes podem incluir, mas não estão limitadas a, interações hidrofóbicas, interações iônicas, interações de hidrogênio-ligação, ou interações de afinidade (tais como, a complexação biotina-avidina ou biotina-estreptavidina). Em algumas formas de realização, o alvo e o ligante podem ter áreas nas suas superfícies ou em cavidades que dão origem a um reconhecimento específico entre as duas, resultando em ligação física. Em algumas formas de realização, um ligante pode se ligar a um alvo biológico com base no ajuste recíproco de uma porção das suas formas moleculares.

[000118] Os ligantes e os seus alvos correspondentes podem ser considerados como pares de ligação, cujos exemplos não-limitativos incluem pares de ligação de tipo imune, tais como, o antígeno/anticorpo, fragmento de antígeno/anticorpo, ou hapteno/anti-hapteno; ligação de pares do tipo não imune, como a biotina/avidina, biotina/estreptavidina, proteína de ligação de ácido fólico/folato, receptor de hormônio/hormônio, lectina/carboidrato específico, enzima/enzima, enzima/substrato, enzima/substrato analógico, enzima/pseudo-substrato (análogos de substratos que não podem ser

catalisados pela atividade enzimática), enzima/cofator, enzima/modulador, enzima/inibidor ou fator B12/ vitamina intrínseca. Outros exemplos adequados de pares de ligação podem incluir fragmentos de ácido nucleico complementares (Incluindo as sequências de DNA, sequências de RNA, sequências de LNA, e sequências de ANP ou de outros ácidos nucleicos modificados conhecidos na literatura); A proteína A/anticorpo; proteína G/anticorpo; proteína de ligação de ácidos nucleicos/ácidos nucleicos; ou proteína ligação de polinucleotídeo/polinucleotídeo.

[000119] Em algumas formas de realização, o ligante pode ser um ligante específico em sequência ou em estrutura, em que a sequência ou a estrutura de um alvo reconhecido e ligado pelo ligante pode ser suficientemente única para aquele alvo.

[000120] Em algumas formas de realização, o ligante pode ser específico em estrutura e pode reconhecer uma estrutura primária, secundária ou terciária de um alvo. A estrutura primária de um alvo pode incluir a especificação de sua composição atômica e as ligações químicas que conectam esses átomos (incluindo estereoquímica), por exemplo, o tipo e natureza do arranjo linear dos aminoácidos de uma proteína. A estrutura secundária de um alvo pode se referir a forma tridimensional geral de segmentos de biomoléculas, por exemplo, para uma proteína de uma estrutura secundária pode se referir à dobragem da “cadeia principal” de peptídeo em várias conformações que podem resultar em aminoácidos distantes sendo trazido para a proximidade uns com os outros. Os exemplos adequados de estruturas secundárias podem incluir, mas não estão limitados a, hélices alfa, folhas beta pregueadas ou serpentinas aleatórias. A estrutura terciária de um alvo pode ser a sua estrutura tridimensional global. A estrutura quaternária de um alvo pode ser a estrutura formada pela sua interação não covalente com um ou mais outros alvos ou macromoléculas (tais como a interação de proteínas). Um exemplo de uma estrutura quaternária pode ser a estrutura

formada pelas quatro subunidades proteicas da globina para fazer a hemoglobina. Um ligante de acordo com as formas de realização da invenção pode ser específico para qualquer das estruturas acima mencionadas.

[000121] Um exemplo de uma estrutura específica do aglutinante pode incluir uma molécula específica de proteínas que pode se ligar a uma proteína alvo. Exemplos de moléculas específicas de proteína adequadas podem incluir anticorpos e fragmentos de anticorpos, ácidos nucleicos (por exemplo, aptâmeros que reconhecem alvos proteicos) ou substratos proteicos (não catalisáveis).

[000122] Em algumas formas de realização, um alvo pode incluir um antígeno e um ligante pode incluir um anticorpo. Um anticorpo adequado pode incluir anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), ou fragmentos de anticorpos, desde que se liguem especificamente a um antígeno alvo.

[000123] Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula ou uma amostra de tecido e os métodos aqui divulgados podem ser utilizados em imuno-histoquímica (IHQ). Imunoquímica pode envolver ligação de um antígeno alvo de um aglutinante à base de anticorpos para fornecer informações sobre os tecidos ou células (por exemplo, células doentes contra as células normais). Os exemplos de anticorpos (e as células doentes/doenças correspondentes) adequados como ligantes para os métodos aqui descritos incluem, mas não estão limitados a, anticorpo de receptor de anti-estrogênio (câncer da mama), anticorpo de receptor de anti-progesterona (câncer da mama), anticorpo anti-p53 (vários cânceres), anticorpo anti-Her-2/neu (cânceres múltiplos), anticorpo anti-EGFR (fator de crescimento epidérmico, vários cânceres), anticorpo anti-catepsina D (mama e outros cânceres), anticorpos anti-BC₁-2 (apoptose), anticorpo anti-E-caderina, anticorpo anti-CA125 (ovário e outros cânceres), anticorpo anti-CA15-3 (câncer da mama), anticorpo anti-CA19-9 (câncer do cólon), anticorpo anti-c-

erbB -2, anticorpo anti-P-glicoproteína (MDR, resistência a múltiplas drogas), anticorpo anti-CEA (antígeno carcinoembrionário), anti-proteína do retinoblastoma (Rb), anticorpo anti-ras oncoproteína (P21), anticorpo anti-Lewis X (também chamado de CD 15), anticorpo anti-Ki-67 (proliferação celular), anticorpo anti-PCNA (cânceres múltiplos), anticorpo anti-CD3 anticorpo (células T), anti- anticorpo CD4 (células T auxiliares), anticorpo (células T) anti-CD5, anticorpo anti-CD7 (timócitos, células T imaturas, as células assassinas NK), (células T supressoras) anticorpo anti-CD8, anticorpo anti-CD9/p24 (ALL), anticorpo anti-CD 10 (também denominado CALLA) (leucemia linfoblástica aguda comum), anticorpo anti-CD 11c (monócitos, granulócitos, AML), anticorpo anti-CD13 (células mielomonocíticas, AML), anticorpo anti-CD14 (maduro monócitos, granulócitos), anticorpo anti-CD15 (doença de Hodgkin), anticorpo anti-CD19 (células B), anticorpo anti-CD20 (células B), anticorpo anti-CD22 (células B), anticorpo anti-CD23 (células B ativadas, CLL), anticorpo anti-CD30 (células T e B ativadas, doença de Hodgkin), anticorpo anti-CD31 (marcador de angiogênese), anticorpo anti-CD33 (células mieloides, AML), anticorpo anti-CD34 (células estaminais endoteliais, tumores estromais), anticorpo anti-CD35 (células dendríticas), anticorpo anti-CD38 (células do plasma, ativadas T, B e células mieloides), anticorpo anti-CD41 (plaquetas, megacariócitos), anticorpo anti-LCA/CD45 (antígeno de leucócitos comum), anticorpo anti-CD45RO (anticorpo auxiliares, células indutor T), anticorpo anti-CD45RA (linfócitos B), anticorpo anti-CD39, anticorpo CD100, anticorpo anti-CD95/Fas (apoptose), anticorpo anti-CD99 (marcador de Sarcoma de Ewings, produto de gene MIC2), anticorpo anti-CD 106 (VCAM-1; células endoteliais ativadas), anticorpo anti-ubiquitina (mal de Alzheimer), anticorpo anti-CD71 (receptor de transferrina), anticorpo anti-c-myc (oncoproteína e um hapteno), anticorpo anti-citoqueratinas (receptor de transferrina), anticorpo (células B e T) anti-vimentins (endotelial células), anticorpo anti-HPV proteínas (humano

papilomavírus), anticorpo de cadeias leves anti-kappa (células B), anticorpo de cadeias leves anti-lambda (células B), anticorpo anti-melanossomas (HMB45) (melanoma), anticorpo de antígeno específico anti-próstata (PSA) (câncer da próstata), anticorpo anti-S-100 (melanoma, saliva, células gliais), anticorpo de antígeno anti-tau (mal de Alzheimer), anticorpo anti-fibrina (células epiteliais), anticorpo anti-queratinas, anticorpo anti-citoqueratina (tumor), anti-alfa-catenina (membrana celular), ou anticorpos de anti-Tn-antígeno (carcinoma de cólon, adenocarcinomas e câncer de pâncreas).

[000124] Outros exemplos específicos de anticorpos adequados podem incluir, mas não estão limitados a, antígeno nuclear de células em anti-proliferação, clone pC₁0 (Sigma Aldrich, P8825); anti actina alfa de músculo liso (SmA), clone 1A4 (sigma, A2547); anti catenina beta coelho (Sigma, C 2206); anti citoqueratina pan de rato, clone PCK-26 (Sigma, C₁801); alfa receptor de anti estrogênio de rato, clone 1D5 (DAKO, M 7047); anticorpo beta catenina, clone 15B8 (sigma, C 7738); anti vimentina de cabra (Sigma, V4630); clone do receptor de ciclo andrógeno AR441 (DAKO, M3562); Fator 7 de Von Willebrand, queratina 5, queratina 8/18, e-caderina, HeR2/neu, receptor de estrogênio, p53, receptor de progesterona, beta catenina; anti-rato de burro (Jackson Immunoresearch, 715-166-150); ou anti coelho de burro (Jackson Immunoresearch, 711-166-152).

[000125] Em algumas formas de realização, um ligante pode ser específico da sequência. Um ligante específico de sequência pode incluir um ácido nucleico e o ligante pode ser capaz de reconhecer um arranjo linear particular de nucleotídeos ou os seus derivados no alvo. Em algumas formas de realização, o arranjo linear pode incluir nucleotídeos contíguos ou seus derivados que podem, cada um, se ligar a um nucleotídeo complementar correspondente ao ligante. Em uma modalidade alternativa, a sequência pode não ser contígua, pois pode haver um, dois, ou mais nucleotídeos que podem não ter correspondentes resíduos complementares sobre a sonda. Os exemplos

adequados de ligantes à base de ácido nucleico podem incluir, mas não estão limitados a, oligonucleotídeos ou polinucleotídeos de DNA ou RNA. Em algumas formas de realização, os ácidos nucleicos adequados podem incluir análogos de ácidos nucleicos, tais como dioxigenina dCTP, biotina dcTP 7-azaguanosina, azidotimidina, inosina ou uridina.

[000126] Em certas formas de realização, tanto o ligante e o alvo podem incluir ácidos nucleicos. Em algumas formas de realização, um aglutinante à base de ácido nucleico pode formar uma ligação de Watson-Crick com o alvo de ácido nucleico. Em uma outra forma de realização, o ligante de ácido nucleico pode formar uma ligação de Hoogsteen com o alvo de ácido nucleico, formando assim um triplex. Um ligante de ácido nucleico que se liga por ligação de Hoogsteen pode entrar o sulco maior de um ácido nucleico alvo e hibrida com as bases ali localizadas. Os exemplos adequados dos ligantes acima podem incluir moléculas que reconhecem e se ligam aos sulcos maiores e menores de ácidos nucleicos (por exemplo, algumas formas de antibióticos). Em certas formas de realização, os ligantes de ácidos nucleicos podem formar tanto de ligações de Watson-Crick quanto de Hoogsteen com o ácido nucleico alvo (por exemplo, sondas bis ANP são capazes tanto de ligações de Watson-Crick quanto de Hoogsteen a um ácido nucleico).

[000127] O comprimento de ligante de ácido nucleico pode também determinar a especificidade da ligação. O custo energético de uma única defasagem entre o ligante e o alvo de ácido nucleico pode ser relativamente superior para sequências mais curtas do que para mais longas. Em algumas formas de realização, a hibridação de pequenos ligantes de ácidos nucleicos pode ser mais específica do que a hibridação de sondas de ácido nucleico mais longas, como as sondas mais longas podem ser mais receptivas a desemparelhamentos e podem continuar a se ligar ao ácido nucleico, dependendo das condições. Em certas formas de realização, os ligantes mais curtos podem apresentar estabilidade de ligação menor do que uma dada

temperatura e concentração de sal. Ligantes que podem apresentar uma maior estabilidade para ligar as sequências curtas podem ser usados neste caso (por exemplo, bis-ANP). Em algumas formas de realização, o ligante de ácido nucleico pode ter um comprimento na gama de desde cerca de 4 nucleotídeos a cerca de 12 nucleotídeos, de cerca de 12 nucleotídeos a cerca de 25 nucleotídeos, de cerca de 25 nucleotídeos a cerca de 50 nucleotídeos, de cerca de 50 nucleotídeos a cerca de 100 nucleotídeos, a partir de cerca de 100 nucleotídeos até cerca de 250 nucleotídeos, de cerca de 250 nucleotídeos até cerca de 500 nucleotídeos, ou de cerca de 500 nucleotídeos de cerca de 1000 nucleotídeos. Em algumas formas de realização, o ligante de ácido nucleico pode ter um comprimento em uma gama que é maior do que cerca de 1000 nucleotídeos. Não obstante ao comprimento do ligante de ácido nucleico, todos os resíduos de nucleotídeos do ligante não podem hibridar com os nucleotídeos complementares do ácido nucleico alvo. Por exemplo, o ligante pode incluir 50 resíduos de nucleotídeos de comprimento e apenas 25 desses resíduos de nucleotídeos podem hibridizar com o ácido nucleico alvo. Em algumas formas de realização, os resíduos de nucleotídeos que pode hibridar podem ser contíguas uma com a outra. Os ligantes de ácidos nucleicos podem ser de cadeia simples ou podem incluir uma estrutura secundária. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula ou uma amostra de tecido e a amostra biológica pode ser submetida à hibridação *in situ* (ISH) utilizando um ligante de ácido nucleico. Em algumas formas de realização, uma amostra de tecido pode ser submetida à hibridização *in situ* além de imuno-histoquímica (IHC), para obter a informação desejada a partir da amostra.

[000128] Independentemente do tipo de ligante e do alvo, a especificidade de ligação entre o ligante e o alvo pode também ser afetada, dependendo das condições de ligação (por exemplo, condições de hibridação no caso de ácidos nucleicos complementares). As condições de ligação

adequadas podem ser realizadas por meio da modulação de um ou mais de pH, temperatura ou concentração de sal.

[000129] Um ligante pode ser intrinsecamente marcado (gerador de sinal ou enzima ligada durante a síntese de ligante) ou extrinsecamente marcado (gerador de sinal ou enzima ligada durante uma etapa posterior). Por exemplo, para um ligante à base de proteínas, um ligante marcado intrinsecamente pode ser preparado utilizando aminoácidos marcados. Da mesma forma, um ácido nucleico marcado intrinsecamente pode ser sintetizado utilizando métodos que incorporam nucleotídeos marcados com gerador de sinal ou gerador de sinal rotulado fosforamídeos de nucleosídeos diretamente para o crescimento de ácido nucleico, dependendo do método utilizado para a síntese do ácido nucleico. Em algumas formas de realização, um ligante pode ser sintetizado de uma maneira tal que os geradores de sinal ou enzimas podem ser incorporados em uma fase posterior. Por exemplo, esta última marcação pode ser conseguida por meios químicos através da introdução de grupos amino ou tiol ativos em ácidos nucleicos ou cadeias peptídicas. Em algumas formas de realização, um ligante, tal como uma proteína (por exemplo, um anticorpo) ou um ácido nucleico (por exemplo, um DNA), pode ser diretamente marcado quimicamente usando produtos químicos adequados.

[000130] Em algumas formas de realização, as combinações de ligantes podem ser utilizadas que podem proporcionar uma maior especificidade ou, em determinadas formas de realização, a amplificação do sinal. Assim, em algumas formas de realização, um sanduíche de ligantes pode ser utilizado, em que o primeiro ligante pode se ligar ao alvo e servir para proporcionar a ligação secundária, onde o ligante secundário pode ou não incluir um marcador, o qual pode ainda proporcionar a ligação terciária (se necessário), onde o membro de ligação terciária pode incluir um marcador.

[000131] Os exemplos adequados de combinações de ligantes podem

incluir anticorpo primário-anticorpo secundário, os ácidos nucleicos complementares ou outros pares de ligando-receptor (tal como biotina-estreptavidina). Alguns exemplos específicos de pares de ligantes adequados podem incluir anti-myc de rato para as proteínas recombinantes expressas com epítipo c-myc; anti-hisG de rato para a proteína recombinante com epítipo His-Tag, anti-expressTM de rato para a proteína recombinante com epítipo etiqueta, coelho anti-cabra para as moléculas primárias IgG de cabra, sequência de ácido nucleico complementar de um ácido nucleico; anti-tio de camundongo de proteínas de fusão tioredoxina, anti-GFP de coelho para a proteína de fusão, jacalina para alfa-D-galactose; e melibiose para proteínas de ligação de carboidratos, açúcares, matriz de acoplamento de níquel ou heparina.

[000132] Em algumas formas de realização, uma combinação de um anticorpo primário e um anticorpo secundário pode ser usada como um ligante. Um anticorpo primário pode ser capaz de se ligar a uma região específica do alvo e o anticorpo secundário pode ser capaz de se ligar ao anticorpo primário. Um anticorpo secundário pode ser ligado a um gerador de sinal ou uma enzima antes de se ligar ao anticorpo primário, ou pode ser capaz de se ligar a um gerador de sinal ou uma enzima em uma etapa posterior. Em uma forma de realização alternativa, pode ser utilizado um anticorpo primário e pares de ligando-receptor de ligação específica (tais como biotina-estreptavidina). O anticorpo primário pode ser ligado a um elemento do par (por exemplo, biotina) e o outro elemento (por exemplo, estreptavidina) pode ser marcado com um gerador de sinal ou uma enzima. O anticorpo secundário, avidina, estreptavidina, biotina, ou pode ser cada um independentemente marcado com um gerador de sinal ou uma enzima.

[000133] Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados em um procedimento de imunocoloração, e um anticorpo primário pode ser utilizado para se ligar especificamente à proteína

alvo. Um anticorpo secundário pode ser utilizado para se ligar especificamente ao anticorpo primário, formando assim uma ponte entre o anticorpo primário e um reagente subsequente (por exemplo, um gerador de sinal ou enzima), se existir. Por exemplo, um anticorpo primário pode ser IgG de camundongo (um anticorpo criado em camundongo) e o anticorpo secundário correspondente pode ser de anti-rato de cabra (anticorpo criado em cabra) que tem regiões capazes de se ligarem a uma região na IgG de camundongo.

[000134] Em algumas formas de realização, a amplificação de sinal pode ser obtida quando vários anticorpos secundários podem se ligar a epitopos no anticorpo primário. Em um processo de imunocoloração um anticorpo primário pode ser o primeiro anticorpo utilizado no processo e o anticorpo secundário pode ser o segundo anticorpo utilizado no processo. Em outras formas de realização, um terço do anticorpo pode ser utilizado para aumentar ainda mais o sinal. Por exemplo, um anticorpo produzido no rato pode ser usado para ligar o alvo. Um anticorpo secundário de cabra anti-camundongo pode ser utilizado para ligar o anticorpo primário e um anticorpo de burro anti-cabra marcado pode ser utilizado como um anticorpo terciário ao se ligar aos anticorpos secundários já ligados ao anticorpo primário o qual está ligado ao alvo. Em algumas formas de realização, um anticorpo primário pode ser o único anticorpo utilizado em um processo de imunocoloração.

Geradores de Sinais

[000135] O tipo de gerador de sinal adequado para os métodos aqui divulgados pode depender de uma variedade de fatores, incluindo a natureza da análise que está sendo conduzida, o tipo da fonte de energia e o detector utilizado, o tipo de reagente de transferência de elétrons usado, o tipo de ligante, e o tipo de alvo.

[000136] Um gerador de sinal adequado pode incluir uma molécula ou um composto capaz de proporcionar um sinal detectável. Um gerador de sinal

pode proporcionar um sinal a seguir à interação característica com uma fonte de energia ou uma corrente. Uma fonte de energia pode incluir fonte de radiação eletromagnética e uma fonte de excitação de fluorescência. Fonte de radiação eletromagnética pode ser capaz de fornecer a energia eletromagnética de qualquer comprimento de onda, incluindo visível, infravermelha e ultravioleta. A radiação eletromagnética pode ser na forma de uma fonte de luz direta ou pode ser emitida por um composto emissor de luz, tal como um fluoróforo doador. A fonte de excitação de fluorescência pode ser capaz de fazer uma fonte fluorescer ou pode dar origem a emissões fotônicas (ou seja, a radiação eletromagnética, campo elétrico dirigido, temperatura, contato físico ou ruptura mecânica). Geradores de sinal adequados podem proporcionar um sinal capaz de ser detectado por uma variedade de métodos, incluindo as medições ópticas (por exemplo, fluorescência), condutividade elétrica, ou radioatividade. Geradores de sinal adequados podem ser, por exemplo, emissores de luz, aceptores de energia, fluorescentes, radioativos ou de resfriamento rápido.

[000137] Um gerador de sinal adequado pode ser estericamente e quimicamente compatível com os constituintes aos quais ele está ligado, por exemplo, um ligante. Além disso, um gerador de sinal adequado pode não interferir com a ligação do ligante ao alvo, nem pode afetar significativamente a especificidade de ligação do ligante. Um gerador de sinal adequado pode ser orgânico ou inorgânico na natureza. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser de natureza de produto químico, peptídeo ou ácido nucleico.

[000138] Um gerador de sinal adequado pode ser diretamente detectável. Uma porção diretamente detectável pode ser uma que pode ser detectada diretamente pela sua capacidade para emitir um sinal, tal como, por exemplo, um marcador fluorescente que emite luz de um comprimento de onda particular, a seguir de excitação por luz de um outro comprimento de

onda característico inferior e/ou absorção de luz de um comprimento de onda particular.

[000139] Um gerador de sinal, adequado de acordo com os métodos aqui divulgados podem ser passíveis de manipulação na aplicação de um reagente de transferência de elétrons. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser capaz de ser branqueada, por exemplo, o sinal que gera pode ser diminuído ou destruído como resultado do gerador de sinal a ser modificado no decurso de uma fotorreação. A modificação química pode incluir a desintegração completa do gerador de sinal ou a modificação do componente de geração de sinal do gerador de sinal. Em algumas formas de realização, o gerador de sinal é carregado.

[000140] A modificação do componente de geração de sinal pode incluir qualquer modificação química (tais como a adição, substituição ou remoção), que pode resultar na modificação do sinal gerando as propriedades. Por exemplo, desconjugação de um gerador de sinal conjugado pode resultar na destruição de propriedades cromogênicas do gerador de sinal. Da mesma forma, a substituição de um grupo funcional de inibição de fluorescência em um gerador de sinal fluorescente pode resultar na modificação das suas propriedades fluorescentes. Em algumas formas de realização, um ou mais geradores de sinal substancialmente resistentes à inativação por um agente químico específico pode ser utilizado como uma sonda de controle nos métodos fornecidos.

[000141] Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser selecionado a partir de uma molécula emissora de luz, um radioisótopo (por exemplo, P^{32} ou H^3 , ^{14}C , ^{125}I e ^{131}I), um marcador de densidade óptica ou elétron, um marcador ativo de Raman, uma molécula de ressonância de spin eletrônico (como, por exemplo, radicais de nitroxila), uma molécula de transferência de carga elétrica (ou seja, uma molécula de transdução de carga elétrica), um nanocrystal semiconductor, uma nanopartícula semicondutora, um

nanocristal de ouro coloidal, uma microconta, uma conta magnética, uma partícula paramagnética.

[000142] Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser um gerador de sinal óptico, por exemplo, pode incluir uma molécula emissora de luz. Uma molécula emissora de luz pode emitir luz em resposta à irradiação com luz de um determinado comprimento de onda. As moléculas emissoras de luz podem ser capazes de absorver e emitir luz através da luminescência (emissão não térmica de radiação eletromagnética por um material sob excitação), fosforescência (luminescência retardada como resultado da absorção de radiação), quimioluminescência (luminescência devido a uma reação química), fluorescência, ou fluorescência polarizada. Exemplos não limitativos de geradores de sinais ópticos incluem um gerador de sinal fluorescente, por exemplo, um fluoróforo, um marcador ativo de Raman ou um cromóforo.

[000143] Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um fluoróforo. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um fluoróforo ligado a um anticorpo, por exemplo, em uma análise imuno-histoquímica. Fluoróforos adequados que podem ser conjugados a um anticorpo primário, incluem, mas não estão limitados a, fluoresceína, rodamina, Texas Red, VECTOR Red, ELF (fluorescência rotulada por enzima), Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy7, Fluor X, Calcein, Calcein-AM, CRYPTOFLUOR, Laranja (42 kDa), Tangerina (35 kDa), Ouro (31 kDa), Vermelho (42 kDa), Carmesim (40 kDa), BHMP, BHDMP, Br-Oregon, Lucifer Yellow, família de corante Alexa, N-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino] caproil] (NBD), BODIPY, difluoreto de boro dipirrometeno, 1,3-dicloro-7- hidroxil-9,9-dimetil-2 (9H)-acridinona (DDAO), dimetilacridinona (DAO), Oregon verde, Mitotracker Red, ficoeritrina, Ficobiliproteínas BPE (240 kDa) RPE (240 kDa) CPC (264 kDa) APC (104 kDa), Spectrum Blue, Spectrum Aqua, Spectrum Green, Spectrum

Gold, Spectrum Orange, Spectrum Red, Corantes Infra-Vermelho (IR), GPD-ribose cíclica (cGDPR), Calcofluor White, Lissamina, umbeliferona, tirosina ou triptofano. Em algumas formas de realização, o fluoróforo pode ser de corantes cianina, rodamina, cumarinas e pirélio. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um corante de cianina. Em outras formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um ou mais de um corante Cy2, um corante Cy3, um corante Cy5 ou um corante Cy7. Em formas de realização alternativas, o gerador de sinal pode ser BODIPY, rodamina, 1,3-dicloro-7-hidroxi-9,9-dimetil-2(9H)-acridinona (DDAO) ou 7-hidroxi-9,9-dimetil-2(9H)-acridinona (DAO).

[000144] Em algumas formas de realização, o gerador de sinal pode ser parte de um par de FRET. Par de FRET inclui dois fluoróforos, que são capazes de sofrer FRET para produzir ou eliminar um sinal detectável quando posicionados na proximidade um do outro. Alguns exemplos de doadores podem incluir Alexa 488, Alexa 546, BODIPY 493, Oyster 556, Fluor (FAM), Cy3 ou TTR (Tamra). Alguns exemplos de aceptores podem incluir Cy5, Alexa 594, Alexa 647 ou Oyster 656.

[000145] Conforme descrito acima, uma ou mais das moléculas acima mencionadas podem ser utilizadas como um gerador de sinal. Em algumas formas de realização, um ou mais dos geradores de sinal podem ser passíveis de sinalizar destruição e o gerador de sinal pode essencialmente incluir uma molécula capaz de ser branqueada por branqueamento químico fotoativado. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode incluir um fluoróforo capaz de ser quimicamente modificado em uma fotorreação que também envolve um reagente de transferência de elétrons e irradiação. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir cianina, BODIPY, rodamina, ou acridinona (por exemplo, DDAO e DAO), que pode ser modificado por uma fotorreação que também envolve a

adição de um reagente de transferência de elétrons e irradiação. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode incluir um ou mais de um corante Cy2, um corante Cy3, um corante Cy5 ou um corante Cy7 que podem ser branqueados por branqueamento químico fotoativado.

Enzima e Substratos Enzimáticos

[000146] Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir um ligante acoplado a uma enzima. Em algumas formas de realização, uma enzima adequada catalisa uma reação química do substrato para formar um produto da reação que se pode ligar a um receptor (por exemplo, os grupos fenólicos) presente na amostra. Um receptor pode ser exógeno (isto é, um receptor aderido extrinsecamente na amostra ou no suporte sólido) ou endógeno (receptores presentes intrinsecamente na amostra ou no suporte sólido). A amplificação do sinal pode ser efetuada como uma única enzima pode catalisar uma reação química do substrato para ligar covalentemente vários geradores de sinal perto do alvo.

[000147] Em algumas formas de realização, uma enzima adequada pode também ser capaz de ser inativada, no decurso de uma fotorreação. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidases, oxidases, fosfatases, esterases e glicosidases. Os exemplos específicos de enzimas adequadas incluem rábano peroxidase, fosfatase alcalina, β -D-galactosidase, lipase e glucose oxidase. Em algumas formas de realização, a enzima é uma peroxidase selecionada de rábano peroxidase, citocromo C peroxidase, glutathione peroxidase, microperoxidase, mieloperoxidase, lactoperoxidase e peroxidase de soja.

[000148] Em algumas formas de realização, uma enzima não é inativada no decurso de um fotorreação, mas é inativada em uma etapa de inativação separada realizada antes ou depois da fotorreação estar concluída. A etapa de inativação pode incluir a aplicação de um reagente de inativação da enzima para as amostras, incluindo a enzima.

[000149] Em algumas formas de realização, um ligante e uma enzima

podem ser incorporados em uma única entidade, por exemplo, uma molécula de proteína capaz de se ligar a um alvo e também catalisar uma reação química do substrato. Em outras formas de realização, um ligante e uma enzima podem ser incorporados em entidades separadas e podem ser acoplados através de formação de ligação covalente ou por meio de pares conjugados de ligando-receptor (por exemplo, biotina, estreptavidina).

[000150] Um substrato de enzima pode ser selecionado dependendo da enzima utilizada e do alvo disponível para a ligação na amostra. Por exemplo, em formas de realização incluindo HRP como uma enzima, um substrato pode incluir um fenol substituído (por exemplo, tiramina). A reação de HRP à tiramina pode produzir um substrato fenólico ativado que se pode ligar a receptores endógenos como porções ricas em elétrons (tais como tirosina ou triptofano) ou grupos fenólicos presentes nas proteínas de superfície de uma amostra biológica. Em formas de realização alternativas, em que o cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) pode ser utilizado como substrato juntamente com uma enzima de HRP, os receptores exógenos como p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) podem ser aderidos ao suporte sólido ou na amostra biológica antes de reagir com o substrato.

[000151] Em algumas formas de realização, um substrato da enzima pode ser desfosforilado após a reação com a enzima. O produto da reação desfosforilado pode ser capaz de se ligar a receptores endógenos ou exógenos (por exemplo, anticorpos) na amostra ou no suporte sólido. Por exemplo, uma enzima pode incluir fosfatase alcalina (AP) e um substrato pode incluir NADP, fosfatos substituídos (por exemplo, fosfato de nitrofenila) ou biotina fosforilada. Os receptores podem incluir proteínas de ligação NAD, anticorpos para o produto de reação desfosforilado (por exemplo, anti nitro-fenol), avidina ou estreptavidina em conformidade. Em algumas formas de realização, um substrato pode produzir o produto insolúvel mediante ação da enzima que pode se depositar na proximidade do local onde é gerado.

Exemplos não limitativos de tais substratos podem incluir diaminobenzidina (DAB) para HRP e ELF para AP.

[000152] Em algumas formas de realização, uma enzima pode incluir β -galactosidase e um substrato pode incluir β -galactopiranosil-glicosídeo de fluoresceína ou de cumarina. Os receptores podem incluir anticorpos para unidades desglicosiladas (por exemplo, anti-fluoresceína ou anti-cumarina). Em algumas formas de realização, várias combinações de enzimas como HRP/AP podem ser utilizadas como uma enzima. Um substrato pode incluir fosforilados substituídos por exemplo, fenol, fosfato de tirosina, que pode ser desfosforilado pela AP antes de reagir com a HRP para formar um produto de reação capazes de se ligarem a grupos fenólicos ou de elétrons ricos em receptores de grupos funcionais base.

[000153] Um produto de reação do substrato da enzima pode ser ainda capaz de proporcionar um sinal detectável. Em algumas formas de realização, os substratos de enzimas utilizadas nos métodos aqui divulgados podem incluir substratos não cromogênicos ou não quimioluminescentes, isto é uma reação da enzima e do substrato de enzima não pode produzir ela própria um sinal detectável. Substratos de enzima utilizados nos métodos aqui divulgados podem incluir um gerador de sinal extrínseco (por exemplo, um fluoróforo) como um marcador. O gerador de sinal e o substrato da enzima podem ser ligados diretamente (por exemplo, um substrato de enzima, com um marcador fluorescente) ou indiretamente (por exemplo, através de um par de receptor-ligando conjugado). Em algumas formas de realização, um substrato pode incluir grupos funcionais protegidos (por exemplo, grupos sulfidríla). Após a ligação do substrato ativado aos receptores, o grupo funcional pode ser desprotegido e conjugação de um gerador de sinal efetuada usando um gerador de sinal que tem um grupo tiol reativo (por exemplo, maleimida ou iodoacetila).

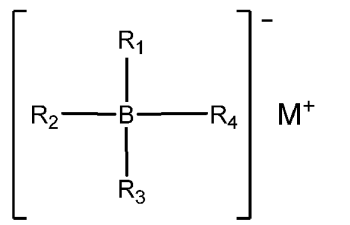
[000154] Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir

rábano peroxidase e o substrato é selecionado a partir de fenóis substituídos (por exemplo, tiramina). Em algumas formas de realização, a rábano peroxidase faz com que o substrato fenólico ativado se ligar covalentemente a grupos fenólicos presentes na amostra. Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir um ligante acoplado a HRP e um substrato pode incluir um fluoróforo acoplado a tiramina.

Reagentes de Transferência de Elétrons e Fotorreação

[000155] Um reagente de transferência de elétrons pode incluir um ou mais produtos químicos que podem se envolver em uma fotorreação com uma molécula capaz de se submeter à fotoexcitação. A molécula capaz de se submeter à fotoexcitação pode ser um gerador de sinal. Um reagente de transferência de elétrons pode ser contactado com a amostra na forma de um sólido, uma solução, um gel ou uma suspensão.

[000156] Em algumas formas de realização, um reagente de transferência de elétrons pode incluir um sal de borato. Em algumas formas de realização, o sal de borato é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

cada um de R_1 ; R_2 e R_3 é, de forma independente, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma arila ou uma heteroarila, em que a referida alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C_1 - C_4) alquila, (C_1 - C_4) alcoxi, (C_1 - C_4) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro,

R_4 é uma alquila, uma alquenila, ou uma alquinila, em que a referida alquila, alquenila ou alquinila é opcionalmente substituída com um

ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro, e

M⁺ é selecionado dentre o grupo consistindo de cátions orgânicos e inorgânicos.

[000157] Em algumas formas de realização, M⁺ é selecionado a partir do grupo de cátions inorgânicos, por exemplo, Li⁺, Na⁺, ou K⁺. Em outras formas de realização, M⁺ é selecionado a partir do grupo de cátions orgânicos. Exemplos não limitativos de cátions orgânicos podem incluir NR₄⁺, em que cada R é independentemente hidrogênio, um grupo alquila substituída ou não substituída (por exemplo, um grupo hidroxialquila, um grupo aminoalquila ou grupo alquilamônio) ou grupo de arila substituída ou não substituída (por exemplo, fenila, naftila, e antracila, imidazolila, tienila, furanila, piridila, pirimidila, piranila, pirazolila, pirrolila, pirazinila, tiazol, oxazolila, e tetrazol).

[000158] Em algumas formas de realização, cada um de R₁; R₂ e R₃ é arila. Em algumas formas de realização, a arila é fenila. Em algumas formas de realização, a fenila é uma fenila não substituída.

[000159] Em algumas formas de realização, R₄ é um grupo alquila opcionalmente substituída. Em algumas formas de realização, R₄ é butila não substituída.

[000160] Em algumas formas de realização, cada um de R₁; R₂ e R₃ é um grupo arila opcionalmente substituída e R₄ é um grupo alquila opcionalmente substituída. Em uma outra forma de realização, cada um de R₁; R₂, e R₃ é fenila não substituída e R₄ é butila não substituída, e o sal de borato é sal de borato de trifenilbutila.

[000161] Em algumas formas de realização, M⁺ é um cátion inorgânico. Em algumas formas de realização, o cátion inorgânico é Li⁺, Na⁺ ou K⁺. Em uma forma de realização, M⁺ é Li⁺.

[000162] Os outros reagentes de transferência de elétrons adequados podem incluir sulfinatos, enolatos, carboxilatos (por exemplo, ácido ascórbico), compostos organometálicos e aminas (por exemplo, trietanolamina, e N-fenil-glicina). Estes e outros reagentes de transferência de elétrons foram anteriormente descritos (ver, por exemplo, *Macromolecules* 1974, 7, 179-187, *Photogr Eng. Sci.* 1979, 23, 150-154;. *Topics in Current Chemistry*, Mattay, J., ed. ; Springer-Verlag: Berlim, 1990, Vol. 156, pp 199-225, e *Pure Appl Chem* 1984, 56, 1191-1202).

[000163] Um reagente de transferência de elétrons a ser utilizado para o branqueamento químico fotoativado é escolhido de modo a que a fotorreação entre o reagente de transferência de elétrons e um gerador de sinal seja energeticamente favorável. Em algumas formas de realização, o reagente de transferência de elétrons e o gerador de sinal fotoexcitado formam um par de elétrons doador/receptor, em que uma transferência de elétrons do reagente de transferência de elétrons para o gerador de sinais é energeticamente favorável. A transferência de elétrons pode ainda levar à modificação química do gerador de sinal, resultando no branqueamento do gerador de sinal. Exemplos de reagentes de transferência de elétrons e geradores de sinais que podem formar pares de elétrons doador/receptor incluem boratos de triaril alquila, tais como borato de trifenil butila como um reagente de transferência de elétrons e corantes cianina (por exemplo, Cy3 e Cy5), BODIPY, rodamina ou corantes de acridona como geradores de sinal.

[000164] Um ou mais dos reagentes de transferência de elétrons acima mencionados podem ser utilizados nos métodos aqui divulgados, dependendo da susceptibilidade do gerador de sinal, da enzima, do ligante, do alvo ou da amostra biológica, da fotoexcitação e/ou fotorreação posterior com o reagente de transferência de elétrons. Em algumas formas de realização, a fotoexcitação do gerador de sinal por meio de irradiação e fotorreação subsequente entre o reagente de transferência de elétrons e o gerador de sinal

fotoexcitado essencialmente não afeta a integridade do ligante, do alvo e da amostra biológica. Em algumas formas de realização, a fotoexcitação do gerador de sinal por meio de irradiação e fotorreação subsequente não afeta a especificidade de ligação entre o ligante e o alvo.

[000165] Em algumas formas de realização, em que dois ou mais (até cinco) geradores de sinal podem ser utilizados simultaneamente, uma fotorreação pode ser capaz de modificar seletivamente um ou mais geradores de sinal. Esta seletividade pode ser derivada a partir de fotoexcitação seletiva do gerador de sinal por meio de irradiação no comprimento de onda específico. O comprimento de onda de irradiação é escolhido de tal forma que um ou mais geradores de sinal podem ser fotoexcitados, enquanto o restante um ou mais geradores de sinal que podem estar presentes em uma amostra podem permanecer inalterados. Em algumas formas de realização, a irradiação limitada a uma faixa de comprimentos de onda entre 520 a 580 nm pode ser usada para fotoexcitação seletiva de um corante Cy3. Em outras formas de realização, a irradiação limitada a uma faixa de comprimentos de onda entre 620 a 680 nm pode ser usada para a fotoexcitação seletiva de um corante Cy5. Em formas de realização alternativas, a fotoexcitação seletiva pode ser conseguida pela utilização de um laser.

[000166] A propensão de geradores de sinais fotoexcitados a sofrer mais fotorreação pode depender da escolha do reagente de transferência de elétrons, tal como discutido acima, bem como das condições de reação, tais como temperatura, solvente e pH.

[000167] Em algumas formas de realização, o branqueamento químico fotoativado é realizado a uma temperatura de 4 a 50°C, mais de preferência, a uma temperatura de 20 a 30°C.

[000168] Em algumas formas de realização, o branqueamento químico fotoativado é efetuado em uma solução. Em algumas formas de realização, a solução é uma solução tamponada. Em uma outra forma de realização, a

solução tamponada é a solução tamponada em fosfato salino tamponado (PBS). Em algumas formas de realização, a solução é tamponada a um pH de 5 a 9. Em uma forma de realização preferida, o pH da solução é de 6 a 8.

Sequencialmente Analisar uma Amostra Biológica, Contactar e Ligar a Sonda

[000169] A amostra biológica pode ser posta em contato com uma sonda para ligar a sonda a um alvo na amostra biológica. Em algumas formas de realização, um alvo pode não ser facilmente acessível para a ligação com a sonda e uma amostra biológica pode ser ainda processada para facilitar a ligação entre o alvo e o ligante na sonda, por exemplo, através da recuperação de antígeno, digestão enzimática, recuperação de epítipo, ou bloqueio.

[000170] Em algumas formas de realização, uma sonda pode ser contactada com a amostra biológica, sob a forma de uma solução. Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir um ligante acoplado a um marcador (gerador de sinal ou uma enzima). O ligante e o marcador (gerador de sinal ou enzima) podem ser incorporados em uma única molécula e a solução de sonda pode ser aplicada em uma única etapa. Alternativamente, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou enzima) podem ser entidades distintas e a solução de sonda pode ser aplicada em uma única etapa ou em múltiplas etapas. Em todas as formas de realização, uma sonda de controle pode ainda estar ligada a um ou mais alvos presentes na amostra.

[000171] Em função da natureza do ligante, do alvo, e da ligação entre os dois, o tempo de contato suficiente pode ser permitido. Em algumas formas de realização, um excesso de moléculas de sonda (e, conseqüentemente moléculas ligantes) pode ser usado para assegurar que todos os alvos na amostra biológica estão vinculados. Depois de que um tempo suficiente tenha sido fornecido para a ação de ligação, a amostra pode ser contactada com uma solução de lavagem (por exemplo, em uma solução tampão apropriada) para lavar quaisquer sondas não ligadas. Dependendo da concentração e do tipo de sonda utilizadas, uma amostra biológica pode ser submetida a uma série de

etapas de lavagem, com as mesmas ou diferentes soluções de lavagem a ser utilizadas em cada etapa.

[000172] Em algumas formas de realização, a amostra biológica pode ser posta em contato com mais do que uma sonda na primeira etapa de ligação. A pluralidade de sondas pode ser capaz de ligar alvos diferentes na amostra biológica. Por exemplo, uma amostra biológica pode incluir dois alvos: alvo 1 e alvo 2 e dois conjuntos de sondas podem ser utilizadas neste exemplo: sonda 1 (tendo ligante 1 capaz de se ligar a alvo 1) e sonda 2 (tendo ligante 2 capaz de se ligar a alvo 2). A pluralidade de sondas pode também compreender uma pluralidade de múltiplos conjuntos de sondas de ligação ao alvo. Uma pluralidade de sondas pode ser contactado com a amostra biológica, ao mesmo tempo (por exemplo, como uma única mistura) ou sequencialmente (por exemplo, uma sonda 1 pode ser contactada com a amostra biológica, seguida por etapa de lavagem para remover qualquer sonda 1 não ligada, seguido por contato uma sonda 2 com a amostra biológica, e assim por diante).

[000173] O número de sondas que podem ser simultaneamente ligadas ao alvo pode depender do tipo de detecção utilizada, isto é, a resolução espectral resolúvel. Por exemplo, para geradores de sinal baseados em fluorescência, até cinco sondas diferentes (proporcionando até cinco sinais fluorescentes espectralmente resolúveis) podem ser usadas de acordo com os métodos divulgados. Espectralmente resolúveis, em referência a uma pluralidade de geradores de sinal fluorescentes, indica que as bandas de emissão fluorescente dos geradores de sinal são suficientemente distintas, isto é, suficientemente não sobrepostas, de tal modo que, ligantes aos quais os respectivos geradores de sinais estão ligados podem ser distinguidos sobre a base do sinal fluorescente gerado pelos respectivos geradores de sinal, utilizando sistemas de fotodetecção padrão. Em algumas formas de realização todas as sondas podem ser simultaneamente ligadas, mas sequencialmente

detectadas em conjuntos de 1 a 5 sondas por ciclo.

[000174] Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode estar, essencialmente, em contato com cinco ou menos de cinco sondas na primeira etapa de ligação. Em formas de realização que utilizam sondas baseadas em enzima, o número de sondas que podem ser simultaneamente ligadas ao alvo pode também depender do número de diferentes enzimas e seus substratos correspondentes disponíveis.

[000175] Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula inteira, uma amostra de tecido, ou a amostra biológica pode ser aderida a um microarranjo, um gel ou uma membrana. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma amostra de tecido. A amostra de tecido pode ser obtida por uma variedade de processos incluindo, mas não limitado a excisão cirúrgica, a aspiração ou a biópsia. O tecido pode ser fresco ou congelado. Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode ser fixada e embutida em parafina. A amostra de tecido pode ser fixada ou de outra forma conservada por metodologia convencional; a escolha de um fixador pode ser determinada pelo objetivo para o qual o tecido deve ser histologicamente corado ou analisado de outra forma. O comprimento de fixação pode depender do tamanho da amostra de tecido e do fixador utilizado. Por exemplo, formalina tamponada neutra, Bouin ou paraformaldeído, pode ser utilizado para fixar ou conservar uma amostra de tecido.

[000176] Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode ser primeira fixada e depois desidratada por meio de uma série ascendente de álcoois, infiltrada e embebida em parafina ou outros meios de seccionamento, de modo que a amostra de tecido pode ser seccionada. Em uma forma de realização alternativa, uma amostra de tecido pode ser seccionada e subsequentemente fixa. Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode ser incorporada e processada em parafina. Os exemplos de parafina que

podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados a, Paraplast, Broloid e Tissuemay. Uma vez que a amostra de tecido está embebida, a amostra pode ser seccionada por um micrótomo em seções que podem ter uma espessura em uma gama de cerca de três micrômetros a cerca de cinco micrômetros. Uma vez seccionada, as seções podem ser ligadas às corrediças utilizando adesivos. Exemplos de adesivos de deslizamento podem incluir, mas não estão limitados a, silano, gelatina, poli-L-lisina. Em formas de realização, se a parafina é utilizada como o material de embebedimento, as seções de tecido podem ser desparafinizadas e re-hidratadas em água. As seções de tecido podem ser desparafinizadas, por exemplo, pelo uso de agentes orgânicos (tais como, xilenos ou série gradualmente descendente de álcoois).

[000177] Em algumas formas de realização, além dos procedimentos de preparação da amostra discutidos acima, a seção de tecido pode ser submetida a tratamento adicional antes, durante, ou após a imuno-histoquímica. Por exemplo, em algumas formas de realização, a seção de tecido pode ser submetida a métodos de recuperação de epítipo, como por exemplo, o aquecimento da amostra de tecido em tampão de citrato ou de tampão Tris ou ambos de um modo sequencial. Em algumas formas de realização, uma seção de tecido pode ser opcionalmente submetida a uma etapa de bloqueio para minimizar qualquer ligação não específica.

[000178] Em algumas formas de realização, a amostra biológica ou uma porção da amostra biológica, ou alvos presentes na amostra biológica, pode ser aderida à superfície, por exemplo, microarranjos de DNA, ou microarranjos de proteínas, ou na superfície de suportes sólidos (tais como géis, blots, lâminas de vidro, contas, ou placas de ELISA). Em algumas formas de realização, os alvos presentes na amostra biológica podem ser aderidos à superfície do suporte sólido. Os alvos da amostra biológica podem ser colados sobre o suporte sólido por formação de uma ligação física, por formação de uma ligação covalente, ou ambas.

[000179] Em algumas formas de realização, os alvos presentes na amostra biológica podem ser aderidos às membranas e sondados sequencialmente utilizando os métodos aqui revelados. Em algumas formas de realização, os alvos presentes na amostra biológica, podem ser processados antes de contactar a amostra com a membrana. Por exemplo, formas de realização envolvendo métodos para sondar alvos proteicos em uma amostra de tecido podem incluir a etapa de extrair as proteínas do alvo a partir de uma amostra biológica de homogenato de tecido ou um extrato. Tecidos sólidos ou células inteiras podem ser fragmentados em primeiro lugar mecanicamente utilizando um liquidificador (para maiores volumes de amostra), utilizando um homogeneizador (volumes menores) ou por ultra-sons. Compartimentos celulares diferentes e organelas podem ser separados utilizando técnicas de filtração e centrifugação. Detergentes, sais e tampões podem também ser utilizados para estimular a lise das células e solubilizar proteínas. Do mesmo modo, as formas de realização que envolvem métodos de sondagem de ácidos nucleicos pode incluir a etapa de preparação de fragmentos de DNA ou RNA, por exemplo, utilizando endonucleases de restrição (para DNA).

[000180] Em algumas formas de realização, os alvos extraídos da amostra biológica podem ser ainda separados por eletroforese em gel. Separação dos alvos pode ser por ponto isoelétrico (pI), peso molecular, carga elétrica, ou uma combinação destes fatores. A natureza de separação pode depender do tratamento da amostra e da natureza do gel. Um gel adequado pode ser selecionado a partir de um gel de poliacrilamida, um gel de SDS-poliacrilamida ou um gel de agarose.

[000181] Uma membrana adequada pode ser selecionada de tal modo que a membrana tem as propriedades de ligação alvo não-específicas. Em algumas formas de realização, uma membrana adequada pode ser selecionada a partir de uma membrana de fluoreto de polivinilideno, uma membrana de nitrocelulose, ou uma membrana de nylon. Em algumas formas de realização,

uma membrana adequada pode ser selecionada de tal modo que a membrana possa ser substancialmente estável para múltiplas sondagens. Em formas de realização envolvendo sondagem de alvos utilizando sondas proteicas, as membranas podem ser bloqueadas utilizando uma solução de bloqueio para prevenir a ligação não específica de sondas de proteína para as membranas. Em formas de realização envolvendo sondagem de fragmentos de DNA, o gel de DNA pode ser tratado com uma solução de ácido clorídrico diluído ou uma solução alcalina para facilitar a transferência mais eficiente de DNA do gel para a membrana.

[000182] Em algumas formas de realização, a membrana pode ser submetida a temperaturas em uma faixa de cerca de 60°C. a cerca de 100°C para ligar covalentemente os alvos para a membrana, por exemplo, alvos de DNA a uma membrana de nitrocelulose. Em algumas formas de realização, a membrana pode ser exposta à radiação ultravioleta para ligar covalentemente os alvos para a membrana, por exemplo, alvos de DNA a uma membrana de nylon. Em algumas formas de realização, os alvos na amostra biológica não podem ser separados por eletroforese antes de blotting sobre uma membrana e podem ser sondados diretamente em uma membrana, por exemplo, nas técnicas de dot blot.

[000183] A seguir à preparação da amostra de tecido ou da membrana, uma solução de sonda (por exemplo, a solução de anticorpo marcado) pode ser contactada com a seção de tecido ou a membrana durante um período de tempo suficiente e sob condições adequadas para a ligação do ligante ao alvo (por exemplo, antígeno). Conforme descrito anteriormente, podem ser utilizados dois métodos de detecção: direto ou indireto. Em uma detecção direta, um sinal marcado com gerador de anticorpo primário (por exemplo, o anticorpo primário marcado com fluoróforo ou o anticorpo primário marcado com enzima) pode ser incubado com um antígeno na amostra de tecido ou a membrana, o que pode ser visualizado sem interação adicional de anticorpo.

Em uma detecção indireta, um anticorpo primário não conjugado pode ser incubado com um antígeno e, em seguida, um anticorpo secundário marcado, pode se ligar ao anticorpo primário. A amplificação de sinal pode ocorrer conforme vários anticorpos secundários podem reagir com diferentes epitopos no anticorpo primário. Em algumas formas de realização, dois ou mais (no máximo de cinco) anticorpos primários (a partir de espécies diferentes, marcados ou não marcados) podem ser contactados com a amostra de tecido. Os anticorpos não marcados podem ser em seguida, postos em contato com os anticorpos secundários marcados correspondentes. Em formas de realização alternativas, pode ser utilizado um anticorpo primário e pares de ligando-receptor de ligação específica (tais como biotina-streptavidina). O anticorpo primário pode ser ligado a um elemento do par (por exemplo, biotina) e o outro elemento (por exemplo, estreptavidina) pode ser marcado com um gerador de sinal ou uma enzima. O anticorpo secundário, avidina, estreptavidina, ou biotina, pode ser cada um independentemente marcado com um gerador de sinal ou uma enzima.

[000184] Em formas de realização em que o anticorpo primário, ou o anticorpo secundário pode ser conjugado com um marcador enzimático, um substrato acoplado ao gerador de sinal fluorescente pode ser adicionado para proporcionar a visualização do antígeno. Em algumas formas de realização, o substrato e o gerador de sinal fluorescente podem ser incorporados em uma única molécula e podem ser aplicados em uma única etapa. Em outras formas de realização, o substrato e o gerador de sinal fluorescente podem ser entidades distintas e podem ser aplicados em uma única etapa ou em várias etapas.

[000185] Uma enzima acoplada ao ligante pode reagir com o substrato para catalisar uma reação química do substrato para ligar covalentemente o substrato acoplado ao gerador de sinal fluorescente com a amostra biológica. Em algumas formas de realização, uma enzima pode incluir rábano

peroxidase e o substrato pode incluir tiramina. A reação de rábano silvestre peroxidase (HRP) com o substrato de tiramina pode fazer com que o substrato de tiramina se ligue covalentemente a grupos fenólicos presentes na amostra. Em formas de realização que utilizam conjugados de enzima-substrato, a amplificação de sinal pode ser obtida conforme uma enzima pode catalisar múltiplas moléculas de substrato. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para detectar alvos de baixa abundância utilizando métodos de detecção indireta (por exemplo, utilizando anticorpos primário-secundário), usando métodos de amplificação de sinal de HRP-tiramida, ou uma combinação de ambos (por exemplo, métodos de amplificação de sinal de HRP-tiramida indireta). A incorporação de técnicas de amplificação de sinal para os métodos aqui divulgados e correspondentemente o tipo de técnicas de amplificação de sinal incorporadas pode depender da sensibilidade requerida para um alvo particular e do número de etapas envolvidos no protocolo.

Observação de Um Sinal a Partir da Sonda ou a Partir do Primeiro Conjunto da Pluralidade de Sondas

[000186] Um sinal a partir do gerador de sinal pode ser detectado utilizando um sistema de detecção. A natureza do sistema de detecção utilizado pode depender da natureza dos geradores de sinal utilizados. O sistema de detecção pode incluir um dispositivo de carga acoplada (CCD) do sistema de detecção, um sistema de detecção de fluorescência, um sistema de detecção elétrico, um sistema de detecção de filme fotográfico, um sistema de detecção quimioluminescente, um sistema de detecção de enzimas, um sistema de detecção óptico, um sistema de detecção perto de campo, ou um sistema de detecção de reflexão interna total (TIR).

[000187] Uma ou mais das técnicas acima mencionadas podem ser utilizadas para observar uma ou mais características de um sinal a partir de um gerador de sinal (acoplado com um ligante ou acoplado com um substrato

da enzima). Em algumas formas de realização, a intensidade do sinal, comprimento de onda do sinal, a localização do sinal, a frequência do sinal, ou deslocamento do sinal podem ser determinados utilizando uma ou mais das técnicas supracitadas. Em algumas formas de realização, uma ou mais características do sinal acima mencionadas podem ser observadas, medidas e registradas.

[000188] Em algumas formas de realização, o sinal observado é um sinal fluorescente, e uma sonda ligada a um alvo em uma amostra biológica pode incluir um gerador de sinal que é um fluoróforo. Em algumas formas de realização, o sinal de fluorescência pode ser medido por determinação do comprimento de onda de fluorescência ou intensidade de fluorescência utilizando um sistema de detecção de fluorescência. Em algumas formas de realização, um sinal pode ser observado *in situ*, isto é, um sinal pode ser observado diretamente a partir do gerador de sinal associado, através do ligante ao alvo na amostra biológica. Em algumas formas de realização, um sinal a partir do gerador de sinal pode ser analisado na amostra biológica, obviando a necessidade de sistemas de detecção separados baseados em arranjo.

[000189] Em algumas formas de realização, a observação de um sinal pode incluir a captura de uma imagem da amostra biológica. Em algumas formas de realização, um microscópio ligado a um dispositivo de imagem pode ser usado como um sistema de detecção, em conformidade com os métodos aqui revelados. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal (tal como, fluoróforo) pode ser excitado e o sinal (tal como, o sinal de fluorescência) obtido pode ser observado e registrado sob a forma de um sinal digital (por exemplo, uma imagem digitalizada). O mesmo procedimento pode ser repetido para diferentes geradores de sinal (se presentes) que estão ligados na amostra, utilizando os filtros de fluorescência adequados.

[000190] Em algumas formas de realização, vários tipos diferentes de

sinais podem ser observados na mesma amostra. Por exemplo, um alvo pode ser detectado com uma sonda fluorescente e um segundo alvo na mesma amostra pode ser detectado com uma sonda cromogênica.

Aplicação de Um Reagente de Transferência de Elétrons e Irradiação Para Iniciar Uma Fotorreação Para Modificar o Sinal

[000191] Para modificar o sinal, um reagente de transferência de elétrons pode ser aplicado à amostra, e a amostra pode ser subsequentemente irradiado para iniciar uma fotorreação. Em algumas formas de realização, a modificação de sinal pode incluir uma alteração de uma ou mais características de sinal, por exemplo, uma diminuição na intensidade do sinal, um deslocamento no pico do sinal, ou uma mudança na frequência de ressonância. Em algumas formas de realização, uma fotorreação pode modificar o sinal por inativação substancial, isto é, o branqueamento, o gerador de sinal fluorescente e a enzima (se utilizada).

[000192] Em algumas formas de realização, um reagente de transferência de elétrons pode ser na forma de uma solução. Em uma forma de realização, o reagente de transferência de elétrons está presente sob a forma de uma solução aquosa tamponada. Em algumas formas de realização, o reagente de transferência de elétrons pode ser um sal de borato. Em outras formas de realização, o reagente de transferência de elétrons pode ser um sal de lítio de um borato de trifenilbutila presente a uma concentração de 0,001 mM a 1000 mM. Em uma forma de realização preferida, a concentração de borato de trifenilbutila é de 20 mM até 100 mM. Em algumas formas de realização, a concentração do reagente de transferência de elétrons, por exemplo, sal de borato, pode representar de 1 a 60 equivalentes da concentração do gerador de sinais, por exemplo, corante fluorescente.

[000193] A irradiação da amostra em contato com o reagente de transferência de elétrons pode ser realizada por um período de tempo predeterminado. A duração da irradiação pode depender da duração desejada

da fotorreação entre o reagente de transferência de elétrons e o gerador de sinal fotoexcitado. Em algumas formas de realização, a etapa de irradiação pode ser efetuada durante cerca de 20 segundos a cerca de 60 minutos, de preferência durante cerca de 20 segundos a cerca de 15 minutos, e ainda mais de preferência, durante cerca de 20 segundos a cerca de 5 minutos. Em algumas formas de realização, a etapa de irradiação pode ser efetuada até que nenhum sinal residual é observado a partir do gerador de sinal. Em algumas formas de realização, a etapa de irradiação pode ser efetuada à temperatura ambiente.

[000194] Em algumas formas de realização, a fotorreação é realizada a uma temperatura de 4 a 50°C, mais de preferência, a uma temperatura de 20 a 30°C.

[000195] Em algumas formas de realização, a fotorreação é efetuada em uma solução. Em algumas formas de realização, a solução é uma solução tamponada. Em uma outra forma de realização, a solução tamponada é a solução tamponada em fosfato salino tamponado (PBS). Em algumas formas de realização, a solução é tamponada a um pH de 5 a 9. Em uma forma de realização preferida, o pH da solução é de 6 a 8.

[000196] Em algumas formas de realização, as condições de uma fotorreação (por exemplo, comprimento de onda de irradiação) podem ser selecionadas de tal modo que o ligante, o alvo, a amostra biológica, e a ligação entre o ligante e o alvo não podem ser afetados pela fotorreação. Em algumas formas de realização, a fotorreação pode afetar apenas o gerador de sinal e a enzima (se utilizada) e o reagente de transferência de elétrons, e não pode afetar a ligação de alvo/ligante ou a integridade do ligante. Assim, a título de exemplo, um ligante pode incluir um anticorpo primário ou uma combinação de anticorpo primário/secundário. A fotorreação de acordo com os métodos aqui descritos pode afetar apenas o gerador de sinal, e o anticorpo primário ou a combinação de anticorpo primário/anticorpo secundário pode

permanecer essencialmente inalterada. Em algumas formas de realização, um ligante (tais como, um anticorpo primário ou a combinação de anticorpo primário/anticorpo secundário) pode permanecer ligado ao alvo na amostra biológica, após o contato da amostra com o reagente de transferência de elétrons e a subsequente irradiação para iniciar uma fotorreação.

[000197] Em algumas formas de realização, uma característica do sinal pode ser observada, depois da fotorreação para determinar a eficácia da modificação de sinal. Por exemplo, uma cor pode ser observada antes da fotorreação e a cor pode estar ausente após a fotorreação. Em outro exemplo, a intensidade de fluorescência a partir de um gerador de sinal fluorescente pode ser observada antes da fotorreação e após a fotorreação. Em algumas formas de realização, uma queda na intensidade do sinal por uma quantidade predeterminada pode ser referida como modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, ou branqueamento. Em algumas formas de realização, a modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, pode se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade em uma faixa maior do que cerca de 50 por cento. Em algumas formas de realização, a modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, pode se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade em uma faixa maior do que cerca de 60 por cento. Em algumas formas de realização, a modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, pode se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade em uma faixa maior do que cerca de 80 por cento. Em algumas formas de realização, a modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, pode se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade em uma faixa maior do que cerca de 90 por cento. Em algumas formas de realização, a modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, pode se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade em uma faixa maior do que cerca de 95 por cento. Em algumas formas de

realização, a modificação do sinal, ou branqueamento químico fotoativado, pode se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade em uma faixa de cerca de 100 por cento, ou para completar o branqueamento.

Contato da Amostra Com Uma Sonda Subsequente e Ligação a Um Alvo Subsequente

[000198] A amostra biológica ou a amostra pode ser posta em contato com uma sonda subsequente utilizando um ou mais processos aqui descritos acima para a primeira sonda. A sonda subsequente pode ser capaz de se ligar ao alvo diferente do alvo ligado nas etapas anteriores. Em formas de realização em que uma pluralidade de sondas pode ser contactada com a amostra biológica nas etapas de contato da sonda anterior, a sonda subsequente pode ser capaz de ligar um alvo diferente dos alvos ligados pelo conjunto da sonda anterior. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode ser posta em contato com uma pluralidade de sondas na etapa subsequente de contato da sonda. Em algumas formas de realização, em que uma pluralidade de múltiplos conjuntos de sondas foi aplicada a uma amostra biológica na primeira etapa, um conjunto subsequente de sinais a partir do conjunto subsequente de sondas pode ser gerado. A geração do segundo conjunto de sinais pode compreender associar o segundo conjunto de sondas com uma porção separada que compreende gerador de sinal. Por exemplo, o segundo conjunto de sondas pode compreender uma etiqueta de biotina, e a unidade que compreende gerador de sinal pode também compreender estreptavidina capaz de se ligar a etiqueta de biotina. Alternativamente, a geração do segundo conjunto de sinais pode compreender desmascarar a unidade geradora de sinal, por exemplo, pela modificação da distância entre o par de fluoróforo-resfriador brusco. Em algumas formas de realização, a geração do segundo conjunto de sinais pode ser feita por hibridação de sondas marcadas complementares de sequências em anexo com o segundo conjunto de sondas.

[000199] Em formas de realização em que ligantes acoplados a enzimas podem ser utilizados como sondas, as etapas de ligação podem ainda incluir as etapas de reação que envolvem a reação da enzima com um substrato enzimático acoplado ao gerador de sinal fluorescente.

[000200] Em algumas formas de realização, o gerador de sinal (por exemplo, um gerador de sinal fluorescente) utilizado nas diferentes etapas de ligação pode ser o mesmo, isto é, detectável no mesmo canal de detecção. Métodos que utilizam o mesmo gerador de sinal em diferentes etapas de ligação podem permitir a detecção de múltiplos alvos, quando o número limitado de canais de detecção está disponível. Em algumas formas de realização, em que um conjunto de sondas (2 a 5 sondas) pode ser utilizado na primeira etapa de ligação, as sondas subsequentes podem incluir os mesmos geradores de sinal que nas etapas anteriores de ligação. Por exemplo, uma primeira etapa de ligação pode incluir ligantes conjugados de Cy3, Cy5 e Cy7 diferentes. Em algumas formas de realização, as etapas de ligação subsequentes podem também incluir o mesmo conjunto de corantes, isto é, Cy3, Cy5 e Cy7.

[000201] Em algumas formas de realização, o gerador de sinal (por exemplo, um gerador de sinal fluorescente) utilizado nas diferentes etapas de ligação pode ser diferente, isto é, de forma independente detectável em diferentes canais de detecção. Por exemplo, em algumas formas de realização, uma primeira sonda pode incluir um corante Cy3, que tem um comprimento de onda de emissão de fluorescência na região do verde e uma sonda subsequente pode incluir um corante Cy7, que tem um comprimento de onda de emissão de fluorescência na região do infravermelho próximo.

[000202] Em formas de realização que utilizam enzimas acopladas com ligante como sondas, as enzimas e os substratos utilizados nos diferentes etapas de ligação e de reação podem ser os mesmos. Uma enzima pode ser inativada anteriormente no decurso de uma fotorreação ou em uma etapa de

inativação separada antes de ligação da amostra a uma enzima subsequente para prevenir a reação cruzada da enzima anterior com o substrato subsequente. Por exemplo, uma primeira etapa de reação e ligação pode incluir ligante acoplado a HRP e tiramina acoplada a um primeiro fluoróforo. A etapa de branqueamento químico fotoinduzido pode envolver as etapas de inativação substancial do fluoróforo e inativação substancial da HRP. Em algumas formas de realização, as etapas de branqueamento e de inativação química fotoinduzida podem ocorrer simultaneamente. Em algumas formas de realização, as etapas de branqueamento e de inativação química fotoinduzida podem ocorrer sequencialmente. Após as etapas de branqueamento químico fotoinduzido e de inativação, a amostra pode ser contactada com um agente de ligação posterior acoplado a HRP, que pode ser ainda feita reagir com tiramina acoplada a um segundo fluoróforo. Da mesma forma, as etapas de ligação e reação subsequentes podem ser afetadas usando várias iterações de HRP-tiramina como conjugados de substrato enzimático, cada etapa de ligação e reação seguido pela etapa de branqueamento químico fotoinduzido e inativação. O primeiro fluoróforo e os fluoróforos subsequentes podem ser iguais ou diferentes, dependendo do número de canais de detecção disponíveis para a detecção.

[000203] Em algumas formas de realização, a primeira etapa de ligação pode incluir um conjunto de sondas (por exemplo, de 2 a 5 sondas), cada sonda incluindo um ligante capaz de se ligar a um alvo diferente e cada enzima capaz de catalisar uma reação química de um diferente substrato. Por exemplo, em uma forma de realização, o primeiro conjunto de sonda pode incluir um ligante acoplado a HRP 1 e um ligante 2 acoplado a AP. A etapa de reação pode incluir o contato da amostra com o Cy3 e NADP acoplado a tiramina acoplada ao Cy7. Após a reação das enzimas com os seus substratos correspondentes e observando os sinais, os corantes de cianina podem ser inativados por branqueamento químico fotoinduzido e as enzimas inativadas

no decurso de uma fotorreação ou por adição de um agente de inativação adequado. As etapas de sondagem subsequentes podem incluir o mesmo conjunto de pares de ligante-enzima e substrato-fluoróforo ou conjunto diferente de pares de ligante-enzima e substrato-fluoróforo. A pluralidade de sondas e o substrato-gerador de sinal pode ser contactado com a amostra biológica simultaneamente (por exemplo, como uma única mistura) ou sequencialmente (por exemplo, uma sonda 1 pode ser posta em contato com a amostra biológica, seguida por etapa de lavagem para remover qualquer sonda 1 não ligada, seguido por contato de uma sonda 2 com a amostra biológica, e assim por diante).

Observação de Um Sinal Subsequente de Uma Sonda Subsequente

[000204] Um ou mais dos métodos de detecção acima descritos podem ser utilizados para observar uma ou mais características de um sinal subsequente (por exemplo, segundo, terceiro, etc) a partir de um gerador de sinal subsequente (presente na sonda subsequente). Em algumas formas de realização, a intensidade do sinal, o comprimento de onda do sinal, a localização do sinal, a frequência do sinal, ou o deslocamento do sinal podem ser determinados utilizando uma ou mais das técnicas supracitadas. Semelhante ao primeiro sinal, um sinal subsequente (por exemplo, um sinal de fluorescência) obtido pode ser registrado na forma de um sinal digital (por exemplo, uma imagem digitalizada). Em algumas formas de realização, a observação de um sinal subsequente pode também incluir a captura de uma imagem óptica da amostra biológica.

Reiteração das Etapas de Contato, Ligação e Observação

[000205] Em algumas formas de realização, após o contato da amostra com uma sonda subsequente (por exemplo, segunda, terceira, etc), o branqueamento do gerador de sinal de uma fotorreação, e subsequente administração de sonda/geração de sinal a partir de sondas já ligadas pode ser repetida múltiplas vezes. Em algumas formas de realização, depois de se

observar um segundo sinal a partir da segunda sonda, a amostra biológica pode ser posta em contato com um reagente de transferência de elétrons e irradiada para modificar o sinal da segunda sonda. Além disso, uma terceira sonda pode ser contactada com a amostra biológica, em que a terceira sonda pode ser capaz de ligar um alvo diferente das primeira e segunda sondas. Do mesmo modo, um sinal da terceira sonda pode ser observado, seguido de aplicação do reagente de transferência de elétrons e radiação para modificar o sinal. As etapas de ligação, observação, e de branqueamento podem ser repetidas várias vezes de forma iterativa utilizando uma enésima sonda capaz de se ligar a alvos adicionais para fornecer ao usuário informações sobre uma variedade de alvos, usando uma variedade de sondas e/ou geradores de sinais. Em formas de realização onde ligantes acoplados a enzimas podem ser utilizados como sondas, as etapas de ligação pode ainda incluir as etapas de reação que envolvem a reação da enzima com um substrato enzimático acoplado ao gerador de sinal fluorescente.

[000206] Em algumas formas de realização, as etapas de branqueamento, de ligação, de reação (se aplicável), e de observação podem ser repetidas uma ou mais vezes. Em algumas formas de realização, as etapas de branqueamento, de ligação, de reação (se aplicável), e de observação podem ser repetidas pelo menos 5, pelo menos 15, pelo menos 30, pelo menos 60 vezes, pelo menos 100 vezes, ou pelo menos 150 vezes. Em algumas formas de realização, a série de etapas pode ser repetida de 25 a 30 vezes. Em outras formas de realização, a série de etapas pode ser repetida de 2 a 10 vezes.

[000207] Em algumas formas de realização, uma série de sondas pode ser contactada com a amostra biológica de um modo sequencial para obter uma análise multiplexada da amostra biológica. Em algumas formas de realização, uma série de conjuntos de sonda (incluindo no máximo 5 sondas em um conjunto) pode ser contactada com a amostra biológica de um modo sequencial para obter uma análise multiplexada da amostra biológica. Análise

multiplexada se refere geralmente à análise de múltiplos alvos em uma amostra biológica, utilizando o mesmo mecanismo de detecção.

[000208] Em algumas formas de realização, em que uma amostra biológica é posta em contato com uma pluralidade de múltiplos conjuntos de sondas na primeira etapa, uma série de etapas que incluem o branqueamento, a geração de sinais a partir de um conjunto subsequente de sondas e a observação do sinal podem ser repetidas pelo menos 5, pelo menos 15, pelo menos 30, pelo menos 60 vezes, pelo menos 100 vezes, ou pelo menos 150 vezes. Em algumas formas de realização, a série de etapas pode ser repetida de 25 a 30 vezes. Em outras formas de realização, a série de etapas pode ser repetida de 2 a 10 vezes.

[000209] Em algumas formas de realização, os componentes de uma amostra biológica não estão significativamente alterados depois de repetidos os ciclos das etapas de branqueamento, de ligação, de reação (se aplicável), e de observação de sinal. Em algumas formas de realização, os componentes de uma amostra biológica não estão significativamente alterados durante a etapa de branqueamento. Em algumas formas de realização, os componentes da amostra biológica que não são significativamente alterados durante a fase de branqueamento são alvos. Em algumas formas de realização, mais do que 80 % de alvos não são significativamente alterados no decorrer da etapa de branqueamento. Em algumas formas de realização, mais do que 95 % dos alvos não são significativamente alterados no decorrer da etapa de branqueamento.

Contato da Amostra Com Um ou Mais Manchas Morfológicas

[000210] Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula ou um tecido, e a amostra pode ser contactada com uma mancha morfológica antes, durante, ou após a etapa de contato com a primeira sonda ou sonda subsequente. Uma mancha morfológica pode incluir um corante que pode corar diferentes componentes celulares, de modo a facilitar a

identificação do tipo de célula ou o estado da doença. Em algumas formas de realização, a mancha morfológica pode ser prontamente distinguida dos geradores de sinal nas sondas, isto é, a mancha pode não emitir sinal que possa se sobrepor ao sinal da sonda. Por exemplo, para uma mancha fluorescente morfológica, o sinal a partir da mancha morfológica pode não autofluorescer no mesmo comprimento de onda que os fluoróforos utilizados nas sondas.

[000211] Uma mancha morfológica pode ser contactada com a amostra biológica antes, durante, ou depois, de qualquer um das etapas acima mencionadas. Em algumas formas de realização, uma mancha morfológica pode ser contactada com a amostra biológica, juntamente com a primeira etapa de contato da sonda. Em algumas formas de realização, uma mancha morfológica pode ser contactada com a amostra biológica antes do contato da amostra com um reagente de transferência de elétrons e irradiada após a ligação da primeira sonda ao alvo. Em algumas formas de realização, uma mancha morfológica pode ser contactada com uma amostra biológica, após o contato da amostra com um reagente de transferência de elétrons e irradiada para modificar o sinal. Em algumas formas de realização, uma mancha morfológica pode ser contactada com uma amostra biológica, juntamente com a segunda etapa de contato da sonda. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode ser posta em contato com a mancha morfológica após a ligação da segunda sonda ao alvo. Em algumas formas de realização, onde as manchas morfológicas podem resultar em ruído de fundo para o sinal fluorescente do gerador de sinal, as manchas morfológicas podem ser contactadas com a amostra biológica, após as etapas de sondagem, branqueamento e resondagem. Por exemplo, manchas morfológicas tipo H & E podem ser sequencialmente convertidas em imagem e registradas após os métodos aqui revelados.

[000212] Em algumas formas de realização, cromóforos, fluoróforos, ou

substratos de enzima/enzima podem ser utilizados como manchas morfológicas. Os exemplos adequados de cromóforos que podem ser usados como manchas (morfológicas e as suas células alvo, compartimentos subcelulares ou componentes celulares) podem incluir, mas não estão limitados a, Hematoxilina (ácidos nucleicos), Orange G (células vermelhas do sangue, do pâncreas, e da hipófise), Light Green SF (colágeno), Romanowsky-Giemsa (morfologia das células em geral), May-Grunwald (células do sangue), Blue Counterstain (Trevigen), Etil Green (CAS) (amiloide), Feulgen-Naphthol Yellow S (DNA), Giemsa (diferencialmente mancha vários compartimentos celulares), Metil Green (amiloide), pironina (ácidos nucleicos), Naphthol-Yellow (glóbulos vermelhos), Neutral Red (núcleos), mancha Papanicolaou (uma mistura de hematoxilina, Orange G e mistura de Bismarck Brown (morfologia das células em geral)), Red Counterstain B (Trevigen), Red Counterstain C (Trevigen), Sirius Red (amiloide), reagente Feulgen (pararosanilin) (DNA) Gallocyanin chrom-alum (DNA) Gallocyanin chrom-alum e Naphthol Yellow S (DNA), Metil Green-pironina Y (DNA), reagente de Thionin-Feulgen (DNA), Acridine Orange (DNA), Azul de Metileno (RNA e DNA), Azul de Toluidina (RNA e DNA), azul Alciano (hidratos de carbono), o rutênio vermelho (carboidratos), Sudan Black (lipídios), Sudan IV (lipídios), Oil Red-0 (lipídios), mancha de tricrome de Van Gieson (mistura de fucsina ácida e ácido pícrico) (células musculares), mancha de tricrome Masson (mistura de hematoxilina, fucsina ácida, e verde claro) (mancha colágeno, citoplasma, núcleo diferentemente), aldeído fucsina (fibras de elastina), ou mancha de Weigert (diferencia fibras de colágeno e reticular).

[000213] Os exemplos de manchas morfológicas fluorescentes adequadas (e as suas células alvo, compartimentos subcelulares ou componentes celulares se for o caso) podem incluir, mas não estão limitados a: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ácidos nucleicos) , Hoechst 33258 e

Hoechst 33342 (dois bisbenzimidazóis) (ácidos nucleicos), iodeto de propídio (ácidos nucleicos), Spectrum Orange (ácidos nucleicos), Spectrum Green (ácidos nucleicos), Quinacrine (ácidos nucleicos), Fluorescein-phalloidin (fibras de actina), Cromomicina A 3 (ácidos nucleicos), reação de Acriflavine-Feulgen (ácido nucleico), Reação de Auramine O-Feulgen (ácidos nucleicos), brometo de etídio (ácidos nucleicos), manchas de Nissl (neurônios), fluoróforos de DNA de alta afinidade, como POPO, BOBO, YOYO e TOTO e outros, e Proteína Fluorescente Verde fundida na proteína de ligação de DNA, como as histonas, ACM A, Quinacrine e Acridine Orange.

[000214] Os exemplos de enzimas adequadas (e as suas localizações ou atividades celulares primárias) podem incluir, mas não estão limitadas a, ATPases (fibras musculares), succinato desidrogenase (mitocôndrias), citocromo c oxidases (mitocôndrias), fosforilases (mitocôndrias), fosfofrutoquinases (mitocôndrias), acetil colinesterases (células nervosas), lactase (intestino delgado), fosfatases ácidas (lisossomos), aminopeptidases de leucina (células do fígado), desidrogenases (mitocôndrias), miodenilato de desaminases (células musculares), NADH diaforases (eritrócitos), e sucrases (intestino delgado).

[000215] Em algumas formas de realização, uma mancha morfológica pode ser estável em relação ao branqueamento químico fotoativado, isto é, o sinal de gerar propriedades da mancha morfológica não pode ser substancialmente afetado por uma fotorreação compreendendo contactar a mancha morfológica com um reagente de transferência de elétrons e subsequente irradiação. Em algumas formas de realização, em que uma amostra biológica pode ser corada com uma sonda e uma mancha morfológica, ao mesmo tempo, um branqueamento do sinal da sonda não pode modificar o sinal da mancha morfológica. Em algumas formas de realização, uma mancha morfológica pode ser usada como um controle para

corregistrar a informação molecular (obtida através das etapas iterativas de sondagem) e a informação morfológica (obtida através das manchas morfológicas). Em algumas formas de realização, a mancha morfológica não é modificada pelo reagente de transferência de elétrons, após irradiação da amostra.

Contato da Amostra Com Uma ou Mais Sondas de Controle

[000216] Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser ligada a um ou mais alvos presentes na amostra biológica. Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser ligada aos alvos, juntamente com a primeira etapa de contato da sonda. Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser aplicada a uma amostra biológica, simultaneamente com a primeira sonda. Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser aplicada sequencialmente para a amostra biológica, isto é, antes ou depois da aplicação da primeira sonda, mas antes da aplicação do reagente de transferência de elétrons e a subsequente irradiação.

[000217] Uma sonda de controle pode incluir um gerador de sinal que é estável em relação ao branqueamento químico fotoativado ou as propriedades geradoras de sinal do gerador de sinal não são substancialmente realizadas quando em contato com o reagente de transferência de elétrons e a subsequente irradiação. Um gerador de sinal pode incluir um radioisótopo que é estável durante a exposição a um reagente de transferência de elétrons e irradiação ou um fluoróforo, que não é quimicamente modificado após a exposição a um reagente de transferência de elétrons e irradiação. Um radioisótopo adequado pode incluir P^{32} , 3H , ^{14}C , ^{125}I ou ^{131}I . Um fluoróforo adequado pode incluir DAPI.

[000218] Em algumas formas de realização, um gerador de sinal adequado pode ser acoplado a um ligante para formar uma sonda de controle. Por exemplo, um marcador radioativo pode ser acoplado a um anticorpo para formar uma sonda de controle e o anticorpo pode se ligar a um ou mais

antígenos alvo presentes na amostra biológica. Em outras formas de realização, um gerador de sinal adequado pode ser capaz de se ligar a um ou mais alvos presentes na amostra e também proporcionar um sinal detectável, que é estável na presença do reagente de transferência de elétrons e durante a irradiação. Por exemplo, uma sonda de controle adequada pode ser DAPI, que é capaz de se ligar aos ácidos nucleicos na amostra e também capaz de proporcionar um sinal fluorescente que é substancialmente estável ao branqueamento químico fotoativado, isto é, que não é substancialmente modificado, após a adição de um reagente de transferência de elétrons e a subsequente irradiação.

[000219] Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser utilizada nos métodos aqui divulgados para proporcionar uma indicação da estabilidade dos alvos nas etapas iterativas de coloração. Por exemplo, uma sonda de controle pode ser ligada a um alvo conhecido na amostra e um sinal do controle observado e quantificado. O sinal de controle pode ser depois monitorado durante as etapas iterativas de coloração para proporcionar uma indicação da estabilidade dos alvos ou ligantes para o reagente de transferência de elétrons e a subsequente irradiação. Em algumas formas de realização, uma medida quantitativa (por exemplo, intensidade de sinal) do sinal de controle pode ser monitorada para quantificar a quantidade de alvos presentes na amostra após as etapas iterativas de sondagem.

[000220] Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser utilizada para obter informação quantitativa da amostra de interesse, por exemplo, a concentração de alvos na amostra ou o peso molecular dos alvos na amostra. Por exemplo, um alvo de controle (tendo concentração conhecida ou peso molecular conhecido), pode ser colocado, juntamente com a amostra de interesse, em uma técnica de transferência. Uma sonda de controle pode ser ligada ao alvo de controle e um sinal de controle observado. O sinal de controle pode ser depois correlacionado com os sinais observados a partir da

amostra de interesse, utilizando os métodos aqui descritos abaixo.

[000221] Em algumas formas de realização, uma sonda de controle pode ser utilizada nos métodos aqui divulgados para proporcionar o corregristo de informação múltipla molecular (obtida através das etapas iterativas de sondagem) e a informação morfológica (obtida, por exemplo, utilizando DAPI). Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem incluir o corregristo de várias imagens fluorescentes com as imagens morfológicas de campo brilhante obtidas, por exemplo, utilizando H & E. Em algumas formas de realização, as sondas utilizadas nas etapas iterativas de sondagem podem não ter qualquer informação compartimental comum que possa ser utilizada para registrar as imagens de H & E. Uma sonda de controle, como uma mancha nuclear DAPI pode ser utilizada para corregristar o núcleo corado com hematoxilina nas imagens de campo brilhante com as imagens fluorescentes. As imagens fluorescentes e as imagens de campo brilhante podem ser corregristadas usando algoritmos de registro de imagem que podem ser agrupados em duas categorias: técnicas baseadas em intensidade e baseadas em características.

Correlação do Primeiro Sinal e Dos Sinais Subsequentes

[000222] Em algumas formas de realização, um primeiro sinal, um sinal subsequente, ou o primeiro sinal e os subsequentes sinais podem ser analisados para se obter informação sobre a amostra biológica. Por exemplo, em algumas formas de realização, uma presença ou ausência de um primeiro sinal pode indicar a presença ou ausência do primeiro alvo (capaz de se ligar ao primeiro ligante) na amostra biológica. De igual modo, a presença ou ausência de um segundo sinal pode indicar a presença ou a ausência do segundo alvo (capaz de se ligar ao segundo ligante na amostra biológica). Em formas de realização em que múltiplos alvos podem ser analisados utilizando uma pluralidade de sondas, a presença ou ausência de um sinal particular pode indicar a presença ou ausência do correspondente alvo na amostra

biológica.

[000223] Em algumas formas de realização, as etapas de observação podem incluir uma medição quantitativa de pelo menos um alvo na amostra. Em algumas formas de realização, um valor de intensidade de um sinal (por exemplo, a intensidade de fluorescência) pode ser medido e pode ser correlacionado com a quantidade de alvo na amostra biológica. A correlação entre a quantidade de alvo e a intensidade do sinal pode ser determinada utilizando padrões de calibração. Em algumas formas de realização, os valores de intensidade dos primeiro e segundo sinais podem ser medidos e correlacionados com as respectivas quantidades do alvo. Em algumas formas de realização, por meio da comparação das duas intensidades do sinal, as quantidades relativas do primeiro alvo e do segundo alvo (relativamente um ao outro ou relativamente a um controle), podem ser determinadas. Da mesma forma, em que múltiplos alvos podem ser analisados utilizando múltiplas sondas, as quantidades relativas de alvos diferentes na amostra biológica podem ser determinadas através da medição de diferentes intensidades de sinal. Em algumas formas de realização, uma ou mais amostras de controle podem ser utilizadas como aqui descrito acima. Ao observar uma presença ou ausência de um sinal nas amostras (amostra biológica de interesse versus um controle), a informação sobre a amostra biológica pode ser obtida. Por exemplo, comparando uma amostra de tecido doente versus uma amostra normal, o tecido, a informação sobre os alvos presentes na amostra de tecido doente pode ser obtida. De modo semelhante, comparando a intensidade do sinal entre as amostras (isto é, amostra de interesse e um ou mais de controle), a informação sobre a expressão de alvos na amostra pode ser obtida.

[000224] Em algumas formas de realização, as etapas de observação incluem colocalizar pelo menos dois alvos na amostra. Métodos para colocalizar alvos em uma amostra são descritos no pedido de patente em série US N ° 11/686.649, intitulado "*System and Methods for Analyzing Images of*

Tissue”, depositado em 15 de março de 2007; pedido de patente em série US N ° 11/500.028, intitulado “*System and Methods for Co-Registering Multi-Channel Images of a Tissue Micro Array*”, depositado em 7 de agosto de 2006; pedido de patente em série US N ° 11/606.582, intitulado “*System and Methods for Sorting Images of a Tissue Micro Array*”, depositado em 30 de novembro de 2006, e o pedido de patente em série US N ° 11/680.063, intitulado “*Automated Segmentation of Images Structure*”, depositado em 28 de fevereiro de 2007, agora Patente US No. 8.036.462, emitida em 11 de Outubro de 2011, cada uma das quais é aqui incorporada por referência.

[000225] Em algumas formas de realização, uma localização do sinal na amostra biológica pode ser observada. Em algumas formas de realização, uma localização do sinal no sinal biológico pode ser observada através de manchas morfológicas. Em algumas formas de realização podem ser observadas localizações relativas de dois ou mais sinais. A localização do sinal pode ser correlacionada com uma localização do alvo na amostra biológica, fornecendo informação sobre a localização dos diferentes alvos na amostra biológica. Em algumas formas de realização, um valor de intensidade do sinal e uma localização do sinal podem ser correlacionados para obter informação sobre a localização de diferentes alvos na amostra biológica. Por exemplo, determinados alvos podem ser expressos mais no citoplasma relativamente ao núcleo, ou vice-versa. Em algumas formas de realização, as informações sobre a localização relativa de alvos pode ser obtida comparando a localização e intensidade valores de dois ou mais sinais.

[000226] Em formas de realização que empregam técnicas de transferência, as etapas de observação podem incluir um local de observação do sinal no blot. A localização do sinal no blot pode ser, então, relacionada com padrões de calibração carregados juntamente com a amostra no gel para obter informação sobre o peso molecular dos alvos nas diferentes bandas. Em algumas formas de realização, uma localização do sinal sobre a mancha pode

ser correlacionada com um peso molecular do alvo e o ponto isoelétrico do alvo, por exemplo, em 2D-PAGE. Em algumas formas de realização, as proteínas estruturais, tais como actina ou tubulina podem ser sondadas utilizando sondas de controle em Western blot para quantificar a quantidade de alvos na amostra.

[000227] Em algumas formas de realização, uma ou mais da etapa de observação ou correlação pode ser realizada utilizando meios auxiliados por computador. Em formas de realização em que o (s) sinal (is) a partir do gerador de sinal pode (m) ser armazenado (s) na forma de imagem (ns) digital (is), análise de imagem (ns) assistida por computador pode ser realizada. Em algumas formas de realização, as imagens (por exemplo, os sinais da sonda e manchas morfológicas) podem ser sobrepostas utilizando sobreposição auxiliada por computador para obter informação completa da amostra biológica, por exemplo, informação topológica e de correlação.

[000228] Em algumas formas de realização, um ou mais dos métodos acima mencionados podem ser automatizados e podem ser realizados utilizando sistemas automatizados. Em algumas formas de realização, todas as etapas podem ser realizadas utilizando sistemas automatizados.

[000229] Os métodos aqui divulgados podem encontrar aplicações em analítica, diagnósticos e aplicações terapêuticas em biologia e na medicina. Em algumas formas de realização, os métodos aqui descritos podem encontrar aplicações em histoquímica, particularmente, imuno-histoquímica. Análise de amostras de células ou tecidos de um paciente, de acordo com os métodos aqui descritos, pode ser utilizada para diagnóstico (por exemplo, para identificar os pacientes que sofram de uma doença em particular, tenham sido expostos a uma toxina particular ou estão respondendo bem a um determinado transplante terapêutico ou de órgão) e prognóstico (por exemplo, para identificar os pacientes que são propensos a desenvolver uma determinada doença, respondem bem a uma determinada terapia ou ser aceito para um

transplante de órgão particular). Os métodos aqui divulgados podem facilitar uma análise precisa e fiável de uma pluralidade (por exemplo, número potencialmente infinito) de alvos (por exemplo, marcadores de doenças) a partir da mesma amostra biológica.

EXEMPLOS

[000230] Os exemplos seguintes se destinam apenas a ilustrar os métodos e formas de realização de acordo com a invenção, e como tal não devem ser interpretados como impondo limitações nas reivindicações.

Exemplo 1. Branqueamento químico fotoativado de corantes de cianina: resposta a dose

[000231] A uma solução de Cy3 em PBS, 2 a 60 equivalentes de sal de lítio de borato de trifenilbutila foram adicionados, e a solução foi irradiada durante 4 minutos ou durante 10 minutos. A absorbância a 550 nm foi medida para monitorar o branqueamento químico fotoativado, e os resultados foram representados graficamente, como é mostrado na Figura 1. A linha cheia com quadrados representa a absorbância A550 depois do corante Cy3 ter sido irradiado durante 4 minutos na presença de diferentes concentrações de borato de trifenilbutila. A linha sólida com diamantes representa absorbância A550 após o corante Cy3 ter sido irradiado durante 10 minutos na presença de diferentes concentrações de borato de trifenilbutila. Os resultados demonstram que o grau de branqueamento de Cy3 aumenta com o aumento da concentração do sal de borato.

Exemplo 2. Comparação de branqueamento de Cy3 por fotorreação e oxidação térmica

[000232] Três métodos de branqueamento com Cy3 foram comparados. Para a reação de branqueamento químico fotoativado, Cy3 foi misturado com sal de lítio de borato de trifenilbutila e irradiado durante 20 segundos. Para a reação de oxidação térmica, Cy3 foi misturado com peróxido de hidrogênio básico e incubado durante 20 segundos. Para a reação de controle, Cy3 foi

incubado com água durante 20 segundos. A cor da solução de Cy3 em todas as três reações foi comparada antes e depois de cada incubação e/ou reação. A reação de controle não muda sua cor rosa escuro. A cor da reação de oxidação térmica muda de rosa escuro para rosa claro após 20 segundos de oxidação térmica. A reação de branqueamento químico fotoativado muda de rosa escuro para incolor após 20 segundos de irradiação.

Exemplo 3. Branqueamento químico fotoativado de Cy3 e Cy5 em tecidos.

[000233] Microarranjos de tecido (TMA, Pantomics Catalog No. MTU541C) foram corados com citoqueratina conjugada com Cy3 e pan-caderina conjugada com Cy5. Branqueamento químico fotoativado do Cy3 e Cy5 foi realizado através da incubação de TMAs manchados com sal de lítio de borato de trifenilbutila e irradiação por 2 minutos. As imagens foram tiradas no Microscópio Olympus antes e depois do branqueamento. As imagens das amostras coradas com citoqueratina conjugado com Cy3, antes e depois do branqueamento estão apresentadas na Figura 2. As imagens de amostras coradas com pan-caderina conjugada com Cy5, antes e depois do branqueamento estão apresentadas na Figura 3. Estes dados demonstram que o branqueamento químico fotoativado destroi eficazmente sinais de Cy3 e Cy5 em tecidos corados.

Exemplo 4. Branqueamento químico fotoativado de BODIPY

[000234] A reação de branqueamento químico fotoativado de BODIPY foi realizada em metanol/água com ou sem 100 mM de solução de sal de lítio de borato de trifenilbutila. A irradiação de ambas as amostras foi realizada durante 2 minutos utilizando lâmpadas de halogênio de 100 W. A cor amarela brilhante do frasco de reação incluindo BODIPY e sal de borato de trifenilbutila torna-se amarelo pálido após a irradiação. É mostrado na Figura 4 o espectro de fluorescência da reação antes da irradiação (linha quebrada de forma irregular) e após a irradiação (linha contínua). O espectro de fluorescência demonstra extinção da fluorescência total de BODIPY por

branqueamento químico fotoativado. A cor amarela brilhante do frasco de reação incluindo BODIPY sem sal de borato de trifenilbutila mantém a sua cor amarela brilhante após a irradiação.

Exemplo 5. Branqueamento químico fotoativado de rodamina

[000235] A reação de branqueamento químico fotoativado da rodamina foi realizada em metanol/água com ou sem 100 mM de solução de sal de lítio de borato de trifenilbutila. A irradiação de ambas as amostras foi realizada durante 2 minutos utilizando lâmpadas de halogênio de 100 W. A cor vermelha brilhante do frasco de reação incluindo rodamina e sal de lítio de borato de trifenilbutila é perdido após a irradiação. É mostrado na Figura 5 o espectro de fluorescência da reação antes da irradiação (linha quebrada de forma irregular) e após a irradiação (linha contínua). O espectro de fluorescência demonstra supressão de fluorescência completa de rodamina por branqueamento químico fotoativado. A cor vermelha brilhante do frasco de reação incluindo rodamina sem sal de borato de trifenilbutila mantém a sua cor vermelha brilhante após a irradiação.

Exemplo 6. Branqueamento químico fotoativado de 1,3-dicloro-7-hidroxi-9,9-dimetil-2 (9H)-acridinona (DDAO)

[000236] A reação de branqueamento químico fotoativado de acridona foi realizada em metanol/água com ou sem 100 mM de solução de sal de lítio de borato de trifenilbutila. A irradiação de ambas as amostras foi realizada durante 2 minutos utilizando lâmpadas de halogênio de 100 W. A cor marrom da reação se torna amarela após a irradiação. É mostrado na Figura 6 o espectro de fluorescência da reação antes da irradiação (linha quebrada de forma irregular), depois de uma irradiação (linha contínua) e após 2 minutos de irradiação (linha uniformemente tracejada). O espectro de fluorescência também demonstra incompleta supressão de fluorescência de DDAO no tempo limitado utilizado para irradiação. A cor marrom do frasco de reação incluindo DDAO sem sal de borato de trifenilbutila mantém a sua cor marrom

após a irradiação.

[000237] Embora a forma de realização particular da presente invenção foi mostrada e descrita, será óbvio para as pessoas versadas na técnica que alterações e modificações podem ser feitas sem se afastar dos ensinamentos da invenção. A matéria objeto exposta na descrição anterior e nos desenhos que acompanham é oferecida a título de ilustração apenas e não como uma limitação. O verdadeiro escopo da invenção se destina a ser definido nas reivindicações seguintes, quando vistas na sua perspectiva apropriada baseada na técnica anterior.

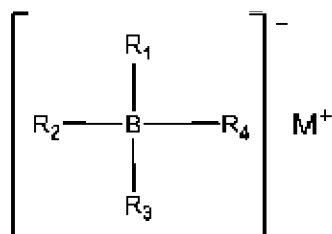
REIVINDICAÇÕES

1. Método para sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra biológica, incluindo múltiplos alvos;

(b) detectar um sinal a partir de pelo menos uma sonda ligada na etapa (a);

(c) contactar a amostra compreendendo a sonda ligada da etapa (a) com um reagente de transferência de elétrons em que o reagente de transferência de elétrons é um sal borato representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que cada um de R_1 ; R_2 e R_3 é, de forma independente, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma arila ou uma heteroarila, em que a referida alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro,

R_4 é uma alquila, uma alquenila, ou uma alquinila, em que a referida alquila, alquenila ou alquinila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro, e

M^{+} é selecionado dentre o grupo consistindo de cátions orgânicos e inorgânicos;

(d) irradiar a amostra da etapa (c);

(e) ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra da etapa (d); e

(f) detectar um sinal a partir da sonda ligada na etapa (e).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sonda na etapa (a) compreende um gerador de sinal óptico, e o sinal observado na etapa (b) é um sinal óptico.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a sonda na etapa (a) compreende um gerador de sinal fluorescente, e o sinal observado na etapa (b) é um sinal fluorescente.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a irradiação da amostra na etapa (d) é realizada na presença de um tampão a um pH de 5 a 9.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a irradiação da amostra na etapa (d) é realizada por exposição da amostra a luz de 350 nm – 1,3 μ M no comprimento de onda.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a irradiação da amostra na etapa (d) é realizada por exposição da amostra a luz de 400 a 700 nm de comprimento de onda.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada R_1 ; R_2 e R_3 é um grupo arila opcionalmente substituída e R_4 é um grupo alquila opcionalmente substituída.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que cada R_1 ; R_2 , e R_3 é fenila não substituída e R_4 é butila não substituída, e o sal de borato é sal de borato de trifenilbutila.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que M^+ é um cátion inorgânico selecionado a partir do grupo que consiste em Li^+ , Na^+ ou K^+ .

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas (c) a (f) são repetidas uma ou mais vezes.

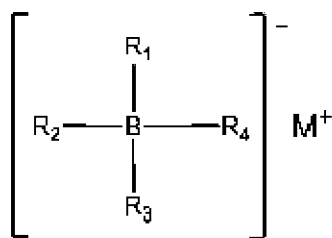
11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sonda na etapa (a) e a sonda na etapa (e) compreendem, cada uma, um gerador de sinal, em que o gerador de sinal na etapa (a) é diferente do gerador de sinal na etapa (e).

12. Método para sondagem de múltiplos alvos em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) ligar múltiplas sondas de múltiplos alvos presentes na amostra biológica, em que as sondas múltiplas incluem um primeiro conjunto de sondas e um segundo conjunto de sondas;

(b) detectar um primeiro conjunto de sinais a partir do primeiro conjunto de sondas ligadas na etapa (a);

(c) contactar a amostra compreendendo a sonda ligada da etapa (a) com um reagente de transferência de elétrons em que o reagente de transferência de elétrons é um sal borato representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que cada um de R_1 ; R_2 e R_3 é, de forma independente, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma arila ou uma heteroarila, em que a referida alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro,

R_4 é uma alquila, uma alquenila, ou uma alquinila, em que a referida alquila, alquenila ou alquinila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano,

halogênio, ou nitro, e

M^+ é selecionado dentre o grupo consistindo de cátions orgânicos e inorgânicos;

(d) irradiar a amostra da etapa (c);

(e) gerar um segundo conjunto de sinais a partir do segundo conjunto de sondas ligadas na etapa (a);

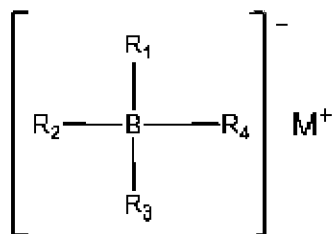
(f) detectar o segundo conjunto de sinais.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a irradiação da amostra na etapa (d) inicia uma fotorreação que inativa substancialmente o gerador de sinal por branqueamento químico fotoativado.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que nenhum sinal detectável é observado após a etapa (d).

15. Método para análise da amostra biológica de multiplexação de alta produtividade, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

um processo de ciclo de sinal, em que em cada ciclo, coloração e formação de imagens é seguido por aplicação de um reagente de transferência de elétrons e irradiação da amostra biológica em que o reagente de transferência de elétrons é um sal borato representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que cada um de R_1 ; R_2 e R_3 é, de forma independente, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma arila ou uma heteroarila, em que a referida alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo

consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro,

R₄ é uma alquila, uma alquenila, ou uma alquinila, em que a referida alquila, alquenila ou alquinila é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em (C₁-C₄) alquila, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) alquilamino, amino, hidroxila, ciano, halogênio, ou nitro, e

M⁺ é selecionado dentre o grupo consistindo de cátions orgânicos e inorgânicos.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o método permite ciclo de sinal rápido sem modificar significativamente os componentes da amostra biológica, que são diferentes da sonda.

FIG. 1

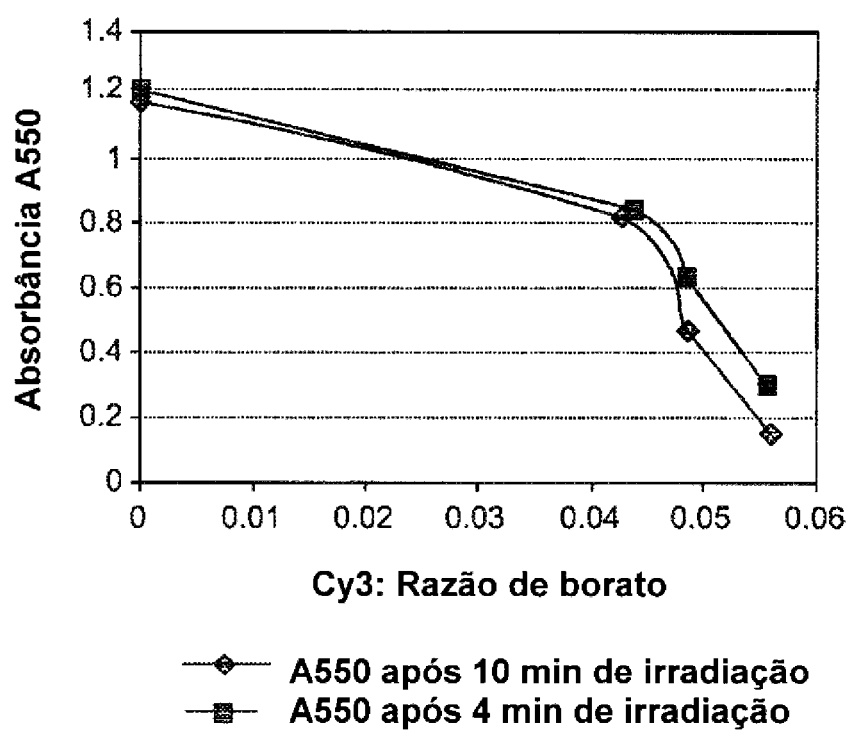


FIG. 2

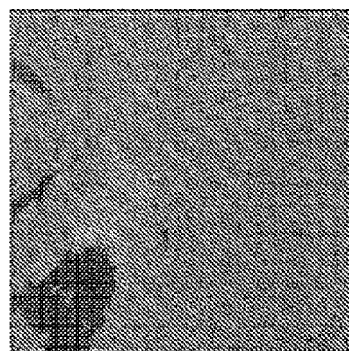
Citoqueratina-Cy3

Conjugado de Cy3 em
adenocarcinoma de mama



Perda de
sinal
→

2 min de branqueamento
fotoativado



Conjugado de Cy3 em
adenocarcinoma de mama



→

2 min de branqueamento
fotoativado

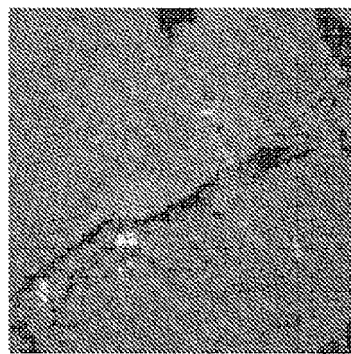


FIG. 3

Pan-caderina- Cy5

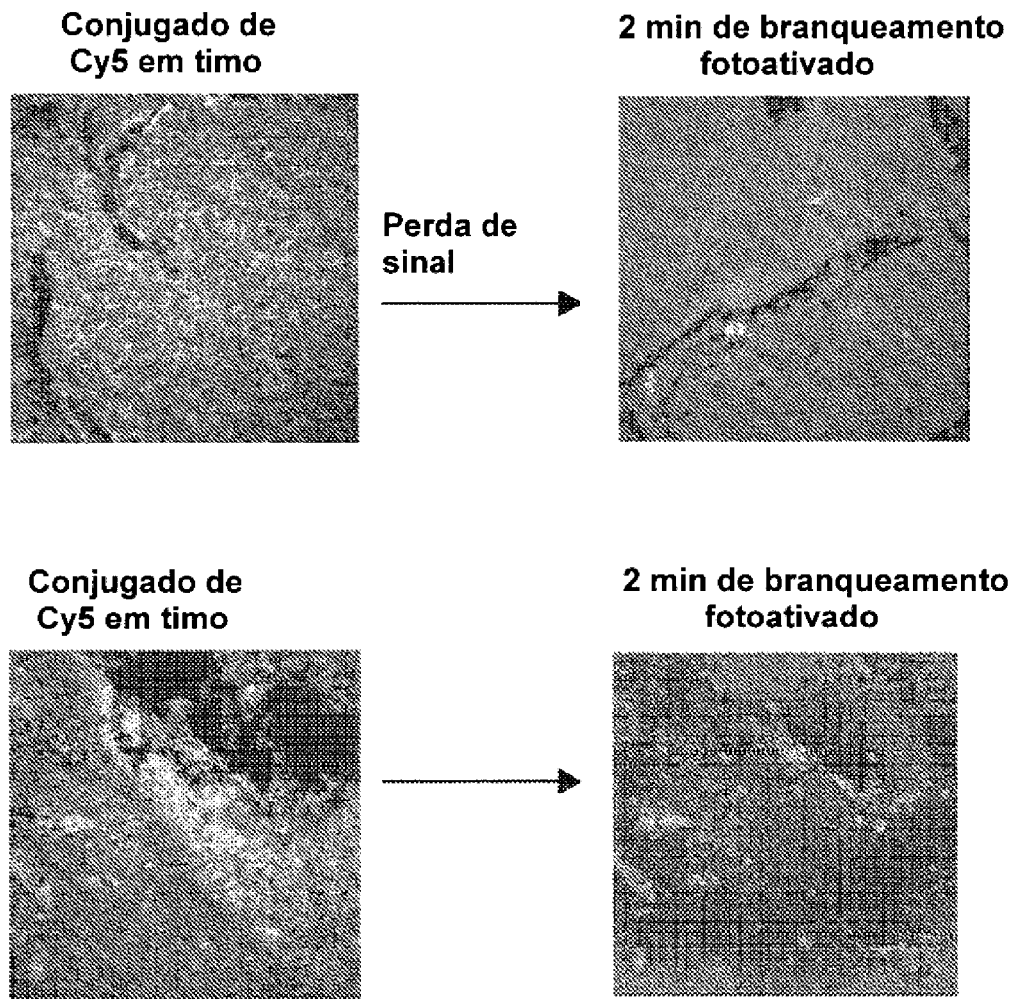


FIG. 4

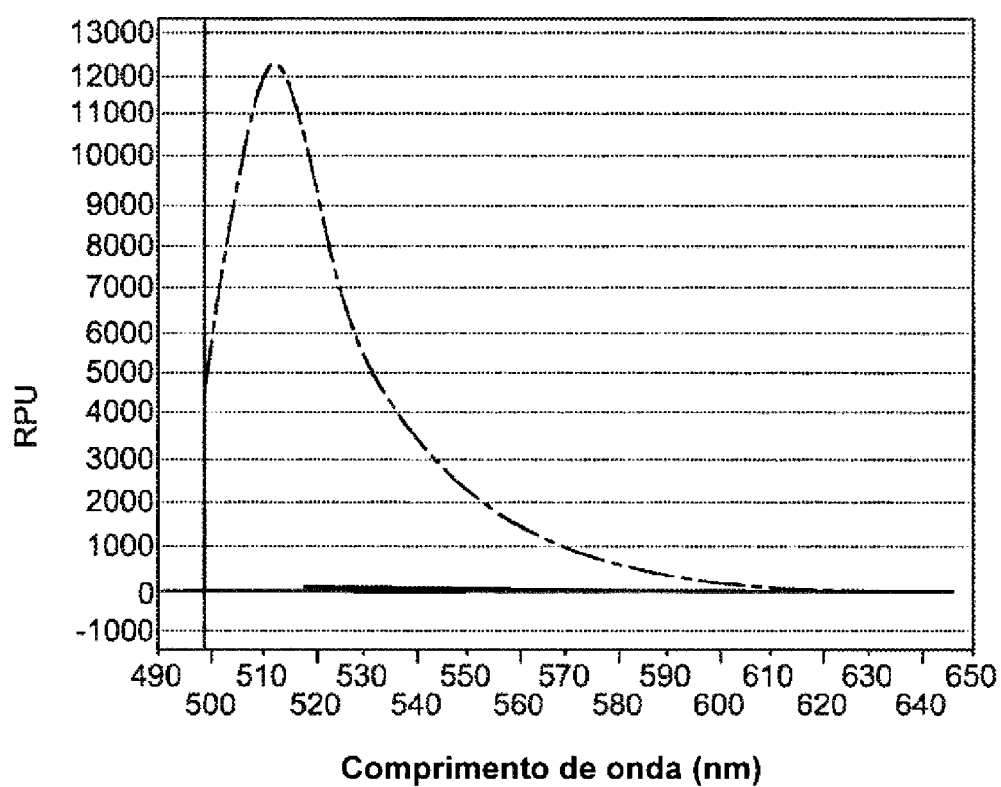


FIG. 5

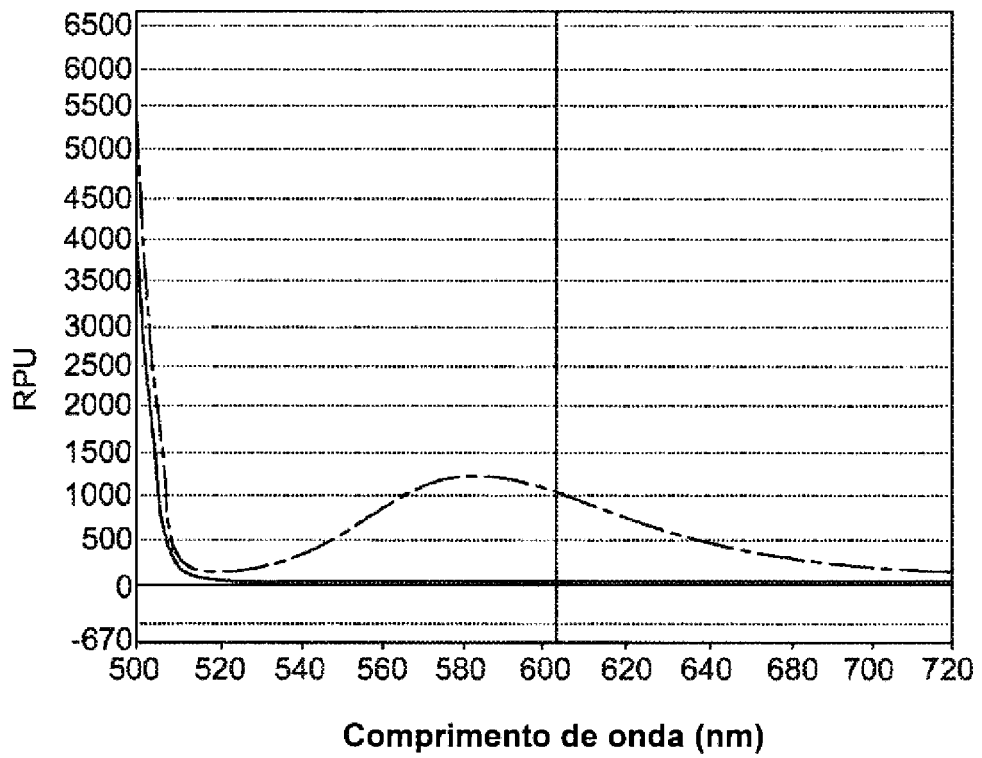
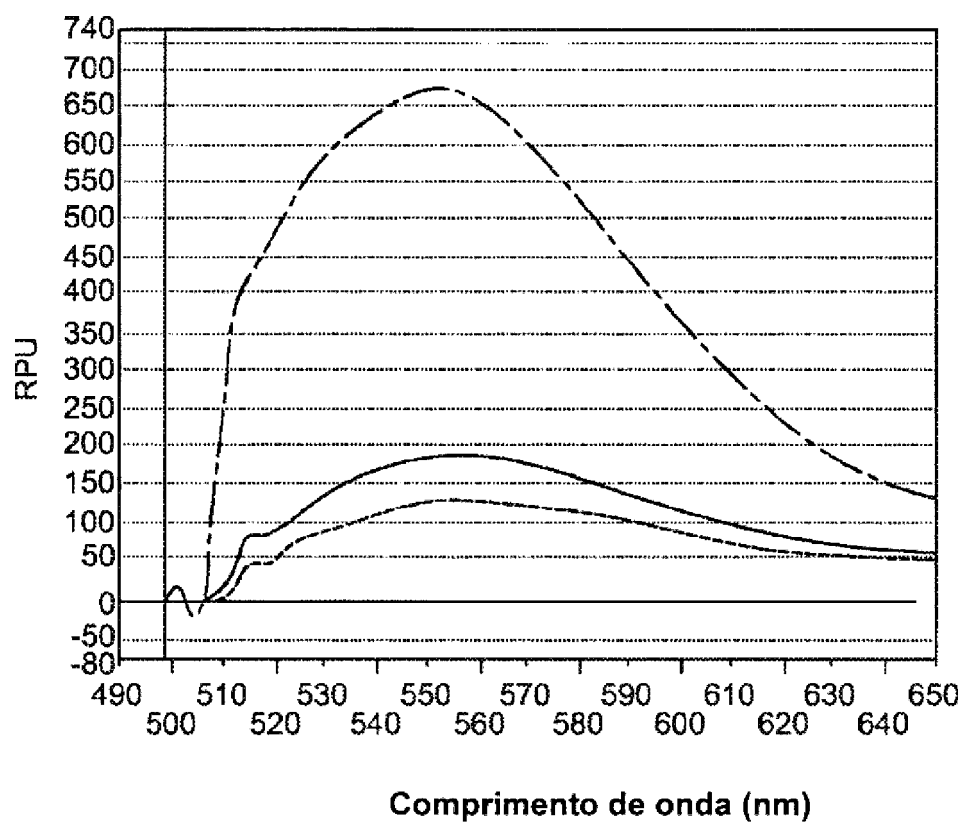


FIG. 6



RESUMO

“MÉTODOS PARA SONDAÇÃO DE MÚLTIPLOS ALVOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E PARA ANÁLISE DA AMOSTRA BIOLÓGICA DE MULTIPLEXAÇÃO DE ALTA PRODUTIVIDADE”

Métodos que compreendem o uso de branqueamento químico fotoativado para a detecção de múltiplos alvos em uma amostra biológica são fornecidos. Os métodos incluem as etapas de proporcionar uma amostra biológica, incluindo múltiplos alvos, ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal a partir da sonda. O método inclui ainda as etapas de contactar a amostra que compreende a sonda ligada a um reagente de transferência de elétrons e irradiar a amostra, iniciando-se assim uma fotorreação que inativa substancialmente a sonda por branqueamento químico fotoativado. O método inclui ainda as etapas de ligar pelo menos uma sonda a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal a partir da sonda. O processo de ligação, observação e branqueamento pode ser iterativamente repetido.