

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 975 361**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6804 (2008.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2016 PCT/US2016/042455**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17015097**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2016 E 16742554 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 3325649**

(54) Título: **Cuantificación simultánea de una pluralidad de proteínas en una región definida por el usuario de un tejido seccionado transversalmente**

(30) Prioridad:

17.07.2015 US 201562193819 P
01.12.2015 US 201562261654 P
11.01.2016 US 201662277283 P
15.04.2016 US 201662323018 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2024

(73) Titular/es:

NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC. (50.0%)
530 Fairview Avenue North, Suite 2000
Seattle, WA 98109, US y
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (50.0%)

(72) Inventor/es:

BEECHEM, JOSEPH M.;
MILLS, GORDON;
WARREN, CHARLES;
MERRITT, CHRIS;
JUNG, JAEMYEONG;
DUNAWAY, DWAYNE L. y
CROWDER, SCOTT

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 975 361 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cuantificación simultánea de una pluralidad de proteínas en una región definida por el usuario de un tejido seccionado transversalmente

5

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. núm. 62/193.819, presentada el 17 de julio de 2015; Solicitud Provisional de EE. UU. núm. 62/261.654, presentada el 1 de diciembre de 2015; Solicitud Provisional de EE. UU. núm. 62/277.283, presentada el 11 de enero de 2016; y Solicitud Provisional de EE.UU. núm. 62/323.018, presentada el 15 de abril de 2016.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

Los métodos inmunohistoquímicos estándar permiten la detección simultánea de, como máximo, de seis a diez dianas proteicas, siendo típico tres a cuatro dianas. Existe una necesidad de sondas, composiciones, métodos y kits para la detección y cuantificación simultánea y multiplexada de la expresión de proteínas en una región de un tejido definida por el usuario, una célula definida por el usuario, y/o una estructura subcelular definida por el usuario dentro de una célula.

20

Los documentos US2011/0151451 y WO2015/128272 enseñan métodos para detectar proteínas en una ubicación específica en una muestra de tejido usando una sonda que comprende un dominio de unión a la diana y un oligonucleótido señal separado por un enlazador photoescindible.

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

30

La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación simultánea y multiplexada de la expresión de proteínas en una región de un tejido definida por el usuario, una célula definida por el usuario, y/o una estructura subcelular definida por el usuario dentro de una célula.

35

La presente invención se refiere a un método, que comprende:

(1) poner en contacto al menos una diana proteica en una muestra de tejido con al menos una sonda que comprende un dominio de unión a la diana, un oligonucleótido señal, y un motivo photoescindible ubicado entre el dominio de unión a la diana y el oligonucleótido señal;

(2) iluminar una ubicación específica de la muestra de tejido con luz suficiente para liberar el oligonucleótido señal;

40

(3) recolectar de una disolución proximal el oligonucleótido señal liberado, en el que la disolución proximal se eluye directamente por encima de la ubicación que se iluminó, aspirando con un tubo capilar, y no de toda la muestra de tejido; y

45

(4) identificar el oligonucleótido señal liberado, detectando de ese modo la al menos una diana proteica en la ubicación específica de la muestra de tejido que se iluminó.

50

La ubicación específica es una región de un tejido definida por el usuario, una célula definida por el usuario, y/o una estructura subcelular definida por el usuario dentro de una célula. El dominio de unión a la diana comprende una molécula de unión a proteínas, por ejemplo un anticuerpo, un péptido, un aptámero, y un peptoíde. En realizaciones, se detectan dos o más dianas proteicas. En realizaciones, se detectan 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más dianas, y cualquier número entre ellos; por ejemplo, se pueden detectar 800 o más dianas diferentes. En realizaciones, la detección incluye cuantificar la abundancia de cada diana.

55

En realizaciones, el método incluye además repetir al menos las etapas (2) y (3) en al menos una segunda ubicación específica de la muestra de tejido, comprendiendo la segunda ubicación específica al menos una segunda célula. En realizaciones, la detección incluye comparar la abundancia de la al menos una diana proteica en o de la primera ubicación específica y en o de la al menos segunda ubicación específica. La al menos una célula y la al menos segunda célula pueden ser el mismo tipo de célula o tipos de células distintos. En algunas realizaciones, la detección incluye cuantificar la abundancia de la al menos una diana proteica en o de un primer tipo de célula y en o de el al menos un segundo tipo de célula. En realizaciones, el primer y segundo tipo de células se seleccionan independientemente de una célula normal y una célula anormal, por ejemplo una célula enferma y cancerosa.

65

En realizaciones, la muestra de tejido se inmoviliza directamente en una superficie, o se inmoviliza indirectamente en la superficie. Una muestra de tejido puede ser una sección de tejido de 2 a 1000 µm de grosor, obtenida, por ejemplo, de una muestra embebida en parafina fijada con formalina (FFPE), o de una muestra no fijada. La al menos una celda

- 5 puede estar fijada o no fijada. La al menos una célula puede teñirse o marcarse antes de la etapa (2), permitiendo la visualización de una estructura celular o subcelular en la célula teñida o marcada. Alternativamente, para secciones de tejido, una sección adyacente a la sección que está en contacto con las sondas puede teñirse o marcarse antes de la etapa (2), permitiendo así la estimación de una estructura subcelular, celular o relacionada con tejido en la célula correspondiente o célula cercana en la sección que está en contacto con las sondas. Dichas técnicas de tinción o marcado son bien conocidas en la técnica.
- 10 En el aspecto anterior, al menos una sonda incluye además un enlazador (por ejemplo, un enlazador escindible) ubicado entre el dominio de unión a la diana y el oligonucleótido señal. El enlazador escindible es fotoescindible, que se escinde mediante luz proporcionada por una fuente de luz coherente adecuada (por ejemplo, un láser y una fuente de luz UV) o una fuente de luz incoherente adecuada (por ejemplo, una lámpara de arco y un diodo emisor de luz (LED)). La fuente de luz puede irradiar al menos una estructura subcelular de la al menos una célula, y se puede detectar la abundancia de la al menos una diana proteica en o desde la al menos una estructura subcelular de la al menos una célula. Además, la fuente de luz puede irradiar primero al menos una estructura subcelular en la al menos una célula, y posteriormente irradiar al menos una estructura subcelular en la al menos segunda célula, permitiendo una comparación de la abundancia de la al menos una diana proteica en o desde la al menos una estructura subcelular en la al menos una célula y la al menos una estructura subcelular en la al menos una segunda célula.
- 15 20 En realizaciones, el oligonucleótido señal es un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico parcialmente bicatenario.
- 25 En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, la muestra puede ser células cultivadas o células disociadas (fijadas o no fijadas) que han sido inmovilizadas en un portaobjetos. La muestra puede comprender células (incluyendo tanto células primarias como líneas celulares cultivadas) y/o tejidos (incluidos cultivados o explantados). La muestra puede comprender una célula cultivada, una célula primaria, o una célula disociada de un explante.
- 30 35 En realizaciones, la iluminación de una región de interés más pequeña que un campo de visión (por ejemplo, una sola célula o una estructura subcelular dentro de una célula) comprende el uso de un dispositivo de barrido láser (por ejemplo, confocal) o un dispositivo de espejo digital (DMD). para dirigir la luz.
- 40 45 En realizaciones, una sonda se prepara mediante un método de bioconjugación de cisteína que es estable, específico del sitio, preferiblemente, para la cadena pesada de la región bisagra del anticuerpo. En realizaciones, una sonda puede comprender una pluralidad (es decir, más de uno, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más) oligonucleótidos marcados por anticuerpo.
- 50 55 La detección comprende una reacción de polimerasa, una reacción de transcriptasa inversa, hibridación con una micromatríz de oligonucleótidos, espectrometría de masas, hibridación con una baliza molecular fluorescente, una reacción de secuenciación, o códigos de barras moleculares nCounter®. En realizaciones preferidas, se usan sistemas y métodos nCounter® de NanoString Technologies®.
- 60 En aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, el oligonucleótido señal se recolecta de un tejido mediante un flujo líquido laminar, turbulento, o de transición. El flujo puede realizarse a través de un canal, por ejemplo que tiene 25 a 500 µm de profundidad entre el tejido y un dispositivo fluídico o barrera impermeable colocada sobre el tejido.
- 65 En la invención, el oligonucleótido señal se recolecta de una disolución proximal, en la que la disolución proximal se eluye directamente encima de la ubicación que se iluminó, aspirando con un tubo capilar, y no de toda la muestra de tejido. El tubo capilar puede comprender un dispositivo óptico capaz de transmitir una fuerza luminosa, por ejemplo luz UV, a la al menos una célula. La disolución proximal puede comprender un polímero aniónico, por ejemplo sulfato de dextrano, y/o ADN de esperma de salmón, y/o el oligonucleótido señal recolectado se puede añadir a una disolución que comprende un polímero aniónico, por ejemplo sulfato de dextrano, y/o ADN de esperma de salmón. Se pueden usar otros agentes bloqueantes no específicos conocidos en la técnica además o en lugar del ADN de esperma de salmón.
- 70 75 En realizaciones, el método proporciona detección simultánea de proteínas resueltas espacialmente de una muestra de tejido.
- 80 En realizaciones, la lectura digital comprende un intervalo dinámico lineal mayor o igual a 5 logs.
- 85 90 En realizaciones, las sondas se proporcionan a una muestra en concentraciones típicamente menores que las usadas para inmunohistoquímica (IHC) o para hibridación in situ (ISH). Alternativamente, la concentración puede ser significativamente menor que la usada para IHC o ISH. Por ejemplo, la concentración de la sonda puede ser 2 veces menos, 5 veces menos, 10 veces menos, 20 veces menos, 25 veces menos, 30 veces menos, 50 veces menos, 60 veces menos, 70 veces menos, 80 veces menos, 90 veces menos. menos, 100 veces menos, 200 veces menos, 300 veces menos, 400 veces menos, 500 veces menos, 600 veces menos, 700 veces menos, 800 veces menos, 900 veces menos, 1000 veces menos, 2000 veces menos, o menos, y cualquiera número intermedio. En realizaciones, las sondas

se proporcionan en una concentración de 100 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM, 0,01 nM, y menos, y cualquier concentración intermedia.

- 5 En realizaciones, una muestra de tejido se une a un portaobjetos y primero se obtienen imágenes usando fluorescencia (por ejemplo, anticuerpos marcados de manera fluorescente y tinciones fluorescentes (por ejemplo, DAPI)), y después se cuenta digitalmente la expresión de proteínas de la muestra.
- 10 En realizaciones, una purificación negativa, por ejemplo que comprende un método de purificación por afinidad que comprende poner en contacto moléculas de sonda intactas con un oligonucleótido inmovilizado que es complementario a una porción de la sonda intacta o un anticuerpo inmovilizado o motivo de unión a proteínas que reconoce y se une a una porción de la sonda intacta, se usa para eliminar moléculas de sonda intactas de los oligonucleótidos señal liberados. En realizaciones, el dominio de unión a la diana de la sonda intacta comprende una etiqueta o secuencia de purificación universal que es parcialmente complementaria al oligonucleótido inmovilizado o es capaz de ser reconocida o unida por el anticuerpo inmovilizado o motivo de unión a proteínas. En estas realizaciones, se puede usar cualquier etiqueta o secuencia bien conocida en la técnica.

20 La bibliografía científica y de patentes a la que se hace referencia aquí establece el conocimiento que está disponible para aquellos con pericia en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color serán proporcionadas por la Oficina previa solicitud y pago de la tasa correspondiente.

30 **Figura 1:** Muestra dos sondas exemplares. Las cadenas principales de ácidos nucleicos (ya sea ADN monocatenario o ARN monocatenario) se muestran como una línea negra recta. Cada una de las sondas incluye un dominio de unión a la diana, que se muestra en rojo. La sonda superior incluye segmentos de ARN marcados hibridados con la cadena principal de ácido nucleico, mientras que la sonda inferior incluye oligonucleótidos de ADN marcados hibridados con la cadena principal de ácido nucleico. Un motivo escindible (por ejemplo, un enlazador escindible, no mostrado) puede ubicarse entre la cadena principal y un dominio de unión a la diana, o dentro de la cadena principal. El motivo escindible permite la liberación de un oligonucleótido señal de una proteína o ácido nucleico diana unido; después, el oligonucleótido señal se recolecta y se detecta.

40 **Figura 2:** Muestra un primer tipo de sonda que puede unirse directamente a un ácido nucleico diana (parte superior). En la imagen siguiente, la sonda se ha unido al ácido nucleico diana, que se muestra como una línea curvilínea azul. En esta figura y en figuras posteriores, una sonda informadora incluye seis posiciones hibridadas con oligonucleótidos marcados (identificados por un círculo coloreado). Dado que la sonda comprende posiciones que pueden hibridarse con oligonucleótidos marcados, la sonda también puede denominarse sonda informadora.

45 **Figura 3:** Muestra un primer tipo de composición de sonda dual de la presente descripción. Aquí, el primer tipo de sonda se une directamente a un ácido nucleico diana, y una sonda de captura del primer tipo se une directamente al ácido nucleico diana. La sonda de captura puede incluir al menos un reactivo de afinidad, que se muestra como un asterisco. El ácido nucleico diana en una muestra se muestra como una línea curvilínea azul.

50 **Figura 4:** Muestra un segundo tipo de sonda (o sonda informadora) que puede unirse indirectamente a un ácido nucleico diana en una muestra (parte superior). Aquí, el diana de la sonda es un oligonucleótido intermedio, que se muestra en verde, que a su vez se une al ácido nucleico diana en una muestra, que se muestra como una línea curvilínea azul en la imagen inferior. Se podría decir que el oligonucleótido intermedio es una sonda, como se define aquí, ya que comprende una cadena principal de ácido nucleico y es capaz de unirse a un ácido nucleico diana.

60 **Figura 5:** Muestra un segundo tipo de composición de sonda dual de la presente descripción. Aquí, el segundo tipo de sonda se une indirectamente a un ácido nucleico diana en una muestra (a través de un oligonucleótido intermedio, que se muestra en verde), y una sonda de captura del segundo tipo se une indirectamente al ácido nucleico diana en la muestra (a través de otro oligonucleótido intermedio, que se muestra en naranja). La sonda de captura puede incluir al menos un reactivo de afinidad, que se muestra como un asterisco.

65 **Figura 6:** Muestra la liberación de oligonucleótidos señal desde sondas del segundo tipo (ilustradas en la Figura 4) que se unen indirectamente a un ácido nucleico diana en una muestra. La ubicación de un motivo

escindible dentro de una sonda (o en una sonda informadora) afecta qué material se incluye con un oligonucleótido señal liberado.

Figura 7: Muestra tres tipos de sondas usadas para detectar proteínas. En la configuración superior, una sonda comprende un ácido nucleico unido a un dominio de unión a proteínas; en esta configuración, se puede incluir un motivo escindible (por ejemplo, un enlazador escindible, no mostrado) entre el ácido nucleico y el dominio de unión a proteínas, o dentro del propio ácido nucleico. En la configuración central, un dominio de unión a proteínas está unido a un ácido nucleico, y una sonda se hibrida con el ácido nucleico. La sonda (que comprende el dominio de unión a la diana y el ácido nucleico unido al dominio de unión a proteínas (que se muestra en verde)) puede unirse mediante una sonda antes o después de que el dominio de unión a la diana se una a una diana proteica (como se muestra en la Figura 8). Se puede incluir un motivo escindible en cualquiera o en ambos de la cadena principal o del ácido nucleico unido al dominio de unión a proteínas. La sonda del primer o segundo tipo mostrada en las Figuras 2 y 4 se puede usar en esta configuración para detectar una proteína. En la configuración de la parte inferior, un dominio de unión a proteínas está unido a un ácido nucleico, y un oligonucleótido intermedio (que se muestra en rojo) se hibrida tanto con una sonda como con el ácido nucleico unido al dominio de unión a proteínas. La sonda del primer o segundo tipo mostrada en las Figuras 2 y 4 se puede usar en esta configuración para detectar una proteína.

Figura 8: Muestra las sondas central e inferior de la Figura 7. Las dos imágenes de la parte superior muestran la sonda antes y después de unirse a una proteína. La siguiente imagen muestra la sonda después de que se haya escindido su motivo escindible; en esta imagen, el motivo escindible se encuentra entre el ácido nucleico y el dominio de unión a la diana. Una vez liberado el ácido nucleico, se puede considerar un oligonucleótido señal. En la imagen de la parte inferior, el oligonucleótido señal (ácido nucleico liberado de la sonda) está unido por una sonda informadora (por ejemplo, como se muestra en las Figuras 2 y 4).

La **Figura 9** muestra la liberación de oligonucleótidos señal desde una sonda de la configuración central mostrada en la Figura 7 y las sondas de la Figura 8. La ubicación de un motivo escindible dentro de una sonda (o en una sonda informadora) afecta qué material se incluye con un oligonucleótido señal liberado.

Figura 10: Muestra las etapas de un método de la presente descripción en el que se detectan oligonucleótidos señal de una región de interés (ROI).

Figura 11: Muestra las etapas de un método de la presente descripción en el que las regiones de interés se ubican en una primera sección en serie de una muestra de tejido, y se aplican sondas a una segunda sección en serie de la muestra de tejido. Los oligonucleótidos señal se liberan y se recolectan de sondas unidas a dianas en una primera región de interés de la segunda sección en serie. Después, los oligonucleótidos señal se liberan y se recolectan de las sondas unidas a dianas en una segunda (hasta la enésima) región de interés de la segunda sección en serie.

Figura 12: Muestra la detección multiplexada de una pluralidad de ácidos nucleicos y/o proteínas diana de una primera región de interés seguida de la detección multiplexada de la pluralidad de ácidos nucleicos y/o proteínas diana de una segunda región de interés.

Figura 13: Ilustra las etapas en los métodos de la presente descripción. El método mostrado puede denominarse aquí "Inmunohistoquímica (IHC) Digital Multiplexada nCounter®".

Figura 14: Es un diagrama de flujo que demuestra el flujo de trabajo simplificado y la mayor capacidad de multiplexación con IHC multiplexada digital nCounter® (parte superior) en comparación con la IHC multiplexada estándar basado en TSA (parte inferior).

Figura 15: Son fotografías que muestran un dispositivo de espejo digital (DMD) conectado a un microscopio Ti-E (parte superior), y una imagen de campo claro de una sección de tejido FFPE (parte inferior). La iluminación luminosa (puntos blancos) sobre el tejido FFPE (imagen de campo claro) muestra múltiples ROI de alrededor de -10-20 µm de tamaño, es decir, el tamaño de una sola célula.

Figura 16: Ilustra los componentes y trayectorias de luz involucrados con la presente invención cuando el método incluye el uso de un dispositivo de espejo digital (DMD). Iluminación de campo amplio con el DMD enfocado en la muestra. El LED proporciona suficiente iluminación para excitar todo el campo de visión a la vez y con una iluminación de una sola célula, de modo que ~80-600 píxeles DMD iluminen una célula de 10 µm de diámetro. Un DMD de grado normal proporcionará suficiente resolución unicelular. DS: Espejo dicroico, FW: Rueda de filtros, y DMD: Dispositivo de espejo digital.

Figura 17: Ilustra los componentes y trayectorias de luz implicados con la presente invención cuando el método incluye el uso de un dispositivo de barrido láser (por ejemplo, un dispositivo de barrido confocal). En una configuración de barrido confocal, los espejos galvo dirigen la luz. Este método requiere un láser económico de 405 nm. DS: Espejo dicroico, FW: Rueda de filtros, y MM: Espejo motorizado.

5

Figura 18: Muestra una microfotografía que establece la morfología general del tejido de una muestra de amígdalas de la que se obtuvieron imágenes inicialmente usando fluorescencia de dos colores de Ki-67 (marcador de proliferación celular; en verde) y CD3 (marcador de células inmunitarias; en rojo). Doce regiones (incluidas las cuatro regiones ampliadas en la Figura 19) se identifican con cuadros blancos.

10

Figura 19: En la Figura 18 se muestra un gráfico que muestra los recuentos de datos de nCounter® de Ki-67 y CD3 para cuatro regiones. Las imágenes se obtuvieron de secciones en serie (para permitir que se examinaran diversos controles adicionales). En general, se pueden tomar imágenes de las muestras con anticuerpos fluorescentes y después se pueden contar digitalmente (mediante exposición a los rayos UV) usando el mismo portaobjetos. Múltiples dianas analizadas en doce regiones (incluidas las cuatro regiones que se muestran aquí) muestran distintos perfiles de localización de Ki-67 y CD3. Debajo del gráfico hay ampliaciones de las cuatro regiones.

15

Figura 20: Muestra recuentos ejemplares de un cóctel de oligo-anticuerpos 30 plex en las doce regiones de interés (ROI) de la muestra de amígdalas que se muestra en la Figura 18. Los datos se obtuvieron de secciones seriadas (para permitir que se examinaran diversos controles adicionales).

20

Figura 21: Muestra una microfotografía que establece la morfología tisular general de las células T en una muestra de melanoma de un ganglio linfático de la que se obtuvieron imágenes inicialmente usando fluorescencia de tres colores de CD3 (en rojo), CD8 (en verde) y DAPI (en azul). El círculo blanco tiene 25 µm de diámetro y rodea tres células.

25

Figura 22: Muestra datos de nCounter® de la liberación del conjugado CD3 a partir de secciones de tejido de ganglios linfáticos FFPE (5 µm de grosor) en función del área de iluminación UV (de 100 µm a 1 mm de diámetro). El tamaño del diafragma de campo se muestra debajo de la figura.

30

Figura 23: Muestra datos de nCounter® para la liberación del conjugado CD45 de secciones de tejido de ganglios linfáticos FFPE (5 µm de grosor) en función del área de iluminación UV (de 100 µm a 1 mm de diámetro) y del mismo experimento como se muestra en las Figuras 21 y 22.

35

Figura 24: Muestra datos de nCounter® para la liberación del conjugado PD1 a partir de secciones de tejido de ganglios linfáticos FFPE (5 µm de grosor) en función del área de iluminación UV (de 100 µm a 1 mm de diámetro) y del mismo experimento que se muestra en las Figuras 21 a 23.

40

Figura 25: Muestra una micromatriz de tejido (TMA; panel izquierdo) de tejido tumoral de mama que contiene niveles variables de proteína Her2, como se muestra en la microfotografía (panel central), que identifica la fluorescencia de Her2 mediante tinción IHC. El panel derecho muestra una ampliación de una única región del panel central.

45

Figura 26: Muestra datos de recuentos de nCounter® para cuarenta y ocho regiones representativas en frente al estado de Her2 (normas ASCO-CAP).

50

Figura 27: Representa gráficamente los recuentos de nCounter® frente a la suma de intensidades de píxeles ($\times 10^3$) para las cuarenta y ocho regiones mencionadas con respecto a la Figura 26.

Figura 28: Es una microfotografía que establece la morfología general del tejido de una muestra de melanoma de la que se obtuvieron inicialmente imágenes usando fluorescencia de dos colores de CD3 (en rojo) y DAPI (en azul). Diez regiones ejemplares están identificadas con cuadros blancos.

55

Figura 29: Muestra recuentos ejemplares de un cóctel de oligo-anticuerpos 30 plex en las diez regiones de interés (ROI) de la muestra que se muestra en la Figura 28.

60

Figura 30A y Figura 30B: Son microfotografías que muestran iluminación UV usando un dispositivo de espejo digital (DMD) de células individuales (en azul) en una muestra de tejido de amígdalas (en verde).

Figuras 31A a 31D: Son microfotografías que muestran iluminación UV usando un dispositivo de espejo digital (DMD) de células individuales (en blanco brillante) en una muestra de tejido de amígdalas. La Figura 31B resalta las células individuales indicadas en la Figura 31A; La Figura 31D resalta la célula individual indicada en la Figura 31C.

65

Figura 32: Muestra las etapas en un ensayo de proteína tisular FFPE resuelta espacialmente. Las etapas son similares a los de un ensayo de detección de ácidos nucleicos salvo que, en el ensayo de detección de ácidos nucleicos, la muestra se une a una sonda que comprende un dominio de unión a la diana de ácido nucleico en lugar de un anticuerpo.

5

Figura 33: Muestra las etapas en un ensayo de proteína tisular FFPE resuelta espacialmente.

Figura 34: Muestra datos de una realización en la que se ilumina un tejido completo o una muestra completa,

por ejemplo con una caja de gel UV estándar, para liberar oligonucleótidos señal previamente unidos a una sonda.

10

Figura 35: Muestra una realización en la que una porción de un tejido o muestra se ilumina, por ejemplo, con un microscopio, es decir, escisión UV bajo microscopio (experimento de valoración de tiempo).

Figura 36: Muestra una realización en la que una porción de un tejido o muestra se ilumina, por ejemplo, con un microscopio, es decir, escisión UV bajo microscopio (experimento de valoración del área de iluminación).

15

Figura 37: Muestra una realización en la que una porción de un tejido o muestra se ilumina, por ejemplo, con un microscopio, es decir, escisión UV bajo microscopio (experimento de valoración del área de iluminación - dianas múltiples).

Figura 38: Muestra una realización en la que primero se identifica una región de interés en un tejido (por ejemplo, una muestra de cáncer de mama) para la expresión de un marcador, y después esta región de interés se ilumina (por ejemplo, con UV) para liberar oligonucleótidos señal a partir de una sonda.

20

Figura 39: Muestra una realización en la que un tejido está embebido en una celda de flujo. Se muestran datos para múltiples fracciones. Al igual que con los datos de la Figura 38, aquí se identifica previamente una región de interés para la expresión de un marcador marcado fluorescentemente. También se muestran fotografías y un esquema que muestra la configuración del aparato.

25

Figura 40: Muestra una realización en la que un tejido está embebido en una celda de flujo con pequeños orificios. También se muestran fotografías y un esquema que muestra la configuración del aparato.

30

Figuras 41A a 41C: Muestran realizaciones que usan una celda de flujo con orificios pequeños tienen una mejora significativa de la señal a ruido en lugar de la recolección de eluato de toda la superficie del tejido. También se muestran fotografías y un esquema que muestra la configuración del aparato.

35

Figuras 42A a 42C: Muestran datos en las realizaciones que usan una celda de flujo con orificios pequeños (formatos de 12 o 96 orificios).

Figuras 43A y B: Muestran datos al comparar la señal de fondo de las celdas de flujo en las que se realizó la elución de todo el tejido (Figura 43A) y la señal de fondo de las celdas de flujo en las que la elución se produjo directamente encima de una región de interés (Figura 43B).

40

Figura 44: Es un esquema que muestra la recolección de eluyentes con una superficie abierta para una realización de aspiración de múltiples regiones de interés. Aquí se muestra una matriz de múltiples tubos para aspiración/dispensación de eluyentes con selección de válvula giratoria.

45

Figura 45: Incluye fotografías y un esquema que muestra una realización en la que la recolección de eluyente se realiza a través de un capilar (microaspirador).

Figuras 46A y B: Muestran datos de la realización de la Figura 45 en la que la recolección de eluyente se realiza a través de un capilar (microaspirador).

50

Figura 47: Es un esquema que muestra la recolección de eluyente con una superficie abierta para una realización de aspiración de múltiples regiones de interés o para una sola región de interés. Aquí se muestra una matriz de múltiples tubos que usa pipeteo frente a acción capilar para aspiración/dispensación y un solo tubo/pipeta con posición fija.

55

Figura 48: Es un esquema que muestra la iluminación y la recolección de fluidos a través de un capilar y una lente combinados.

Figura 49: Es un esquema que muestra las etapas en una realización de un ensayo de tejido FFPE resuelto espacialmente que comprende una rejilla de 96 pocillos.

60

Figura 50: Muestra datos de expresión de proteínas obtenidos de una sola célula o dos células usando los métodos y aparatos aquí descritos.

65

Figura 51: Identifica regiones de interés ubicadas en secciones seriadas de una única muestra de tumor.

Figura 52: Muestra los conteos obtenidos para seis de las nueve sondas de ARN incluidas en el ensayo del Ejemplo 16.

Figura 53: Muestra los promedios y desviaciones estándar de los conteos que se muestran en la Figura 52.

Figura 54: Muestra datos de expresión de ARN y datos de proteínas para sondas que se hibridaron simultáneamente con códigos de barras moleculares nCounter® y se contaron digitalmente mediante un sistema nCounter® de NanoString Technologies®.

Figura 55: Muestra datos de expresión de ARN obtenidos a partir de sondas de ADN monocatenario y sondas de ADN parcialmente bicatenario.

Figura 56: Muestra datos de expresión de ARN obtenidos a partir de sondas hibridadas en presencia de ADN de esperma de salmón.

Figura 57: Muestra datos de expresión de ARN de una sonda específica de PSA (antígeno específico de la próstata).

Figura 58: Muestra que la especificidad de las sondas aumenta en concentraciones sub-nM no estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente descripción se basa en parte en sondas, composiciones, métodos y kits para la detección y cuantificación simultánea y multiplexada de la expresión de proteínas y/o ácidos nucleicos en una región de un tejido definida por el usuario, célula definida por el usuario, y/o estructura subcelular definida por el usuario dentro de una célula.

La presente descripción proporciona una comparación de la identidad y abundancia de proteínas diana y/o ácidos nucleicos diana presentes en una primera región de interés (por ejemplo, tipo de tejido, una célula (incluyendo células normales y anormales) y una estructura subcelular dentro de una célula) y la identidad y abundancia de proteínas diana y/o ácidos nucleicos diana presentes en una segunda región de interés. No existe un límite superior predefinido para el número de regiones de interés y comparaciones que se pueden realizar; el límite superior se relaciona con el tamaño de la región de interés en relación con el tamaño de la muestra. Por ejemplo, cuando una sola célula representa una región de interés, entonces una sección puede tener de cientos a miles de regiones de interés; sin embargo, si una sección de tejido incluye sólo dos tipos de células, entonces la sección puede tener sólo dos regiones de interés (cada una de las cuales incluye sólo un tipo de célula).

La presente descripción proporciona un mayor grado de multiplexación del que es posible con métodos inmunohistoquímicos o de hibridación *in situ* estándar. Los métodos inmunohistoquímicos estándar permiten la detección simultánea máxima de seis a diez dianas proteicas, siendo más típico tres o cuatro dianas proteicas. De manera similar, los métodos de hibridación *in situ* se limitan a la detección simultánea de menos de diez dianas de ácido nucleico. La presente descripción proporciona la detección de grandes combinaciones de dianas de ácido nucleico y/o dianas proteicas de una región definida de una muestra. La presente descripción proporciona un aumento en las medidas objetivas mediante cuantificación digital y una mayor confiabilidad y consistencia, permitiendo así la comparación de resultados entre múltiples centros.

Las sondas de la presente descripción pueden tener cadenas principales de ácido nucleico (ADN o ARN monocatenario) que tienen posiciones definidas capaces de hibridarse (unidas no covalentemente) con al menos un oligonucleótido marcado. Véase, Figura 1. Tales sondas (que tienen posiciones definidas capaces de hibridarse con al menos un oligonucleótido marcado también se denominan aquí sondas informadoras. El número de posiciones en la cadena principal de una sonda informadora oscila de 1 a 100 o más. En realizaciones, el número de posiciones oscila de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 15, 20, 30, 40 o 50, o cualquier intervalo intermedio. De hecho, el número de posiciones (para detectar un ácido nucleico diana y/o para detectar una proteína diana) en una cadena principal no tiene límite, ya que la manipulación mediante ingeniería de dicha cadena principal está dentro de la capacidad de un experto en la técnica. El número de ácidos nucleicos y/o proteínas diana detectables por un conjunto de sondas depende del número de posiciones incluidas en las cadenas principales de las sondas.

Como se usa aquí, un oligonucleótido marcado se refiere a un segmento de ARN que incluye un marcador detectable o un oligonucleótido de ADN que incluye un marcador detectable.

Una posición de una cadena principal de ácido nucleico puede hibridarse (unida no covalentemente) con al menos un oligonucleótido marcado. Alternativamente, una posición puede hibridarse con al menos un oligonucleótido que carece de un marcador detectable. Cada posición puede hibridarse con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 a 100 oligonucleótidos marcados (o no marcados), o más. El número de oligonucleótidos marcados hibridados con cada posición depende de la longitud de la posición y del tamaño de los oligonucleótidos. Una posición

5 puede tener una longitud de alrededor de 300 a alrededor de 1500 nucleótidos. Las longitudes de los oligonucleótidos marcados (o no marcados) varían de alrededor de 20 a alrededor de 1500 nucleótidos de longitud. En realizaciones, las longitudes de los oligonucleótidos marcados (o no marcados) varían de alrededor de 800 a alrededor de 1300 ribonucleótidos. En otras realizaciones, las longitudes de los oligonucleótidos marcados (o no marcados) varían de alrededor de 20 a alrededor de 55 desoxirribonucleótidos; tales oligonucleótidos están diseñados para tener temperaturas de fusión/hibridación de entre alrededor de 65 y alrededor de 85°C, por ejemplo alrededor de 80°C. Por ejemplo, una posición de alrededor de 1100 nucleótidos de longitud puede hibridarse con entre alrededor de 25 y alrededor de 45 oligonucleótidos, comprendiendo cada oligonucleótido alrededor de 45 a alrededor de 25 desoxirribonucleótidos de longitud. En realizaciones, cada posición se hibrida con alrededor de 34 oligonucleótidos marcados de alrededor de 33 desoxirribonucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos marcados son preferiblemente ADN monocatenario.

10 15 Cada oligonucleótido marcado puede marcarse con uno o más monómeros marcadores detectables. El marcador puede estar en un extremo de un oligonucleótido, en un punto dentro de un oligonucleótido, o en una combinación de los mismos. Los oligonucleótidos pueden comprender nucleótidos con modificaciones de amina, que permiten el acoplamiento de un marcador detectable al nucleótido.

20 25 Los oligonucleótidos marcados de la presente descripción se pueden marcar con cualquiera de una variedad de monómeros marcadores, tales como un fluorocromo, punto cuántico, colorante, enzima, nanopartícula, marcador quimioluminiscente, biotina, u otro monómero conocido en la técnica que se puede detectar directamente (por ejemplo, mediante emisión de luz) o indirectamente (por ejemplo, mediante unión de un anticuerpo marcado fluorescentemente). Ejemplos preferidos de un marcador que puede utilizarse mediante la descripción son fluoróforos. Se pueden usar varios fluoróforos como monómeros marcadores para marcar nucleótidos, incluidos, pero no limitados a, proteínas relacionadas con GFP, colorantes de cianina, fluoresceína, rodamina, ALEXA Flour™, Texas Red, FAM, JOE, TAMRA, y ROX. Se conocen varios fluoróforos diferentes, y se siguen produciendo más, que abarcan todo el espectro.

30 Los marcadores asociados con cada posición (mediante hibridación de una posición con un oligonucleótido marcado) son espacialmente separables y espectralmente resolubles de los marcadores de una posición anterior o posterior. Una serie ordenada de marcadores espacialmente separables y espectralmente resolubles de una sonda se denomina aquí código de barras o un código de marcador. El código de barras o código de marcador permite la identificación de un ácido nucleico diana o una proteína diana que ha sido unida por una sonda particular.

35 40 Los oligonucleótidos marcados se hibridan con sus posiciones bajo una reacción de hibridación estándar, por ejemplo 65°C, 5xSSPE; esto permite sondas informadoras o sondas autoensamblables. Las sondas que usan moléculas de ARN más largas como oligonucleótidos marcados (por ejemplo, como se describe en el documento US2003/0013091) deben ensamblarse previamente en un sitio de fabricación en lugar de hacerlo por un usuario final, y a temperaturas más altas para evitar la reticulación de múltiples cadenas principales a través de las moléculas de ARN más largas; las etapas de preensamblaje van seguidas de una purificación para eliminar el exceso de moléculas de ARN sin hibridar, que aumentan el fondo. El uso del oligonucleótido monocatenario corto marcado (por ejemplo, que comprende desoxirribonucleótidos) simplifica enormemente la fabricación de las sondas y reduce los costes asociados con su fabricación.

45 50 En realizaciones, las sondas se proporcionan a una muestra en concentraciones típicamente menores que las usadas para inmunohistoquímica (IHC) o para hibridación *in situ* (ISH). Alternativamente, la concentración puede ser significativamente menor que la usada para IHC o ISH. Por ejemplo, la concentración de la sonda puede ser 2 veces menos, 5 veces menos, 10 veces menos, 20 veces menos, 25 veces menos, 30 veces menos, 50 veces menos, 60 veces menos, 70 veces menos, 80 veces menos, 90 veces menos, 100 veces menos, 200 veces menos, 300 veces menos, 400 veces menos, 500 veces menos, 600 veces menos, 700 veces menos, 800 veces menos, 900 veces menos, 1000 veces menos, 2000 veces menos, o menos, y cualquier número intermedio. En realizaciones, las sondas se proporcionan en una concentración de 100 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM, 0,01 nM, y menos, y cualquier concentración intermedia.

55 Las sondas se pueden detectar y cuantificar usando cartuchos, software y sistemas comercialmente disponibles, por ejemplo el sistema nCounter® que usa el cartucho nCounter®.

60 65 El ruido de fondo, durante la detección de proteínas, se puede reducir llevando a cabo una purificación negativa de la molécula sonda intacta. Esto se puede hacer realizando una purificación por afinidad del anticuerpo o del enlazador fotoescindible después de la recolección del eluato de una región de interés. Normalmente, los oligonucleótidos señal liberados no se extraerán de la disolución. Para esta etapa, se puede emplear un mecanismo de proteína G u O en la punta de una pipeta, tubo, o placa. Tales dispositivos y reactivos están comercialmente disponibles.

65 El ruido de fondo, durante la detección de ácidos nucleicos, se puede reducir llevando a cabo una purificación negativa de la molécula sonda intacta. Esto se puede hacer realizando una purificación por afinidad del dominio de unión a la diana o del enlazador fotoescindible después de la recolección del eluato de una región de interés. Normalmente, los

oligonucleótidos señal liberados no se extraerán de la disolución. Para ayudar en la purificación negativa, se puede incluir en una sonda una secuencia de purificación universal, por ejemplo en el dominio de unión a la diana.

- 5 La Figura 1 muestra dos sondas ejemplares que incluyen una cadena principal de ácido nucleico monocatenario y un dominio de unión a la diana, que se muestra en rojo. La sonda de la parte superior incluye segmentos de ARN marcados hibridados con posiciones en la cadena principal, mientras que la sonda de la parte inferior incluye oligonucleótidos de ADN marcados hibridados con posiciones en la cadena principal de ácido nucleico. Los colores que se muestran en la Figura 1, y en otras partes de esta descripción, no son limitativos; en las sondas de la presente descripción se pueden usar otros marcadores coloreados y otros marcadores detectables conocidos en la técnica.
- 10 Las sondas de la presente descripción se pueden usar para detectar un ácido nucleico diana. Las Figuras 2 y 4 ilustran este aspecto. Tal sonda incluye al menos una cadena principal y una región de unión a ácido nucleico diana. La región de unión a ácido nucleico diana tiene preferiblemente al menos 15 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente tiene al menos 20 nucleótidos de longitud. En realizaciones específicas, la región de unión a ácido nucleico diana tiene aproximadamente 10 a 500, 20 a 400, 25, 30 a 300, 35, 40 a 200, o 50 a 100 nucleótidos de longitud. Se han descrito 15 sondas y métodos para unir e identificar un ácido nucleico diana, por ejemplo en los documentos US2003/0013091, US2007/0166708, US2010/0015607, US2010/0261026, US2010/0262374, US2010/0112710, US2010/0047924, y US2014/0371088,
- 20 Una proteína diana puede ser una proteína intacta, una pluralidad de polipéptidos, un polipéptido, o un péptido.
- Las sondas de la presente descripción se pueden usar para hibridarlas directamente con un ácido nucleico diana. La Figura 2 ilustra una sonda (o composición) de esta realización. Las sondas incluyen un dominio de unión a ácido nucleico diana, que se muestra en rojo. El ácido nucleico diana se muestra como una línea curvilínea azul. La Figura 3 ilustra una composición de sonda dual que incluye la sonda de la Figura 2 y una sonda de captura. La sonda de captura comprende al menos un reactivo de afinidad, mostrado como un asterisco. El al menos un resto de afinidad puede unirse a la sonda de captura por medios covalentes o no covalentes. En la técnica se conocen diversos restos de afinidad apropiados para la purificación y/o la inmovilización. Preferiblemente, el resto de afinidad es biotina, avidina, o estreptavidina. Otras etiquetas de afinidad son reconocidas por parejas de unión específicas, y por lo tanto facilitan 25 el aislamiento y la inmovilización mediante la unión por afinidad a la pareja de unión, que puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. En estas figuras, cada sonda incluye seis posiciones hibridadas con oligonucleótidos marcados, cada posición está identificada por un círculo coloreado.
- 30 Cualquier sonda de la presente descripción puede comprender un resto de afinidad.
- 35 Las sondas de la presente descripción se pueden usar para hibridarlas indirectamente con un ácido nucleico diana presente en una muestra (a través de un oligonucleótido intermedio). La Figura 4 ilustra una sonda (o composición) de esta realización. Las sondas incluyen un dominio de unión a ácido nucleico diana, mostrado en rojo, que se une a un oligonucleótido sintético (el oligonucleótido intermedio; mostrado en verde), que a su vez se une a un ácido nucleico 40 diana en una muestra biológica. Se podría decir que el oligonucleótido intermedio es una sonda, como se define aquí, ya que comprende una cadena principal de ácido nucleico y es capaz de unirse a un ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana presente en una muestra biológica se muestra como una línea curvilínea azul. La Figura 5 ilustra una composición de sonda dual que incluye la sonda de la Figura 4 y una sonda de captura. En estas realizaciones, la región de unión a ácido nucleico diana de una sonda se hibrida con una región de un oligonucleótido intermedio (es decir, un oligonucleótido sintético) que es diferente del ácido nucleico diana presente en una muestra. Por tanto, la 45 región de unión a la diana de la sonda es independiente del ácido nucleico diana final en la muestra. Esto permite una flexibilidad económica y rápida en el diseño de un ensayo, ya que los componentes específicos de la diana (presentes en una muestra) del ensayo se incluyen en oligonucleótidos de ADN sintéticos económicos y ampliamente disponibles en lugar de las sondas más caras. Tales oligonucleótidos sintéticos se diseñan simplemente incluyendo una región que 50 se hibrida con el ácido nucleico diana presente en una muestra, y una región que se hibrida con una sonda. Por lo tanto, se puede usar un único conjunto de sondas de unión indirecta para detectar una variedad infinita de ácidos nucleicos diana (presentes en una muestra) en diferentes experimentos simplemente reemplazando la porción de oligonucleótido (sintético) específica de la diana del ensayo.
- 55 Una sonda o sonda de la presente descripción puede incluir una región que permita la liberación de un oligonucleótido señal después de la aplicación de una fuerza adecuada. En un ejemplo no limitado, la región es un motivo escindible (por ejemplo, un sitio de enzima de restricción o un enlazador escindible). El motivo escindible permite la liberación de un oligonucleótido señal de una proteína o ácido nucleico diana unido, y después el oligonucleótido señal se recolecta y se detecta. Como se usa aquí, un oligonucleótido señal es una región de una sonda que actualmente tiene posiciones 60 hibridadas con al menos un oligonucleótido marcado, o es una región de una sonda (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico) que puede liberarse del dominio de unión a la diana de la sonda. Se afirma que un oligonucleótido señal es liberable cuando puede separarse (es decir, escindirse y liberarse) del resto de la sonda. Ejemplos de motivos escindibles incluyen, pero no se limitan a, enlazadores fotoescindibles.
- 65 En una sonda de la presente descripción (como se describe aquí), el motivo escindible puede ubicarse entre un ácido nucleico y un dominio de unión a la diana, la cadena principal y un dominio de unión a la diana, o dentro de la cadena

principal. En la Figura 6, se pueden inferir opciones no limitativas para la posición de un motivo escindible a partir de espacios dentro de una sonda o un espacio dentro de un oligonucleótido intermedio.

- 5 Las sondas de la presente descripción se pueden usar para detectar una proteína diana. La Figura 7 ilustra sondas (o composiciones) de esta realización. Tales sondas incluyen al menos una cadena principal y una región de unión a proteínas diana. En las sondas de la presente descripción dirigidas contra proteínas, un oligonucleótido señal puede ser el ácido nucleico unido al dominio de unión a proteínas. En estas sondas, el oligonucleótido señal es dirigido y unido por una sonda que comprende posiciones para hibridarla con oligonucleótidos marcados. Una sonda de este tipo se muestra en la Figura 7, imagen central. Allí, el oligonucleótido señal se ve como una línea verde. La sonda puede estar unida por una sonda antes de que la sonda (a través de su dominio de unión a proteínas) se una a una proteína, o después de que se una a la proteína. No es necesario que el oligonucleótido señal esté unido por la sonda hasta que ya haya sido liberado del dominio de unión a la diana (esta realización no se muestra).
- 10 La región de una sonda capaz de unirse a una proteína diana incluye moléculas o conjuntos que están diseñados para unirse con al menos una proteína diana, al menos una proteína sustituta de proteína diana, o ambas, y en condiciones apropiadas, pueden formar un complejo molecular que comprende la sonda proteica y la proteína diana. La región capaz de unirse a una proteína diana incluye un anticuerpo, un péptido, un aptámero, o un peptoide. El anticuerpo se puede obtener de una variedad de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo monoespecífico, anticuerpo expresado de forma recombinante, anticuerpo humanizado, planticuerpos, y similares. Los términos proteína, polipéptido, péptido, y secuencia de aminoácidos se usan indistintamente aquí para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos o por aminoácidos sintéticos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado, por ejemplo, mediante formación de enlaces de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente marcador. Como se usa aquí, el término aminoácido se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluidos, pero sin limitarse a, glicina y los isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Se han descrito sondas y métodos para unir e identificar una proteína diana, por ejemplo en el documento US2011/0086774.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- En realizaciones, una sonda se prepara mediante un método de bioconjugación de cisteína que es estable, específico del sitio, preferiblemente, para la cadena pesada de la región bisagra del anticuerpo. Este método de preparación proporciona relaciones estequiométricas relativamente controlables entre oligonucleótidos marcados y anticuerpos. Una sonda puede comprender una pluralidad (es decir, más de uno, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) oligonucleótidos marcados por anticuerpo. Generalmente, las sondas "más pesadas", que comprenden 3 o 4 oligonucleótidos marcados por anticuerpo, son significativamente menos sensibles que los anticuerpos que carecen de un oligonucleótido marcado o sondas "más ligeras", que comprenden 1 o 2 oligonucleótidos marcados por anticuerpo.
- Las sondas dirigidas contra proteínas y las sondas dirigidas contra ácidos nucleicos pueden aplicarse simultáneamente siempre que las condiciones permitan la unión tanto de una diana proteica como de una diana de ácido nucleico. Alternativamente, pueden aplicarse secuencialmente sondas dirigidas contra proteínas y sondas dirigidas contra ácidos nucleicos cuando no son posibles las condiciones que permitan la unión tanto de una diana proteica como de una diana de ácido nucleico.
- Un conjunto de sondas es sinónimo de una composición de sondas. Un conjunto de sondas incluye al menos una especie de sondas, es decir, dirigidas contra una diana. Un conjunto de sondas incluye preferiblemente al menos dos, por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más especies de sondas. Un conjunto de sondas puede incluir una o múltiples copias de cada especie de sonda.
- Sólo se puede aplicar un primer conjunto de sondas a una muestra. Como alternativa, posteriormente se puede aplicar a la muestra un segundo conjunto (o un número mayor) de sondas. El primer conjunto y el segundo (o número superior) pueden dirigirse únicamente contra ácidos nucleicos, únicamente contra proteínas, o contra una combinación de los mismos.
- En la presente descripción, se detectan dos o más dianas (es decir, proteínas, ácidos nucleicos, o una combinación de los mismos); se detectan 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más dianas, y cualquier número intermedio.
- Puede predefinirse un conjunto de sondas en base al tipo de célula o tipo de tejido contra el que se dirigirá. Por ejemplo, si el tejido es un cáncer de mama, entonces el conjunto de sondas incluirá sondas dirigidas contra proteínas relevantes para las células de cáncer de mama (por ejemplo, Her2, EGFR y PR) y/o sondas dirigidas contra proteínas relevantes para los tejidos mamarios normales. Además, el conjunto de sondas puede predefinirse en base al estado de desarrollo de una célula o tejido contra el que se dirigirá. Alternativamente, el conjunto de sondas puede predefinirse basándose en localizaciones subcelulares de interés, por ejemplo núcleo, citoplasma, y membrana. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra Foxp3, Histona H3 o P-S6 marcan el núcleo, los anticuerpos dirigidos contra CD3, CD4, PD-1 o CD45RO marcan el citoplasma, y los anticuerpos dirigidos contra PD-L1 marcan las membranas.

Una sonda puede sintetizarse químicamente o puede producirse biológicamente usando un vector en el que se ha clonado un ácido nucleico que codifica la sonda.

- 5 Cualquier sonda o conjunto de sondas descritas aquí se puede usar en métodos y kits de la presente descripción. Para las sondas descritas aquí, la asociación del código de etiqueta con el ácido nucleico diana o la proteína diana no está fijada.
- 10 Las sondas de la presente descripción se pueden usar para detectar un ácido nucleico o una proteína diana presente en cualquier muestra, por ejemplo una muestra biológica. Como apreciarán los expertos en la técnica, la muestra puede comprender cualquier número de elementos, incluidos, pero sin limitarse a: células (incluidas tanto células primarias como líneas celulares cultivadas) y tejidos (incluidos cultivados o explantados). En realizaciones, una muestra de tejido (fijada o no fijada) se embebe, se secciona en serie, y se inmoviliza en un portaobjetos de microscopio. Como es bien sabido, un par de secciones en serie incluirán al menos una célula que está presente en ambas secciones en serie. Las estructuras y tipos de células, ubicadas en una primera sección en serie, tendrán una ubicación similar en una sección en serie adyacente. La muestra puede ser células cultivadas o células disociadas (fijadas o no fijadas) que han sido inmovilizadas en un portaobjetos.
- 20 En realizaciones, una muestra de tejido es un tumor al que se le ha realizado una biopsia o una porción del mismo, es decir, una muestra de tejido clínicamente relevante. Por ejemplo, el tumor puede deberse a un cáncer de mama. La muestra puede ser un ganglio linfático extirpado.
- 25 La muestra se puede obtener de prácticamente cualquier organismo, incluidos organismos multicelulares, por ejemplo de los reinos vegetal, fúngico y animal; preferiblemente, la muestra se obtiene de un animal, por ejemplo un mamífero. Son particularmente preferidas las muestras humanas.
- 30 En algunas realizaciones, las sondas, composiciones, métodos y kits descritos aquí se usan en el diagnóstico de una afección. Como se usa aquí, el término diagnosticar o diagnóstico de una afección incluye predecir o diagnosticar la afección, determinar la predisposición a la afección, monitorizar el tratamiento de la afección, diagnosticar una respuesta terapéutica de la enfermedad, y el pronóstico de la afección, la progresión de la afección, y la respuesta al tratamiento particular de la afección. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede analizar según cualquiera de las sondas, métodos o kits descritos aquí para determinar la presencia y/o cantidad de marcadores de una enfermedad o tipo de célula maligna en la muestra (con respecto a la condición no enferma), diagnosticando o estadificando así una enfermedad o un cáncer.
- 35 En general, primero se pueden obtener imágenes de las muestras adheridas a un portaobjetos usando fluorescencia (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes o tinciones fluorescentes (por ejemplo, DAPI)) para identificar morfología, regiones de interés, tipos de células de interés, y células individuales, y después se puede contar digitalmente la expresión de proteínas y/o ácidos nucleicos a partir de la muestra en el mismo portaobjetos.
- 40 Las composiciones y kits de la presente descripción pueden incluir sondas y otros reactivos, por ejemplo amortiguadores y otros reactivos conocidos en la técnica para facilitar la unión de una proteína y/o un ácido nucleico en una muestra, es decir, para llevar a cabo reacciones de hibridación.
- 45 Un kit también incluirá instrucciones para usar los componentes del kit, incluyendo, pero sin limitarse a, información necesaria para hibridar oligonucleótidos marcados con una sonda, para hibridar una sonda con un oligonucleótido específico de la diana, para hibridar un oligonucleótido específico de la diana con un ácido nucleico diana, y/o para hibridar una sonda con una proteína diana.
- 50 Un protocolo ejemplar para detectar ácidos nucleicos diana y/o proteínas diana se describe a continuación y como se muestra en las Figuras 10 a 14 (parte superior).
- 55 Las células (vivas o fijadas) o secciones de tejido (por ejemplo, embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE)) que se preparan según métodos de inmunohistoquímica multiplexada y/o métodos de hibridación in situ de ácidos nucleicos se preparan y se inmovilizan sobre un portaobjetos de vidrio o un soporte sólido adecuado. Se preserva el acceso a la superficie de las células o a la sección del tejido, lo que permite el intercambio fluídico; esto se puede lograr mediante el uso de un sistema de intercambio de reactivos de cámara fluídica (por ejemplo, Grace™ Bio-Labs, Bend OR). Las regiones de interés (ROI) se identifican en la sección en serie a la que se proporcionarán las sondas, o en una sección de serie adyacente. En primera instancia, se realiza una metodología completa de obtención de imágenes con "características macroscópicas" de células/tejidos de interés, por ejemplo tinción DAPI, tinción de membranas, tinción mitocondrial, tinción de epítotos específicos, y tinción de transcritos específicos, para determinar las características macroscópicas generales de la célula/tejido de interés. Alternativamente, las regiones de interés (ROI) se identifican en una sección en serie adyacente a la sección en serie a la que se proporcionarán las sondas; aquí, se realizan imágenes completas de "características macroscópicas" (como se describe anteriormente) en una primera sección en serie (sección #1 en las Figuras 11 y 12). Esta imagen generalmente identificará regiones de interés en la

sección en serie adyacente (línea roja en el panel B en la Figura 10, y óvalo verde y triángulo verde de la sección #2 en las Figuras 11 y 12) en la que los oligonucleótidos señal se liberarán de las sondas con la aplicación de una fuerza adecuada y dirigida. Las secciones en serie pueden estar separadas entre sí aproximadamente 5 µm a 15 µm.

- 5 La Figura 13 y la Figura 14 (arriba) ilustran adicionalmente etapas de la presente descripción. Las etapas que se muestran en la Figura 13 incluyen lo siguiente. (1) Proceso: El tejido FFPE montado en portaobjetos se incuba con un cóctel de anticuerpos primarios conjugados con oligos de ADN mediante un enlazador fotoescindible, junto con un número limitado de reactivos de formación de imágenes de longitud de onda visible. (2) Vista: Las regiones de interés (ROI) se identifican con reactivos formadores de imágenes basados en luz visible en baja plexidad para establecer la "arquitectura" general del corte tumoral (por ejemplo, imagen de núcleos y/o uso de uno o dos biomarcadores tumorales clave). (3) Perfil: Las ROI seleccionadas se escogen para la creación de perfiles multiplex de alta resolución y los oligos de la región seleccionada se liberan después de la exposición a la luz ultravioleta. (4) Colocación en placas: A continuación se recolectan los oligos fotoescindidos libres, por ejemplo mediante una "pajita" basada en microcapilares, y se almacenan en un pocillo de microplaca para su posterior cuantificación. (5) Contar digitalmente: Durante la etapa del conteo digital, los oligos fotoescindidos de las ROIs espacialmente en la microplaca se hibridan con códigos de barras ópticos de 4 colores y 6 puntos, lo que permite realizar hasta ~ 1 millón de conteos digitales de las proteínas diana (distribuidas en marcadores de hasta 800 plex) en una única ROI usando el instrumento de lectura NanoString nCounter® estándar (por ejemplo, SPRINT, Flex, y MAX).
- 10 Una región de interés puede ser un tipo de tejido presente en una muestra, un tipo de célula, una célula, o una estructura subcelular dentro de una célula.
- 15 Se aplica a la sección en serie una composición que comprende un conjunto de sondas, comprendiendo cada sonda un oligonucleótido señal liberable. El conjunto de sondas puede incluir sondas que se dirigen a proteínas, a ácidos nucleicos, o a ambos. La composición puede incluir sondas de captura. Cuando las sondas se unen indirectamente a una diana (proteína y/o ácido nucleico), la composición aplicada incluye oligonucleótidos intermedios. La composición incluirá otros reactivos conocidos en la técnica para facilitar la unión de una proteína y/o un ácido nucleico en una muestra.
- 20

- 30 Las etapas de bloqueo se realizan antes y/o después de aplicar la composición.

Para sondas que incluyen enlazadores fotoescindibles, el soporte sólido (por ejemplo, portaobjetos de microscopio) se coloca en un microscopio que sea capaz de proporcionar luz de excitación a una longitud de onda capaz de escindir el enlazador fotoescindible. Una primera región de interés (línea roja en el panel B en la Figura 10, y ROI_i en las Figuras 11 y 12) se excita con la luz, escindiendo así el enlazador fotoescindible y liberando los oligonucleótidos señal. Como se ilustra en las Figuras 6 y 9, un oligonucleótido señal incluye al menos una región de una sonda que actualmente tiene posiciones unidas con al menos un oligonucleótido marcado o el ácido nucleico de una sonda que está unida o puede estar unida por una sonda informadora. Al dirigir la luz de excitación sólo a ROI_i, los oligonucleótidos señal sólo se liberan desde sondas dentro de ROI_i y no desde sondas ubicadas fuera de ROI_i, que retienen sus oligonucleótidos señal. Por tanto, los oligonucleótidos señal se recolectan sólo para sondas que están unidas a dianas dentro de ROI_i, permitiendo así la detección de las identidades y cantidades de las dianas (proteínas y/o ácidos nucleicos) ubicadas dentro de ROI_i.

45 La superficie de la sección se lava con una pequeña cantidad de amortiguador (~5 a 30 µl), y el eluato (que contiene los oligonucleótidos señal liberados) se recoge en un primer recipiente de muestra (que se muestra como Muestra "i" en la Figura 12). La superficie de la sección se enjuaga adicionalmente para eliminar cualquier oligonucleótido señal liberado que se omitió del eluato.

50 Una segunda región de interés (ROI_j en las Figuras 11 y 12) se excita con luz, escindiendo así el enlazador fotoescindible y liberando los oligonucleótidos señal de la segunda región de interés. Nuevamente, al dirigir luz de excitación sólo a la ROI_j, los oligonucleótidos señal sólo se liberan desde las sondas dentro de la ROI_j y no desde las sondas ubicadas fuera de la ROI_j, que retienen sus oligonucleótidos señal. Por tanto, los oligonucleótidos señal se recolectan sólo para sondas que están unidas a dianas dentro de ROI_j, permitiendo así la detección de las identidades y cantidades de las dianas (proteínas y/o ácidos nucleicos) ubicadas dentro de ROI_j.

55 La superficie de la sección se lava con una pequeña cantidad de amortiguador (~5 a 30 µl), y el eluato (que contiene los oligonucleótidos señal liberados) se recoge en un primer tubo de muestra (que se muestra como Muestra "j" en la Figura 12). La superficie de la sección se enjuaga adicionalmente para eliminar cualquier oligonucleótido señal liberado que se omitió del eluato.

60 La etapa de excitación, la etapa de lavado y la etapa de enjuague se repiten hasta que se hayan recolectado los oligonucleótidos señal de todas las regiones de interés (hasta ROI_n).

65 A continuación se ilustran ventajas, características, y realizaciones adicionales. Como ejemplos, se muestran diversos métodos y dispositivos para recolectar un oligonucleótido señal, y diversas formas de proporcionar una fuerza. Además, los datos proporcionan resultados inesperadamente mejorados obtenidos de ciertas realizaciones de la presente

invención con respecto a otras realizaciones. Se muestran datos que demuestran mejoras de señal a ruido de alrededor de 7 a alrededor de 200 veces.

5 La detección puede usar cualquier dispositivo o sistema de tipo microscopio conocido en la técnica. Un dispositivo o sistema puede incluir iluminación de campo amplio junto con un dispositivo de espejo digital (DMD; véanse las Figuras 15 y 16); las ventajas de esto incluyen costes reducidos, ya que el DMD y el controlador también pueden controlar el LED (que fotoescinde las sondas) y esencialmente no añaden costes adicionales, proporciona facilidad de implementación, permite un tamaño de característica pequeño de ~1 mm que incluirá células de 10-40 mm, y aprovecha los dispositivos electrónicos de consumo disponibles (como proyectores). Un dispositivo o sistema puede incluir un dispositivo de barrido láser, por ejemplo confocal; véase la Figura 16. Una ventaja de esto es que se pueden iluminar y visualizar características morfológicas más pequeñas; sin embargo, estos dispositivos implican costes adicionales.

10 La pluralidad de proteínas diana y/o ácidos nucleicos diana presentes en cada región de interés en una muestra se identifican en cada muestra de eluato usando una reacción de polimerasa, una reacción de transcriptasa inversa, hibridación con una micromatriz de oligonucleótidos, espectrometría de masas, hibridación con una baliza molecular fluorescente, una reacción de secuenciación, o códigos de barras moleculares nCounter®. Los sistemas y métodos 15 nCounter® de NanoString Technologies®, como se describen en US2003/0013091, US2007/0166708, US2010/0015607, US2010/0261026, US2010/0262374, US2010/0112710, US2010/0047924, US2014/0371088, y US2011/0086774, son un medio preferido para identificar proteínas diana y/o ácidos nucleicos diana. Los sistemas y 20 métodos nCounter® de NanoString Technologies® permiten la identificación multiplexada simultánea de una pluralidad (800 o más) de proteínas diana y/o ácidos nucleicos diana distintos.

25 En conjunto, se puede realizar una comparación de la identidad y abundancia de las proteínas diana y/o ácidos nucleicos diana presentes en la primera región de interés (por ejemplo, tipo de tejido, tipo de célula (incluyendo células normales y anormales), y una estructura subcelular dentro de una célula) y la identidad y abundancia de las proteínas diana y/o los ácidos nucleicos diana presentes en la segunda región de interés o más regiones de interés.

30 La presente descripción proporciona detección y comparación multiplexada de hasta 800 proteínas de interés de regiones discretas dentro de un tumor (por ejemplo) y su tejido normal adyacente; permitiendo así la interrogación sistemática del tumor y su microambiente.

35 La presente descripción se puede usar en estudios clínicos en curso para dilucidar nuevas respuestas a inmunoterapias y otras terapias dirigidas.

40 La presente descripción también permite el descubrimiento de biomarcadores inmunológicos en tumores (por ejemplo) que pueden usarse en el desarrollo de diagnósticos complementarios.

45 La inmunohistoquímica es una técnica poderosa para analizar la expresión y localización de proteínas en secciones de tejido FFPE. Sin embargo, adolece de una serie de retos, incluyendo la falta de intervalo dinámico, una cuantificación difícil, y un flujo de trabajo que requiere mucha mano de obra para una multiplexación muy limitada. Se describe aquí una nueva plataforma basada en la tecnología de generación de códigos de barras nCounter® que permite la caracterización digital de proteínas resuelta espacialmente en un ensayo altamente multiplexado (hasta 800 plex), es decir, el ensayo de Inmunohistoquímica (IHC) Digital Multiplexada nCounter®. El ensayo se basa en anticuerpos acoplados a etiquetas de oligonucleótidos fotoescindibles que se liberan de regiones discretas de un tejido usando exposición UV enfocada a través de objetivo (por ejemplo, ~ 365 nm). Las etiquetas escindidas se cuantifican en un ensayo nCounter®, y los conteos se asignan a la ubicación del tejido, lo que produce un perfil digital de abundancia de proteínas resuelto espacialmente. La detección de proteínas se puede llevar a cabo junto con o de manera separada de un ensayo de detección de ácidos nucleicos que usa sondas de ácidos nucleicos que comprenden etiquetas oligonucleotídicas fotoescindibles. Por lo tanto, la presente descripción puede proporcionar un perfil digital de 50 abundancia de proteínas resuelto espacialmente, un perfil digital de abundancia de proteínas y ácidos nucleicos resuelto espacialmente, o un perfil digital de abundancia de ácidos nucleicos resuelto espacialmente.

55 Las ventajas del ensayo incluyen, pero no se limitan a: alta sensibilidad (por ejemplo, ~ 1 a 4 células), conteo totalmente digital, con amplio intervalo dinámico ($> 10^5$), altamente multiplexado (por ejemplo, 30 dianas y escalable, sin cambios en la instrumentación, hasta 800 dianas), flujo de trabajo simple, compatibilidad con FFPE, sin anticuerpos secundarios (para detección de proteínas) ni reactivos de amplificación, y potencial para ensayos clínicos.

60 Como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

65 A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa aquí, se entiende que el término "o" es inclusivo, y cubre tanto "o" como "y".

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa aquí, se entiende que el término "alrededor de" está dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Se puede entender que alrededor de está dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %,

2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, o 0,01 % del valor establecido. A menos que se deduzca claramente del contexto, todos los valores numéricos proporcionados aquí se modifican por la expresión "alrededor de".

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

EJEMPLOS

10 **Ejemplo 1: La presente descripción proporciona un "potencial de codificación de barras" para cuantificar dianas multiplexadas en una sección de tejido FFPE.**

La heterogeneidad intratumoral se ha convertido en un desafío crítico para la implementación de terapias dirigidas. Históricamente, la inmunohistoquímica (IHC) se ha usado para evaluar la heterogeneidad espacial de las proteínas; sin embargo, ha sido difícil cuantificar la abundancia de proteínas en un alto multiplex y en un amplio intervalo dinámico.

15 En este ejemplo, las proteínas en una sección de tejido fijada con formalina embebida en parafina (FFPE) se marcaron con sondas que contenían anticuerpos, que incluían enlazadores fotoescindibles y códigos de barras fluorescentes. Las sondas -en una ROI definida por el usuario de la sección de tejido FFPE- se expusieron posteriormente a luz ultravioleta enfocada, liberando así los oligonucleótidos señal (que comprenden los códigos de barras fluorescentes) de la ROI. Los oligonucleótidos señal liberados se eliminaron por lavado de la muestra FFPE, y se recolectaron. Despues, un sistema nCounter® de NanoString Technologies® reconoció y contó digitalmente los códigos de barras fluorescentes de los oligonucleótidos señal liberados, cuantificando así la abundancia de cada proteína diana en la región espacial definida por el usuario de una sección de tejido. Despues de que se liberaron y recolectaron los oligonucleótidos señal de una primera ROI, la luz UV enfocada se expuso a una segunda ROI definida por el usuario de la sección de tejido FFPE, liberando así los oligonucleótidos señal de la segunda ROI. En este ejemplo no limitativo, se observó un alto grado de linealidad ($0,97 < R^2 < 0,99$) para el número de conteos observados frente al área de iluminación UV, y con una resolución espacial de detección de alrededor de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, o aproximadamente 100 células. Inesperadamente, la presente descripción proporciona un "potencial de obtención de códigos de barras" para cuantificar hasta 800 dianas con 5,5 logaritmos (base 10) de intervalo dinámico en una única sección de tejido FFPE.

30 **Ejemplo 2: La presente descripción proporciona un enfoque práctico y factible para cuantificar la expresión de proteínas sin amplificación de señal y para lograr una multiplexación de antígeno diana de orden superior en una sección de tejido FFPE.**

35 La inmunohistoquímica cuantitativa multiplexada ha surgido como un área de gran interés dentro de la oncología, ya que tiene la capacidad única de identificar la organización espaciotemporal y las interdependencias que definen aún más cómo el bloqueo de los puntos de control afecta el microambiente del tumor. Este ejemplo describe un método de tinción sin amplificación, de una sola etapa, que usa un anticuerpo primario etiquetado con oligo fotoescindible que interactúa con el antígeno diana dentro de una sección de tejido FFPE. Se aplica iluminación con luz ultravioleta (UV), que libera el oligo del anticuerpo, y es seguida de la recolección del eluyente, la cuantificación, y el conteo digital que corresponde a la abundancia del antígeno.

40 Primero, se investigó una variedad de métodos de conjugación; esto estableció un método de bioconjugación de cisteína que es estable, específico del sitio predominantemente para la cadena pesada de la región bisagra, y relativamente controlable en términos de relaciones estequiométricas de oligonucleótidos a anticuerpos.

45 A continuación, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para determinar la relación entre el área de escisión inducida por UV y los conteos de proteínas digitales medidos; a partir de esto se observó un alto grado de linealidad ($0,97 < R^2 < 0,99$), lo que confirma el mecanismo/premisa básico asociado con este método de conteo de proteínas multiplexadas en tejido FFPE.

50 Para determinar el impacto de la presencia de un oligonucleótido conjugado en la interacción anticuerpo-antígeno, se comparó el comportamiento de un anticuerpo conjugado con oligonucleótidos marcados con el anticuerpo no modificado, en condiciones idénticas, en secciones de tejido FFPE, en términos de sensibilidad, especificidad e intensidad de la señal. Se seleccionaron anticuerpos dirigidos contra antígenos localizados en el núcleo, el citoplasma o la membrana, para determinar la relación entre el comportamiento de los anticuerpos y la ubicación subcelular de los antígenos diana. Los anticuerpos seleccionados se dirigieron contra Foxp3, histona H3, P-S6 (antígenos nucleares), CD3, CD4, PD-1, CD45RO (antígenos citoplasmáticos), y PD-L1 (antígeno membranoso). En términos de sensibilidad, en general, se encontró que los anticuerpos conjugados con oligonucleótidos "más pesados" (que tienen 3 o 4 oligonucleótidos marcados por anticuerpo) eran significativamente menos sensibles en comparación con los anticuerpos no conjugados o los anticuerpos conjugados con oligonucleótidos "más ligeros" (que tienen 1 o 2 oligonucleótidos marcados por anticuerpo). No se observaron diferencias significativas entre los anticuerpos no conjugados o conjugados con oligonucleótidos "más ligeros" en términos de sensibilidad, especificidad o intensidad entre los antígenos diana nucleares, citoplasmáticos y membranosos.

La presente descripción proporciona perfiles de proteínas altamente multiplexadas que miden los niveles absolutos de expresión de proteínas usando métodos prácticos y factibles para definir de manera integral el panorama inmunológico en los tumores antes y durante la intervención inmunoterapéutica.

5 **Ejemplo 3: La presente descripción proporciona detección de proteínas multiplexadas y resueltas espacialmente a partir de tejido FFPE**

Métodos

10 Anticuerpos - los anticuerpos usados en este Ejemplo y en los Ejemplos 4 a 6 pueden incluir: "diana (ID de clon, proveedor)": H3 (D1H2, CST), CD8 (OTI3H6, Origene), CD4 (SP35, Spring Bio), FOXP3 (D2W8E, CST), B7-H3 (D9M2L, CST), S6 (54D2, CST), B7-H4 (D1M8L, CST), Granzima B (OTI4E4, Origene), Ki67 (8D5, CST), PD-1 (Nat105, Cell Marque), CD3 (MRQ-39, Cell Marque), Vista (D1L2G, CST), Her2 (29D8, CST), PR (D8Q2J, CST), ER (SP1, Spring Bio), EGFR (D38B1, CST), CD56 (MRQ-42, Cell Marque), PD-L1 (E1L3N, CST), CD45 (2B11&PD7/26, Cell Marque), 15 TIM-3 (D5D5R, CST), y Pan Queratina (C11, CST), CD45RO (UCHL1, Cell Marque).

Microscopía de amígdalas - se montaron secciones de 5 µm de un bloque FFPE de amígdalas (Amsbio) en portaobjetos. La IHC se llevó a cabo usando protocolos estándar. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con una olla a presión. La tinción de la sección de amígdalas se llevó a cabo con el anticuerpo primario anti-CD3 MRQ-39 (mAb de conejo, Cell Marque) y el anticuerpo primario anti-Ki-67 8D5 (mAb de ratón, CST). Las incubaciones secundarias se llevaron a cabo con Cabra a Conejo marcado con Alexa594 (Life Tech.) y con Cabra a Ratón marcado con Alexa488 (Life Tech.).

Aquí, primero se tomaron imágenes de las muestras adheridas a un portaobjetos usando anticuerpos fluorescentes, y 25 después se contó digitalmente la expresión de proteínas a partir de la muestra.

Se usaron etapas similares a las ilustradas en la Figura 10 a la Figura 14 (parte superior). La escisión por UV de las ROI seleccionadas permitió la creación de perfiles digitales completos de 30 plex (conteos nCounter®).

30 **Resultados**

La Figura 18 muestra una microfotografía que establece la morfología general del tejido de una muestra de amígdalas de la que se obtuvieron imágenes inicialmente usando fluorescencia de 2 colores de Ki-67 (marcador de proliferación celular; en verde) y CD3 (marcador de células inmunitarias; en rojo). Múltiples dianas analizadas en doce regiones (incluyendo las cuatro regiones ampliadas en la Figura 19) muestran tres perfiles distintos de localización de Ki-67 y 35 CD3. La Figura 19 muestra los conteos de nCounter® para Ki-67 y CD3 para cuatro regiones que se muestran en la Figura 18. La Figura 20 muestra conteos ejemplares de un cóctel de oligo-anticuerpos de 30 plex en las doce regiones de interés (ROI) de la muestra de amígdalas que se muestra en la Figura 18. Los datos se obtuvieron de secciones seriadas (para permitir que se examinaran diversos controles adicionales). Como se muestra, las regiones de la muestra de tejido se pueden clasificar según la intensidad y la identidad de los marcadores expresados. Clasificaciones ejemplares mostradas: "Enriquecido con CD3", "Enriquecido con Ki67", "Mixto" y "Tejido conjuntivo".

40 Estos datos muestran que la presente descripción proporciona una detección resuelta espacialmente de una pluralidad (aquí, al menos 30) de marcadores de proteínas. Al aumentar el número de sondas proteicas (anticuerpos) usadas, se pueden detectar hasta 800 marcadores proteicos diferentes y con una resolución similar.

45 **Ejemplo 4: La presente descripción proporciona detección de proteínas multiplexadas a partir de tejido FFPE y una aproximación de resolución unicelular**

50 **Métodos**

Microscopía de melanoma - se montaron secciones de 5 µm de un bloque FFPE de melanoma (derivado de ganglios linfáticos) (Asterand) en portaobjetos. La IHC se llevó a cabo usando protocolos estándar. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con una olla a presión.

55 Aquí, primero se tomaron imágenes de las muestras usando fluorescencia, y después se contó digitalmente la expresión de proteínas a partir de la muestra.

60 Se usaron etapas similares a las ilustradas en la Figura 10 a la Figura 14 (parte superior).

65 **Resultados**

La Figura 21 muestra una microfotografía que establece la morfología tisular general de las células T en una muestra de melanoma de ganglio linfático de la que se obtuvieron imágenes inicialmente usando fluorescencia de tres colores de CD3 (en rojo), CD8 (en verde) y DAPI (en azul). El círculo blanco tiene 25 µm de diámetro y rodea tres células.

La Figura 22 muestra datos de nCounter® de la liberación de conjugado CD3 de una sección de tejido de ganglio linfático FFPE (5 µm de grosor) en función del área de iluminación UV (de 100 µm a 1 mm de diámetro). El límite de los conteos de detección (LOD = conteos de fondo + desviación estándar 2x) corresponde a una resolución espacial de 26 µm de diámetro. El tamaño del diafragma de campo se muestra debajo de la figura. La Figura 23 y la Figura 24 muestran datos para CD45 y PD1 (respectivamente, del mismo experimento).

Los datos muestran una capacidad de detección espacial de la presente descripción correspondiente a alrededor de una a cuatro células.

10 **Ejemplo 5: La presente descripción proporciona un rendimiento cuantitativo en un ensayo clínicamente relevante**

Método

15 Se usaron etapas similares a las ilustradas en la Figura 10 a la Figura 14 (parte superior).

Micromatriz de tejido de cáncer de mama (TMA): TMA BR1504a obtenida de US Biomax, Inc., imagen de tinción H&E obtenida del sitio web de US Biomax (World Wide Web (www.biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a). La sección del mismo bloque que la sección que se muestra en el panel izquierdo de la Figura 25 se tiñó con el anticuerpo primario anti-Her2 29D8 (mAb de conejo, CST) y Cabra a Conejo marcado con Alexa594 (Life Tech.). También se obtuvieron recuentos de histona H3, proteína ribosomal S6, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, control de isotipo de IgG de ratón, y control de isotipo de IgG de conejo (datos no mostrados). Las puntuaciones del patólogo de Her2 para TMA BR1504a fueron proporcionadas por US Biomax, Inc. (World Wide Web (www.biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a). La tinción se realizó con el anticuerpo primario anti-Her2 29D8 (mAb de conejo, CST) y Cabra a Conejo marcado con Alexa594 (Life Tech.). Aunque se usaron otros anticuerpos primarios de conejo en el cóctel primario, la fluorescencia de estos anticuerpos fue insignificante en comparación con la fluorescencia de Her2. Las intensidades de suma de píxeles (a $\lambda = 594$) se obtuvieron usando el software Imaged. Para ello, el valor de fondo se estableció en intensidad = 0, y la intensidad más alta se estableció en intensidad = 255. Se muestra la suma de todas las intensidades de píxeles por ROI.

30 Aquí, primero se tomaron imágenes de las muestras usando fluorescencia, y después se contó digitalmente la expresión de proteínas a partir de la muestra.

Resultados

35 La Figura 25 (panel izquierdo) muestra una micromatriz de tejido (TMA) de tejido tumoral de mama que contiene niveles variables de proteína Her2 como se muestra en la microfotografía (panel central), que identifica la fluorescencia de Her2 mediante tinción IHC. El panel derecho muestra una ampliación de una única región del panel central; tales regiones se tiñeron con un cóctel de anticuerpos multiplexados.

40 La Figura 26 muestra los datos del conteo de nCounter® para cuarenta y ocho regiones representativas frente al estado de Her2 (normas ASCO-CAP). La Figura 27 representa los conteos de nCounter® frente a las intensidades de suma de píxeles ($\times 10^3$) para las cuarenta y ocho regiones mencionadas anteriormente.

45 Estos datos del conteo digital muestran una alta correlación con las intensidades de fluorescencia ($R^2 = 0,92$, Figura 27) en comparación con la puntuación visual del estado de Her2 según las normas ASCO-CAP ($R^2 = 0,51$, Figura 26).

50 **Ejemplo 6: La presente descripción revela abundancias de tipos de células específicas en una muestra de tejido**

55 Se usaron etapas similares a las ilustradas en la Figura 10 a la Figura 14 (arriba); primero, se tomaron imágenes mediante fluorescencia de una muestra de melanoma adherida a un portaobjetos, y después se contó digitalmente la expresión de proteínas a partir de la muestra.

60 La Figura 28 muestra una microfotografía que establece la morfología tisular general de una muestra de melanoma usando fluorescencia de dos colores de CD3 (marcador de células inmunitarias; en rojo) y DAPI (núcleos celulares, en azul). Los datos de expresión usando un cóctel de 30 anticuerpos se obtuvieron de las diez regiones identificadas con cuadros blancos. La Figura 29 muestra conteos de nCounter® ejemplares de un cóctel de oligo-anticuerpos de 30 plex en las diez regiones de interés (ROI) de la muestra de melanoma que se muestra en la Figura 28. Se muestran los conteos de trece marcadores, cada uno de los cuales tiene conteos de expresión por encima del fondo. Las regiones 5, 6, 7, identificadas como "enriquecidas con infiltrado inmune", tienen la mayor expresión de marcadores de células T y marcadores reguladores de células T.

65 Estos datos muestran que la presente descripción proporciona una detección resuelta espacialmente de una pluralidad (aquí, al menos 30) de marcadores de proteínas. Al aumentar el número de sondas proteicas (anticuerpos) usadas, se pueden detectar hasta 800 marcadores proteicos diferentes y con una resolución similar.

Ejemplo 7: Un dispositivo de espejo digital (DMD) es capaz de iluminar células individuales

5 Las Figuras 30 y 31 son fotomicrografías que muestran que la iluminación UV usando un dispositivo de espejo digital (DMD) es capaz de iluminar células individuales en una muestra de tejido de amígdalas.

Estos datos muestran que la presente descripción es capaz de una resolución de una única célula cuando se usa un DMD.

10 **Ejemplo 8: Una caja de gel es capaz de iluminar una muestra completa y liberar oligonucleótidos señal de sondas unidas a toda la muestra**

15 **Figura 34:** Muestra una realización en la que se ilumina un tejido completo o una muestra, por ejemplo, con una caja de gel UV de laboratorio estándar. En este caso, un portaobjetos de tejido FFPE se colocó sobre el panel de luz, se usó una pluma de cera para contener la disolución amortiguadora (TBS) que cubría el tejido FFPE, y se aplicó exposición a luz UW (276 - 362 nm, por ejemplo 302 nm; ~5 mW/cm²) al tejido a través del portaobjetos de vidrio (1 mm de grosor). Los datos muestran que en alrededor de un minuto de exposición UV, la mayoría de los oligonucleótidos señal se liberan de los anticuerpos unidos a FFPE. Los conteos se normalizan a un control positivo.

20 **Ejemplo 9: La iluminación de un microscopio es capaz de iluminar una región de interés en una muestra y liberar oligonucleótidos señal de sondas unidas a la región de interés**

25 La Figura 35 muestra una realización en la que una porción de un tejido o muestra se ilumina, por ejemplo, con un microscopio, es decir, escisión UV bajo microscopio (experimento de valoración de tiempo). Esto contrasta con el experimento del Ejemplo 8, en el que se ilumina una muestra completa. Aquí, el LED UV (a 365 nm) se aplica a alrededor de ~150 mW/cm² con un objetivo de 20x. La iluminación UV barre toda el área del tejido identificada mediante imágenes de campo claro de fluorescencia previa (excitación de ~590 nm). Alrededor de un segundo después de la exposición a los rayos UV por campo de visión (FOV), la mayoría de los oligonucleótidos señal se liberan de las sondas unidas a FFPE. El experimento de la caja de gel del Ejemplo 8 se utilizó como control de liberación del 100 % sin resolución espacial. Los conteos son una relación normalizada con respecto al control positivo. Azul: datos microscópicos con tiempos de exposición variables; Rojo: datos de exposición de 2,5 minutos en caja de gel. También se muestran fotografías y un esquema que muestra la configuración del aparato del microscopio.

35 La Figura 36 muestra que los oligonucleótidos señal se liberan a partir de un anticuerpo anti-Histona (H3) uniformemente distribuido unido a una muestra de tejido pulmonar. El tejido se expuso a un segundo de UV (365 nm, ~150 mW/cm² con objetivo de 20x) por campo de visión (FOV) de alrededor de 450 µm × 330 pm = 0,15 mm². El "macrovolumen" usado para recoger el efluente fue alrededor de 70 µl. Esto reduce el límite de detección a (FOV/5) ~ 99 µm X 99 µm con efluente de recolección de alrededor de 5 µl. Por lo tanto, en este ejemplo, el límite de detección es aproximadamente 10 células X 10 células de nicho. Estos datos muestran que la señal del anticuerpo es proporcional al FOV del área de iluminación resuelta espacialmente, y estima el límite de detección (LOD) "macrofluídico".

40 La Figura 37 muestra una realización en la que se ilumina una porción de un tejido o muestra, por ejemplo con un microscopio, es decir, escisión UV bajo microscopio (experimento de valoración del área de iluminación) y para múltiples dianas. Se muestra la escisión UV de múltiples dianas en un tejido: dos dianas positivas (Histona H3 y S6 Ribosomal) y ocho dianas 8 negativas. Sólo una diana negativa (Ox40) presentó fondo elevado. Se muestran datos de cero, uno, cuatro, nueve y dieciséis campos de visión.

45 **Ejemplo 10: Una región de interés puede identificarse previamente mediante una técnica de marcaje, y después la región de interés se ilumina. Los oligonucleótidos señal se liberan de las sondas unidas a la región de interés previamente identificada**

50 La Figura 38 muestra una realización en la que primero se identifica una región de interés en un tejido (por ejemplo, una muestra de cáncer de mama) para la expresión de un marcador (aquí Her2), y después esta región de interés se ilumina (por ejemplo, con UV) para liberar oligonucleótidos señal de una sonda unida. Los datos mostrados comparan la cantidad de oligonucleótidos señal, para dos dianas (aquí, Her2 e Histona H3), liberados desde dos ubicaciones: una región de interés que se identificó previamente como Her2+, y otra que se identificó previamente como Her2-.

55 **Ejemplo 11: Una muestra embebida en una celda de flujo proporciona la recolección de elución de toda la muestra y no sólo de una región de interés que está iluminada y desde la cual se liberan oligonucleótidos señal**

60 La Figura 39 muestra una realización en la que un tejido está embebido en una celda de flujo. Aquí, el tejido FFPE embebido en una celda de flujo microfluídica (una cámara circular de 9 mm con un volumen de 100 µm de altura con un volumen aproximado de 25 µl [cuando la celda de flujo tiene una altura de 300 µm, el volumen aproximado es 75 µl]) controlado por una bomba de jeringa. Escisión UV dentro de la celda de flujo, que muestra el perfil de elución, iluminación de un área (9 FOV) y elución, después iluminación de otra área (9 FOV) y elución. Se muestran datos para

múltiples fracciones. Al igual que con los datos del Ejemplo 10, aquí se identificó previamente una región de interés para la expresión de un marcador marcado fluorescentemente.

Ejemplo 12: Una muestra embebida en una celda de flujo que comprende pequeños orificios sobre una región de interés proporciona una recolección eficiente de elución de la región de interés que está iluminada y en la que se liberan los oligonucleótidos señal, y no de toda la muestra

La Figura 40 muestra una realización en la que un tejido está embebido en una celda de flujo con pequeños orificios. Aquí, la elución ocurre directamente encima de la región de interés. Los orificios de 0,4-1 mm de diámetro encima de la cámara fluídica permiten la recolección del eluyente (por ejemplo, volumen de recolección de 5 µl). Se ensayaron formatos de 9 orificios, 96 orificios, y 12 orificios (para micromatrices de tejido (TMA)). La imagen de fluorescencia se creó combinando múltiples campos de visión. También se muestran fotografías y un esquema que muestra la configuración del aparato.

Las Figuras 41A a 41C muestran que las realizaciones que usan una celda de flujo con pequeños orificios tienen una mejora significativa de la señal a ruido en lugar de la recolección de eluato de toda la superficie del tejido. Los datos muestran que recolectar eluyente a través de un orificio encima de una región de interés aumenta la relación señal a ruido alrededor de 7 veces. En esta realización, se usaron orificios de 1 mm de diámetro encima de la celda de flujo fluídica (cámara de 25 µl) para recolectar el eluyente (fracciones de 5 µl). Se muestran datos para múltiples fracciones.

Las Figuras 42A a 42C muestran datos usando una celda de flujo con pequeños orificios (formatos de 12 o 96 orificios). Los datos muestran que recolectar eluyente a través de un orificio encima de una región de interés aumenta la relación señal a ruido alrededor de 7 veces. En esta realización, la iluminación del campo de visión se centró en el centro de un orificio; volumen de elución de 5 µl por orificio.

Las Figuras 43A y B muestran datos al comparar la señal de fondo de las celdas de flujo en las que se realizó la elución de tejido completo (Figura 43A; como en el Ejemplo 11) y la señal de fondo de las celdas de flujo en las que la elución se produjo directamente encima de una región de interés (Figura 43B). Como se ve en la Figura 43A, hay un fondo más elevado para la elución de tejido completo con respecto al fondo que se ve en la Figura 43B. Además, la Figura 43B no muestra ninguna diferencia entre la incubación con celdas de entrada y sin flujo.

Ejemplo 13: Los oligonucleótidos señal liberados se pueden escoger mediante un único tubo/pipeta, una pluralidad de tubos/pipetas, o una matriz de múltiples tubos/pipetas

La Figura 44 es un esquema que muestra la recolección de eluyente con una superficie abierta para una realización de aspiración de múltiples regiones de interés. Aquí se muestra una matriz de múltiples tubos para aspiración/dispensación de eluyentes con selección de válvula giratoria. Véase también la Figura 47.

La Figura 45 incluye fotografías y un esquema que muestra una realización en la que la recolección de eluyente se realiza a través de un capilar (microaspirador). Véase también la Figura 47. Las Figuras 46A y B muestran datos de la realización de la Figura 45 en la que la recolección de eluyente se realiza a través de un capilar (microaspirador). Esta realización tiene una mejora espectacular en señal a ruido: la relación señal a ruido aumenta alrededor de 10 veces, en comparación con la elución mediante celda de flujo a través de orificio, y la relación señal a ruido aumenta alrededor de 200 veces, en comparación con la elución de tejido completo. Aquí, el área LOD es aproximadamente 60 µm × 60 µm.

Ejemplo 14: Un dispositivo que comprende capacidades tanto de iluminación como de elución puede obtener de manera eficiente y precisa datos de expresión de ácidos nucleicos y/o proteínas de una región de interés definida

La Figura 48 es un esquema que muestra la iluminación y la recolección de fluidos a través de un capilar y una lente combinados.

Ejemplo 15: La expresión de proteínas se puede detectar y cuantificar a partir de una sola célula

La Figura 50 muestra datos de expresión de proteínas obtenidos de una sola célula o de dos células usando los métodos y aparatos descritos aquí. En el panel superior, se detecta y cuantifica la proteína S6 de al menos una célula, y en el panel inferior se detecta y cuantifica la proteína CD45 de al menos una célula.

Ejemplo 16: Los métodos y aparatos descritos aquí proporcionan una detección y cuantificación precisas y eficientes de la expresión de la diana de ARN y/o de la diana proteica multiplexada y resuelta espacialmente

Se llevó a cabo la hibridación in situ (ISH) para hibridar sondas basadas en oligonucleótidos de ADN ("sondas de ARN"), comprendiendo cada una un dominio de unión a la diana, un oligonucleótido señal, y un enlazador fotoescindible, con un ARN endógeno. Se desparafinaron secciones de tejido mamario FFPE HER2 3+ de 5 µm en xileno, se rehidrataron parcialmente en etanoles graduados, y se incubaron en etanol al 70% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después,

- las secciones se incubaron en 40 µg/ml de proteinasa K durante 25 minutos a 37°C. Los tejidos se incubaron entonces en formamida al 50 %/SSC 2X durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se hibridaron durante la noche a 37°C en una disolución de sondas 1 nM, formamida al 40 %, ARNt de levadura 1 mg/ml, sulfato de dextranso al 10 %, y BSA al 0,2 % en 2X SSC. Tras la hibridación, se realizaron dos lavados rigurosos en formamida al 50 %/SSC 2X, durante 5 25 minutos cada uno a 37°C. Las secciones se tiñeron con tinción de ácido nucleico fluorescente TO-PRO®-3 (Thermo Fisher Scientific), para visualizar la morfología del tejido. Entonces se usó luz UV enfocada, dirigida por un dispositivo de microespejo digital, para escindir oligonucleótidos señal de ADN de sondas en una región de interés (ROI) definida por el usuario. Para cada sección de tejido, dos ROI comprendían un tejido tumoral, dos ROI comprendían tejido normal, y dos ROI no comprendían ningún tejido (el propio portaobjetos de histología). Después de la escisión, se recolectaron 10 los oligonucleótidos señal, se hibridaron con códigos de barras moleculares nCounter®, y se contaron digitalmente mediante un sistema nCounter® de NanoString Technologies®. Se llevó a cabo la tinción H&E en secciones de tejido para verificar las ROI de los tejidos normales y tumorales.
- 15 En secciones en serie, la inmunohistoquímica (IHC) estándar se llevó a cabo usando "sondas de proteínas", comprendiendo cada una un anticuerpo como dominio de unión a la diana, un oligonucleótido señal de ADN, y un enlazador fotoescindible. Después, las secciones se tiñeron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 594, y una tinción de ácido nucleico fluorescente TO-PRO®-3 (Thermo Fisher Scientific), para visualizar la morfología del tejido. Entonces se usó luz UV enfocada, dirigida por un dispositivo de microespejo digital (DMD), para escindir oligonucleótidos señal de ADN de sondas en una ROI definida por el usuario. Para cada sección de tejido, dos 20 ROI comprendían tejido tumoral, una ROI comprendía tejido normal, y dos ROI no comprendían ningún tejido (el propio portaobjetos de histología). Las ROI se emparejaron con las ROI seleccionadas para la escisión de la sonda ISH. Tras la escisión, los oligonucleótidos señal de las dianas proteicas se mezclaron con los oligonucleótidos señal de las dianas de ARN, y todos se cuantificaron como se describió anteriormente. Se llevó a cabo una tinción H&E en secciones de 25 tejido para verificar las ROI de tejido tumoral y normal, y para verificar que las ROI coincidieran correctamente entre los tejidos ISH e IHC.
- 30 La Figura 51 muestra ROI tomadas de secciones en serie de la misma muestra de tumor. Las regiones 1 a 4 no se muestran en esta imagen y, en cambio, se tomaron de porciones del tejido que no contenían tejido (controles negativos - "Sin tejido"). Las regiones 5 a 8 contenían un número bajo de células tumorales ("Tejido normal"). Las regiones 9-12 contenían un gran número de células tumorales ("Tumor").
- 35 La Figura 52 muestra los conteos obtenidos para seis de las nueve sondas de ARN incluidas en este ensayo. Para cada ROI, se recolectó una muestra antes de aplicar la iluminación UV (el conjunto de datos "-UV") y antes de recolectar una muestra UV positiva de la misma región (el conjunto de datos "+UV"). Los niveles de fondo de los conteos se obtienen cuando no se aplicó UV a la muestra; mostrando así la dependencia de UV de una señal obtenida. Las ROI que eran +UV, pero no dirigidas al tejido (es decir, las ROI 1-4 - "Sin tejido") dieron conteos de fondo. Las regiones que eran principalmente tejido normal (es decir, las ROI 5-8 - "Tejido normal") dieron conteos bajos para la sonda de HER2 (barras naranjas en el gráfico). Las regiones que eran principalmente tejido tumoral (es decir, las ROI 9-12 - "Tumor") dieron conteos más altos de HER2. Se observó un aumento similar, pero menos drástico, para la sonda de S6 40 Ribosoma (barras verdes en el gráfico). Las sondas de control adicionales dirigidas a ARN que no se esperaba que se expresaran altamente en este tipo de tejido dieron conteos consistentes que no mostraron niveles diferenciales entre tejido normal y tumoral. Estas sondas de control se diseñaron para dirigirse contra CD45, PSA (antígeno específico de la próstata), y dos secuencias únicas de ERCC. Para mayor claridad, la Figura 53 muestra los promedios y las desviaciones estándar de los datos que se muestran en la Figura 52.
- 45 50 Estas muestras de sondas de ARN también se procesaron simultáneamente con sondas de proteínas que analizaron las regiones de muestra de la muestra tumoral. Para ello, se hibridaron simultáneamente sondas de ARN y de proteínas con códigos de barras moleculares nCounter®, y se contaron digitalmente mediante un sistema nCounter® de NanoString Technologies®. Los conteos de este ensayo se muestran en la Figura 54. Se observa un aumento en los conteos de sondas de ARN de HER2 (barras rojas en el gráfico superior) y en los conteos de sondas de proteínas (barras rojas y naranjas en el gráfico inferior) en las regiones tumorales en comparación con las regiones normales. Sólo se muestran muestras +UV. La muestra de control -UV, como se describió anteriormente, no se muestra en este gráfico porque proporcionó conteos de fondo (similares a los conteos "sin tejido"). ROI 6 y ROI 8 se eliminaron de este análisis porque no se obtuvieron muestras de sonda de proteínas coincidentes. De este modo, los oligonucleótidos señal de sondas de proteínas y los oligonucleótidos señal de sondas de ARN se pueden detectar y cuantificar juntos.
- 55 **Ejemplo 17: Las sondas parcialmente bicatenarias tienen relaciones señal a ruido más altas en comparación con las sondas monocatenarias**
- 60 65 Se hibridaron *in situ* sondas de ADN (que reconocen y se unen a ARNm), como se describe en el Ejemplo 16, con ARN en tejidos FFPE de 5 µm. La escisión UV se llevó a cabo en secciones de tejido completo, montadas en portaobjetos separados, durante 3 minutos usando una caja de luz UV (caja de gel) en 2X SSC + Tween 20 al 0,1%. Después de la escisión y liberación de los oligonucleótidos señal, los oligonucleótidos señal se recolectaron con una pipeta y se detectaron como en el Ejemplo 16. En la Figura 55 (gráfico superior) se muestran los conteos de sondas de ADN monocatenario, sondas de ADN parcialmente bicatenario, y controles sin sonda, para el tejido mamario HER2 3+ y el

tejido de amígdalas. Las relaciones señal a ruido se determinaron dividiendo los conteos entre los conteos promedio del fondo (conteos promedio de ERCC); véase la Figura 55, gráfico de la parte inferior.

Ejemplo 18: La adición de ADN de esperma de salmón mejora la hibridación de sondas

5 Se hibridaron sondas de ADN (que reconocen y se unen al ARNm) in situ, como se describió anteriormente, con ARN en tejidos FFPE de 5 µm. Durante la hibridación, se usó ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonicado 1 mg/ml, en lugar de ARNt de levadura. Los portaobjetos se hibridaron con una disolución de sondas 1 nM, formamida al 40 %, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonicado 1 mg/ml, sulfato de dextrano al 10 %, y BSA al 0,2 % en SSC 2X. La escisión por UV y la recolección y detección de oligonucleótidos señal se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 17. Se muestran sondas de ADN monocatenario en la mama de HER2 3+ y las amígdalas (Figura 56). Las relaciones señal a ruido se determinaron dividiendo los conteos entre los conteos promedio del fondo (conteos promedio de ERCC).

10 15 **Ejemplo 19: La sonda de ARN del PSA (antígeno prostático específico) es altamente específica**

20 Se hibridaron sondas de ADN (que reconocen y se unen al ARNm) in situ, como se describió anteriormente, con ARN en secciones de 5 µm de próstata FFPE. Se usó una incubación de diez minutos en MES a 97°C, en lugar de una incubación con etanol de una hora. La escisión por UV, la recolección y detección de oligonucleótidos señal, y los cálculos de la relación señal a ruido se realizaron como se describe en el Ejemplo 17. Los recuentos y relaciones se muestran en la Figura 57.

Ejemplo 20: La especificidad de las sondas aumenta en concentraciones sub-nM no estándar

25 Normalmente, las sondas de hibridación in situ (ISH) que se usan para reconocer ARN se hibridan a 5 hasta 200 nM. Sorprendentemente, las sondas de reconocimiento de ácidos nucleicos de la presente descripción funcionaron mejor a 0,2 nM o menos, que es 25 a 1000 veces menor que las concentraciones de sonda ISH estándar.

30 35 Las sondas de ADN se hibridaron con ARN in situ, como se describió anteriormente, en secciones de 5 µm de muestras de mama HER2 3+ FFPE. Se usaron sondas a 5, 1, 0,2 y 0,4 nM. La escisión por UV, la recolección y detección de oligonucleótidos de señal, y el cálculo del cambio de veces se realizaron como se describe en el Ejemplo 17.

La Figura 58 muestra que los recuentos disminuyeron al disminuir las concentraciones de la sonda (gráfico superior). Sin embargo, inesperadamente, hubo una ganancia significativa en la relación señal-ruido cuando se comparan los recuentos de sondas positivas con las sondas de control negativas, cuando las sondas se hibridan a concentraciones sub-nM.

REIVINDICACIONES

1. Un método, que comprende:
 (1) poner en contacto al menos una diana proteica en una muestra de tejido con al menos una sonda que comprende un dominio de unión a la diana, un oligonucleótido señal, y un motivo fotoescindible ubicado entre el dominio de unión a la diana y el oligonucleótido señal;
 (2) iluminar una ubicación específica de la muestra de tejido con luz suficiente para liberar el oligonucleótido señal;
 (3) recolectar el oligonucleótido señal liberado de una disolución proximal, en el que la disolución proximal se eluye directamente por encima de la ubicación que se iluminó, aspirando con un tubo capilar, y no de toda la muestra de tejido; y
 (4) identificar el oligonucleótido señal liberado, detectando de ese modo la al menos una diana proteica en la ubicación específica de la muestra de tejido que se iluminó.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la detección comprende determinar la identidad y la abundancia de la al menos una diana proteica; preferiblemente en el que la al menos una diana proteica comprende al menos dos dianas proteicas distintas o al menos dos copias de la misma diana proteica; y preferiblemente en el que la detección comprende comparar la abundancia de cada diana proteica distinta.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además repetir al menos las etapas (2) - (4) en al menos una segunda ubicación específica de la muestra de tejido.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la detección comprende comparar la abundancia de la al menos una diana proteica en la ubicación específica y en la al menos segunda ubicación específica; preferiblemente en el que la ubicación específica y la al menos segunda ubicación específica comprenden:
 (i) el mismo tipo de célula; o
 (ii) distintos tipos de células;
 preferiblemente en el que la detección comprende comparar la abundancia de la al menos una diana proteica en la ubicación específica y en la al menos segunda ubicación específica; preferiblemente en el que las células se seleccionan independientemente de una célula normal y una célula anormal.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de tejido es una sección de tejido de 2 a 1000 µm de grosor directamente inmovilizada o indirectamente inmovilizada sobre un portaobjetos de microscopio; preferiblemente en el que la sección de tejido se obtiene a partir de una muestra embebida en parafina fijada con formalina (FFPE), o en el que la muestra de tejido está fijada o no fijada; y/o
 la muestra de tejido se tiñe o marca antes de la etapa (2), permitiendo de ese modo la visualización de una estructura subcelular, celular o relacionada con el tejido en la muestra de tejido teñida o marcada.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
 (i) el oligonucleótido señal es un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico parcialmente bicatenario; y/o
 (ii) se usa una etapa de purificación negativa para eliminar moléculas sonda intactas de los oligonucleótidos señal liberados; preferiblemente en el que la etapa de purificación negativa comprende una purificación por afinidad que comprende poner en contacto una sonda intacta con un oligonucleótido inmovilizado que es complementario a una porción de la sonda intacta o un anticuerpo inmovilizado o motivo de unión a proteínas que reconoce y se une a una porción de la sonda intacta; y preferiblemente en el que el dominio de unión a la diana de la sonda intacta comprende una etiqueta o secuencia de purificación universal que es parcialmente complementaria al oligonucleótido inmovilizado o es capaz de ser reconocida o unida por el anticuerpo inmovilizado o motivo de unión a proteínas.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la fuente de luz se selecciona del grupo que consiste en una lámpara de arco, un láser, una fuente de luz UV enfocada, y un diodo emisor de luz (LED); preferiblemente en el que la luz irradia al menos una estructura subcelular de la ubicación específica de la muestra de tejido; y preferiblemente en el que la detección comprende determinar la abundancia de la al menos una diana proteica en la al menos una estructura subcelular de la ubicación específica de la muestra de tejido.
8. El método de la reivindicación 3, en el que la luz es proporcionada por una fuente de luz seleccionada de una lámpara de arco, un láser, una fuente de luz UV enfocada, y un diodo emisor de luz (LED); y la fuente de luz irradia al menos una estructura subcelular en la ubicación específica de la muestra de tejido y al menos una estructura subcelular en la al menos segunda ubicación específica de la muestra de tejido; y preferiblemente en el que la detección comprende comparar la abundancia de la al menos una diana proteica en la al menos una estructura subcelular en la ubicación específica de la muestra de tejido y la al menos una estructura subcelular en la al menos segunda ubicación específica de la muestra de tejido.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que:
 (i) el dominio de unión a la diana se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un péptido, un aptámero, y un peptoíde; y/o

- (ii) la detección comprende una reacción de polimerasa, una reacción de transcriptasa inversa, hibridación con una micromatriz de oligonucleótidos, espectrometría de masas, hibridación con una baliza molecular fluorescente, una reacción de secuenciación, detección de códigos de barras o códigos de etiquetas; y/o
(iii) la diana proteica es una proteína intacta, una pluralidad de polipéptidos, un polipéptido, o un péptido.
- 5 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el tubo capilar comprende un dispositivo óptico capaz de transmitir una fuerza luminosa, que es preferiblemente luz UV, a la ubicación específica de la muestra de tejido.
- 10 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la disolución proximal comprende un polímero aniónico, preferiblemente sulfato de dextrano, y/o ADN de esperma de salmón.
- 15 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que:
(i) el oligonucleótido señal recolectado se añade a una disolución que comprende un polímero aniónico, preferiblemente sulfato de dextrano, y/o ADN de esperma de salmón; y/o
(ii) el método comprende además iluminar una región de interés usando un dispositivo de barrido láser o un dispositivo de espejo digital (DMD).
- 20 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que:
(i) el método proporciona detección simultánea multiplexada de proteínas resueltas espacialmente de una muestra; y/o
(ii) detectar comprende proporcionar una lectura digital que comprende un intervalo dinámico lineal de > 5 logs; y/o
(iii) la muestra de tejido es una sección de tejido, en el que la sección de tejido se inmoviliza en un portaobjetos y primero se obtienen imágenes usando fluorescencia y después se cuenta digitalmente la expresión de proteínas a partir de la muestra; y/o
25 (iv) la sonda se proporciona a una concentración de 5 nM o menos, 1 nM o menos, 0,4 nM o menos, o 0,2 nM o menos.

ES 2 975 361 T3

Figura 1

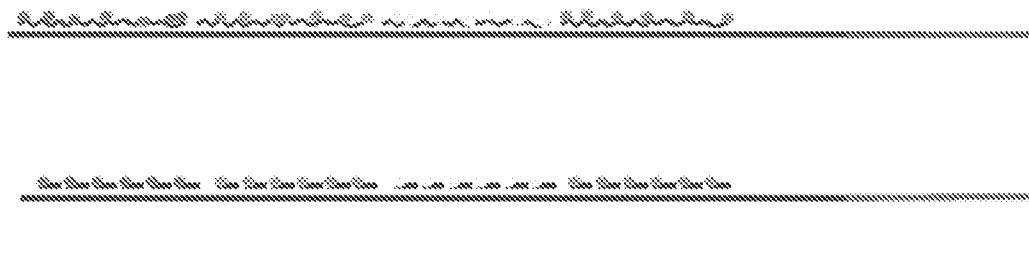
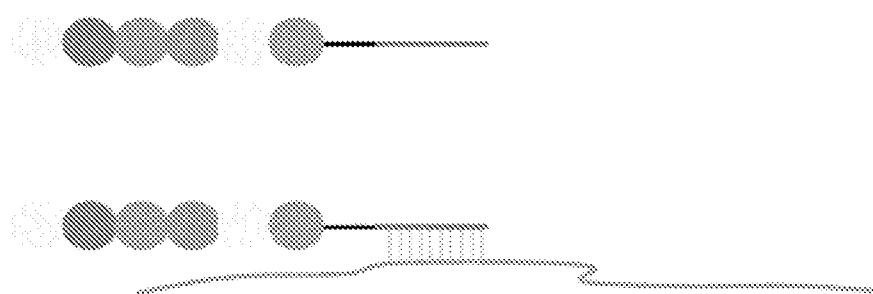


Figura 2



ES 2 975 361 T3

Figura 3

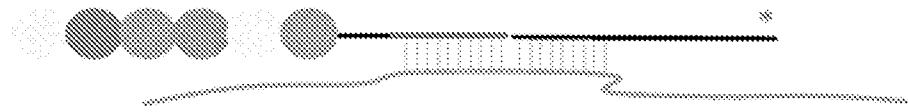


Figura 4

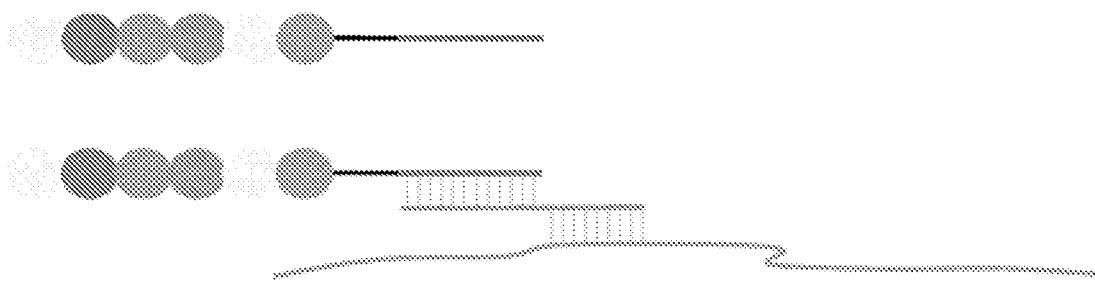
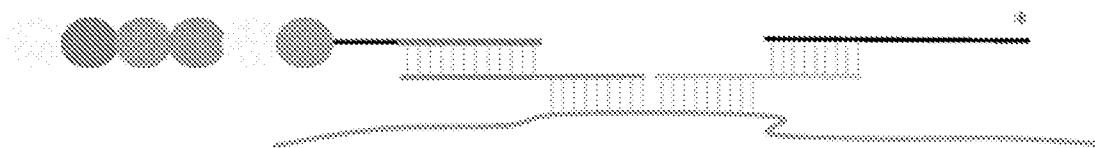
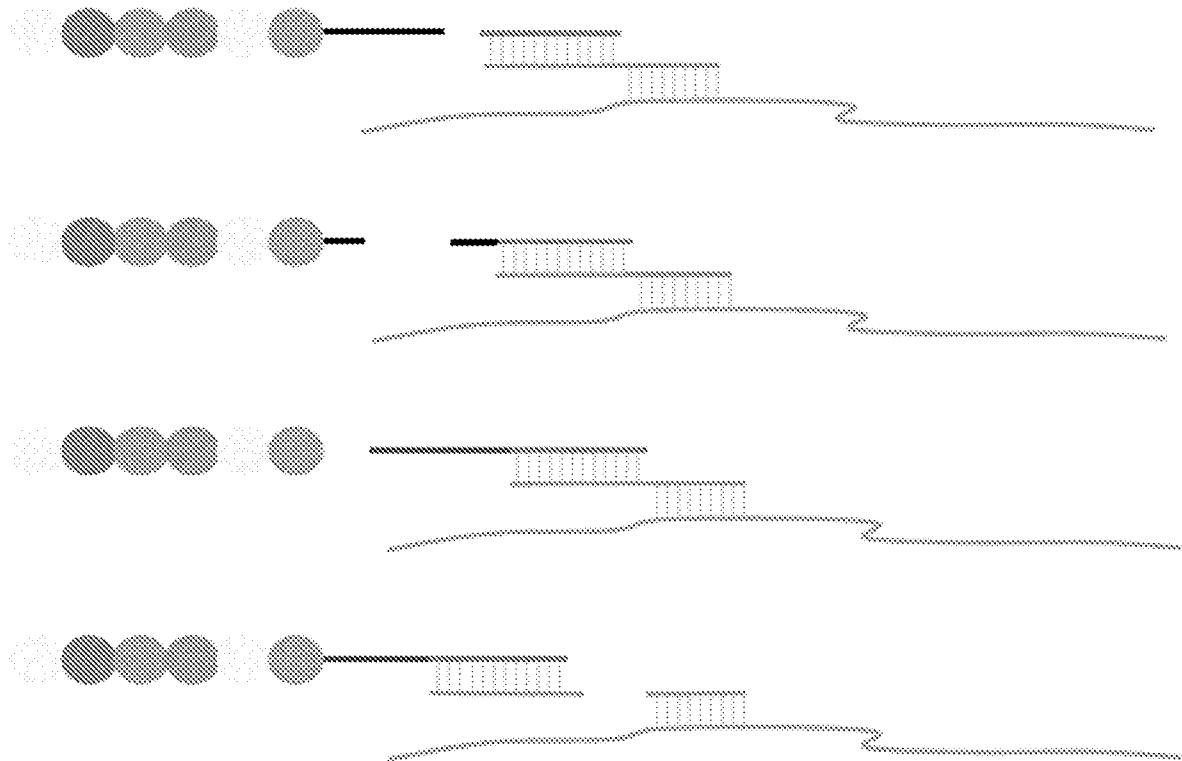


Figura 5



ES 2 975 361 T3

Figura 6



ES 2 975 361 T3

Figura 7

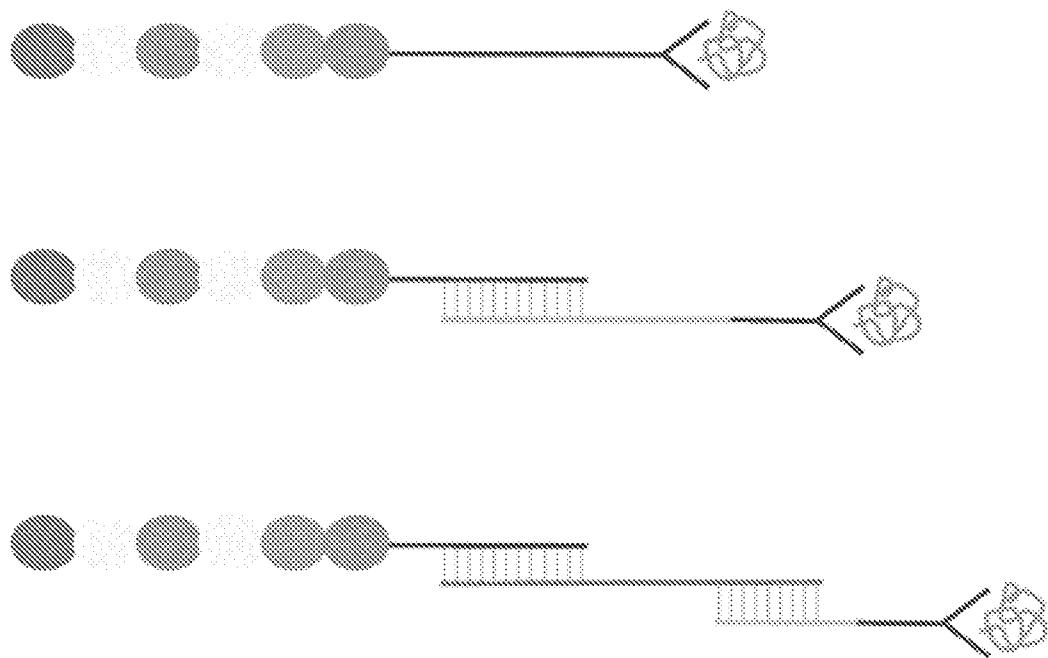


Figura 8

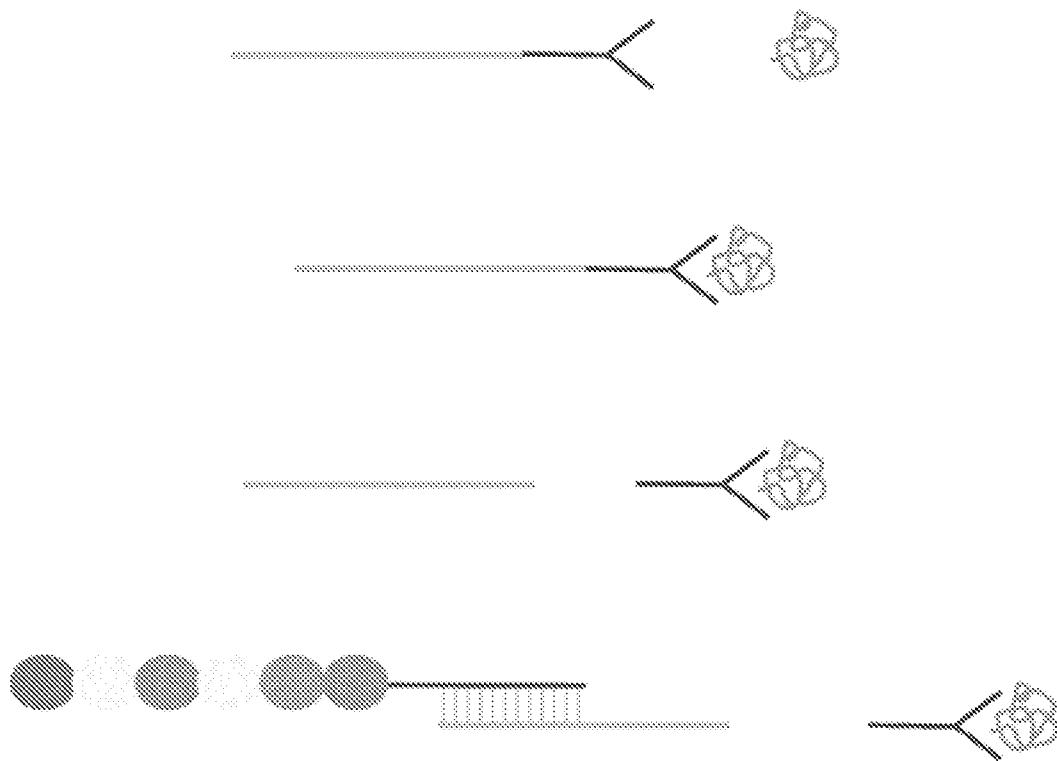


Figura 9

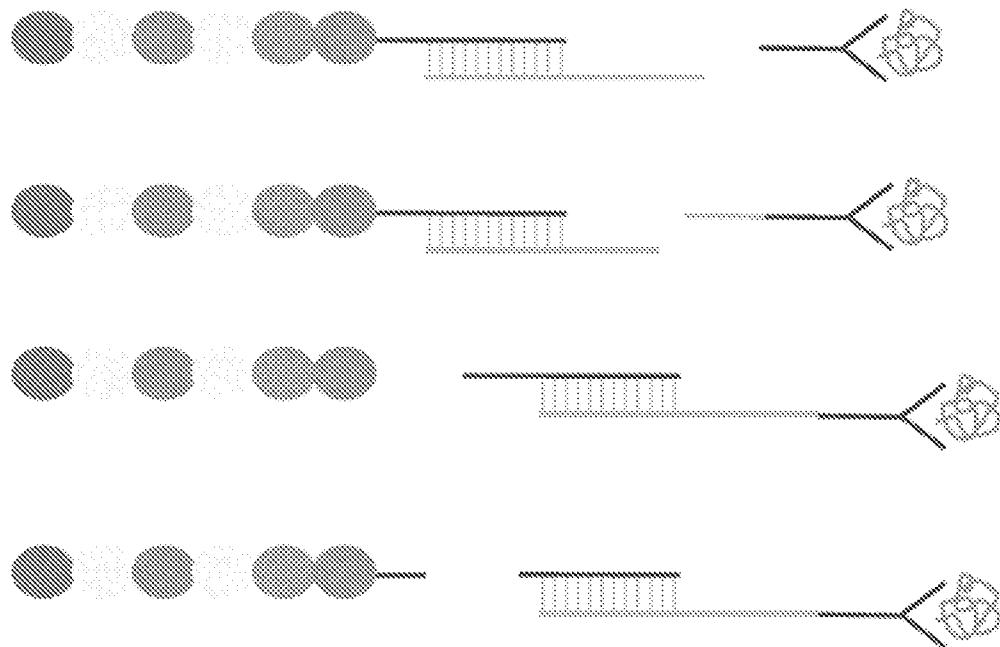


Figura 10

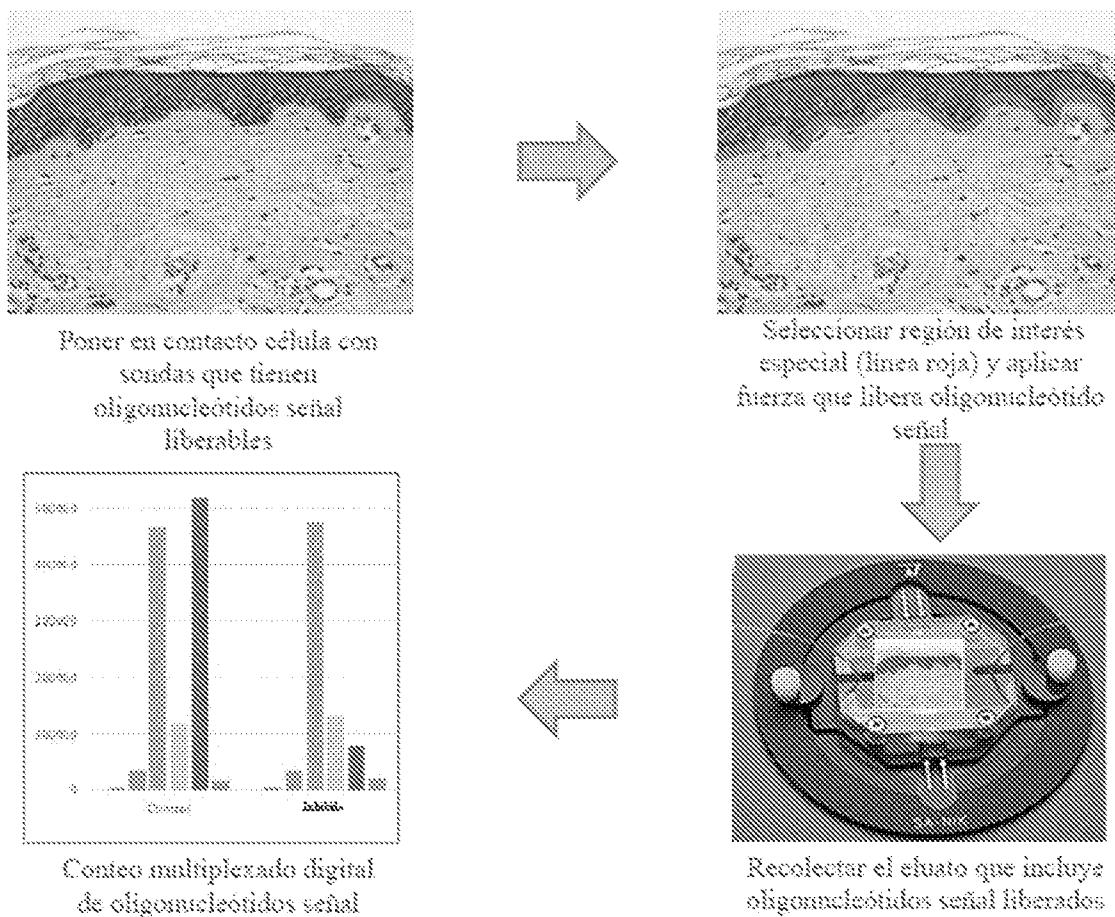


Figura 11

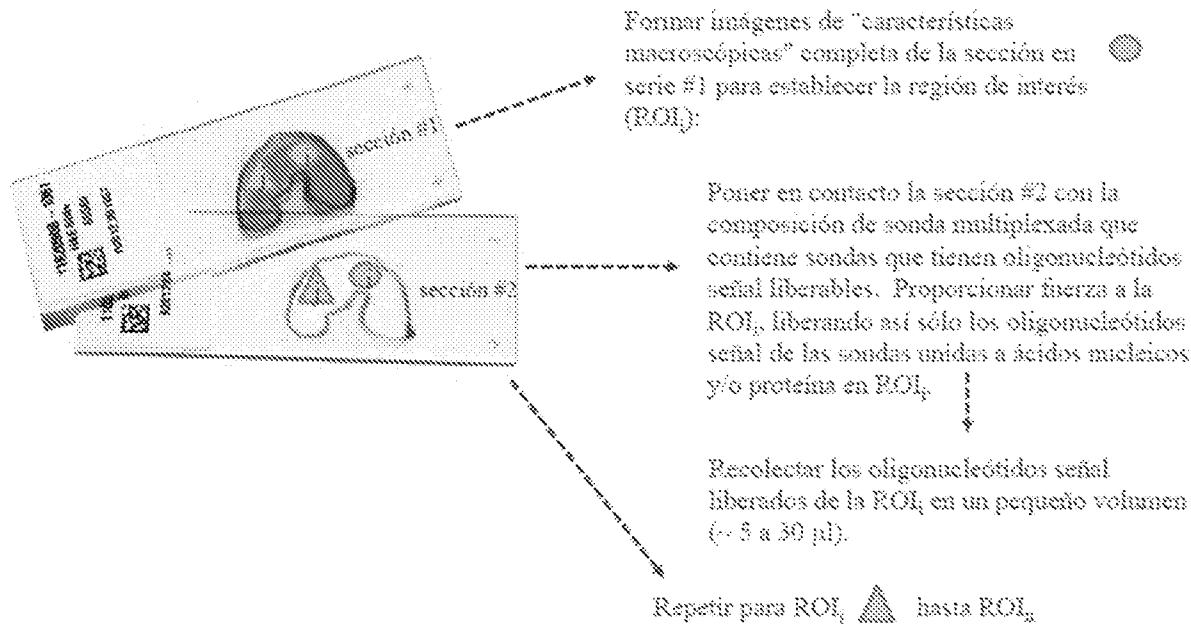


Figura 12

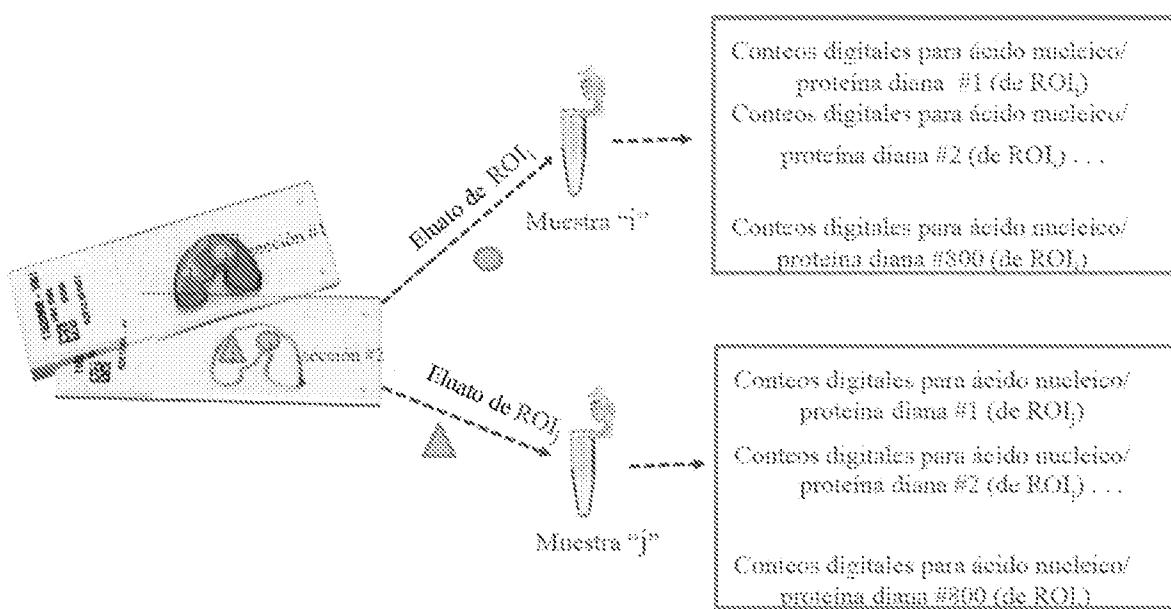


Figura 13

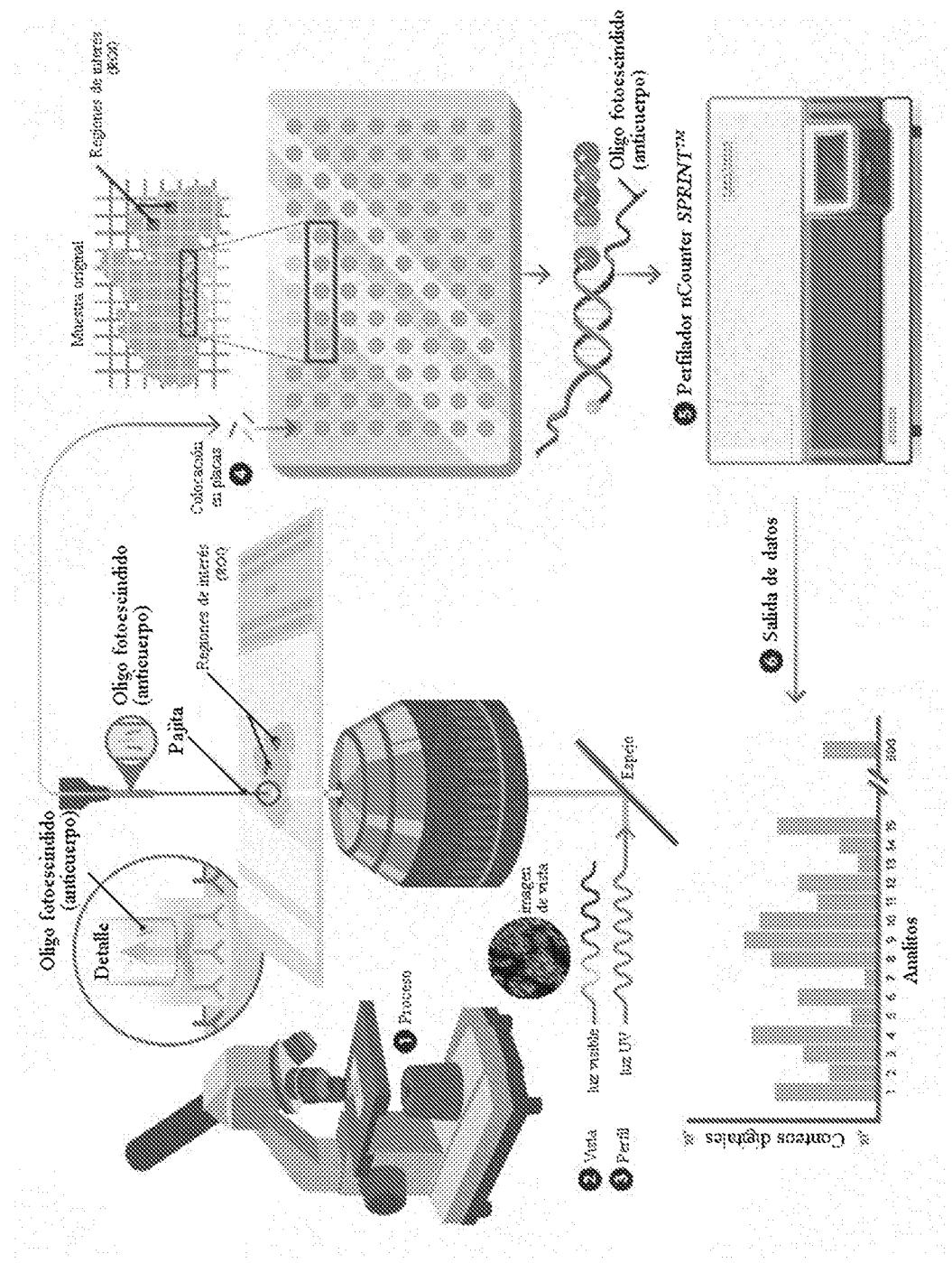


Figure 1

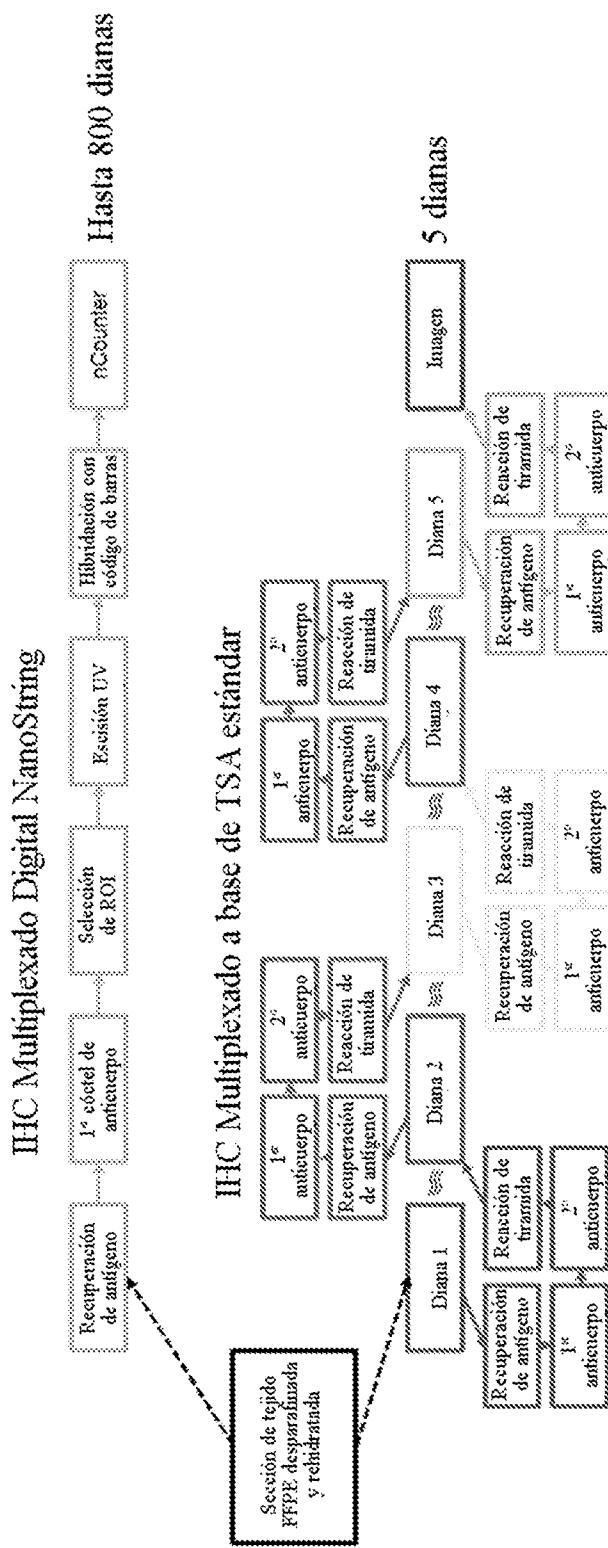


Figura 15

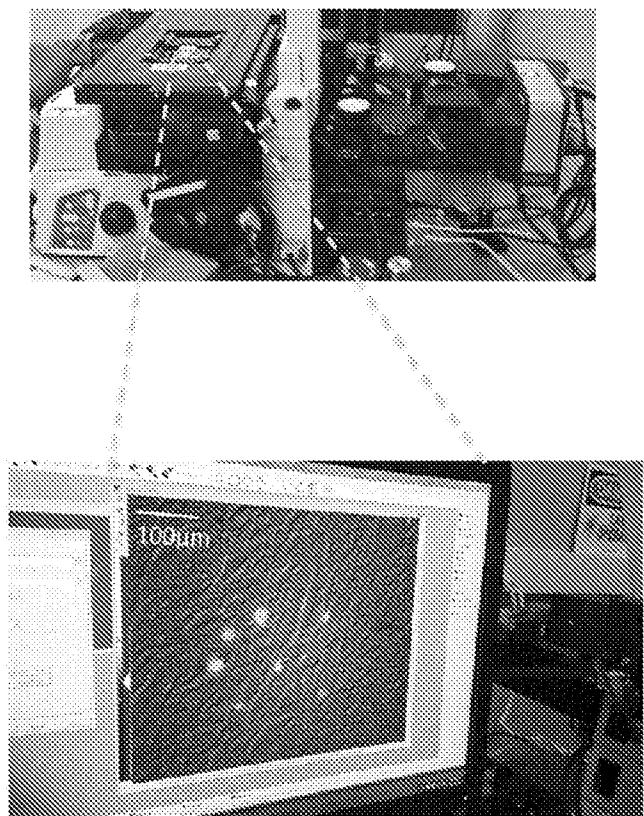


Figura 16

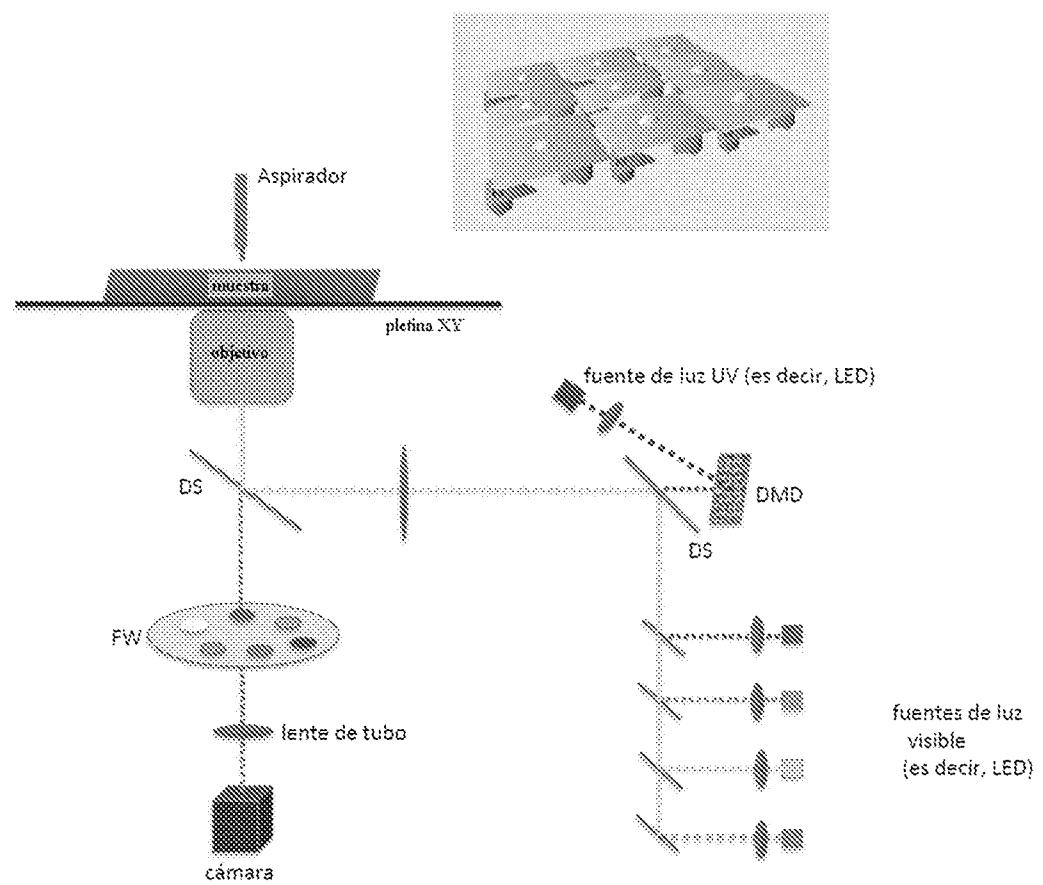
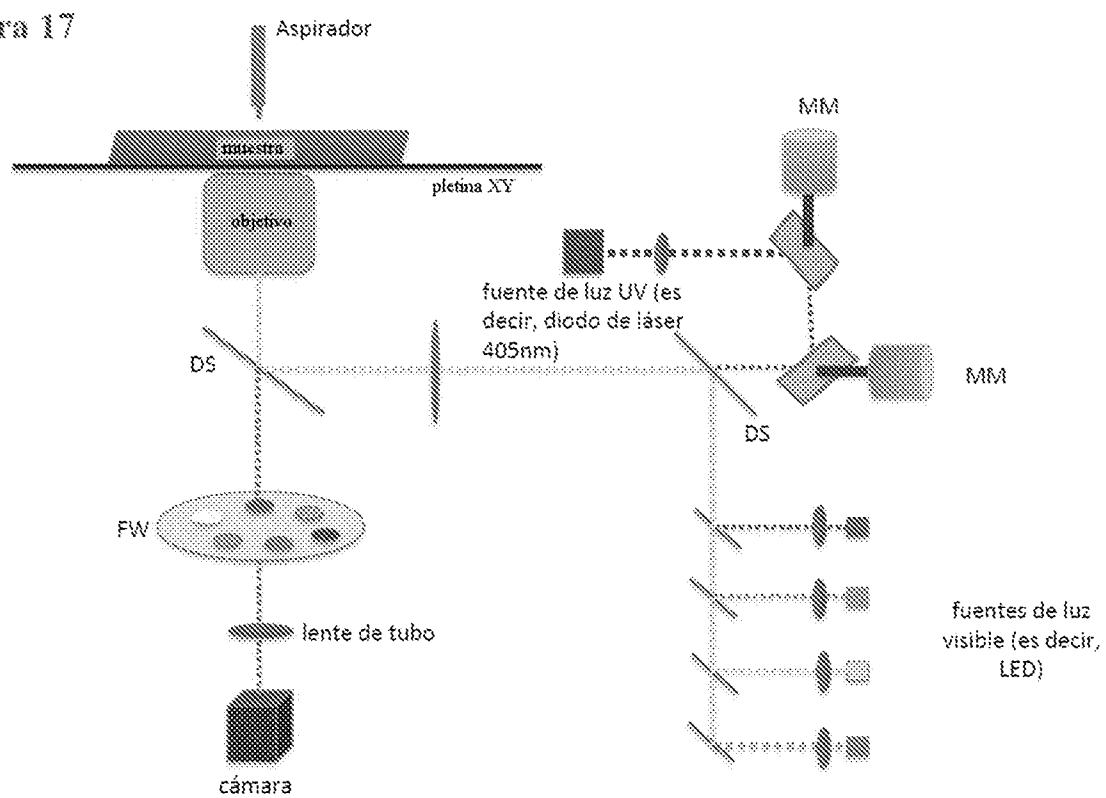


Figura 17



ES 2 975 361 T3

Figura 18

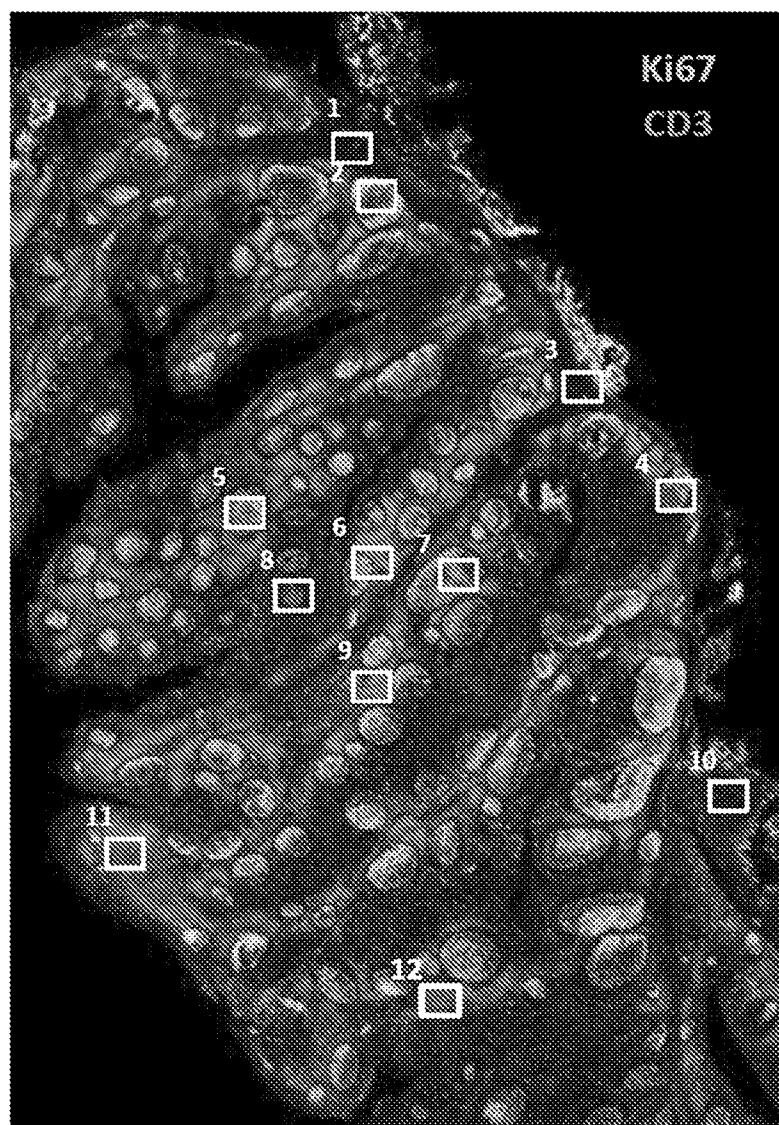


Figura 19

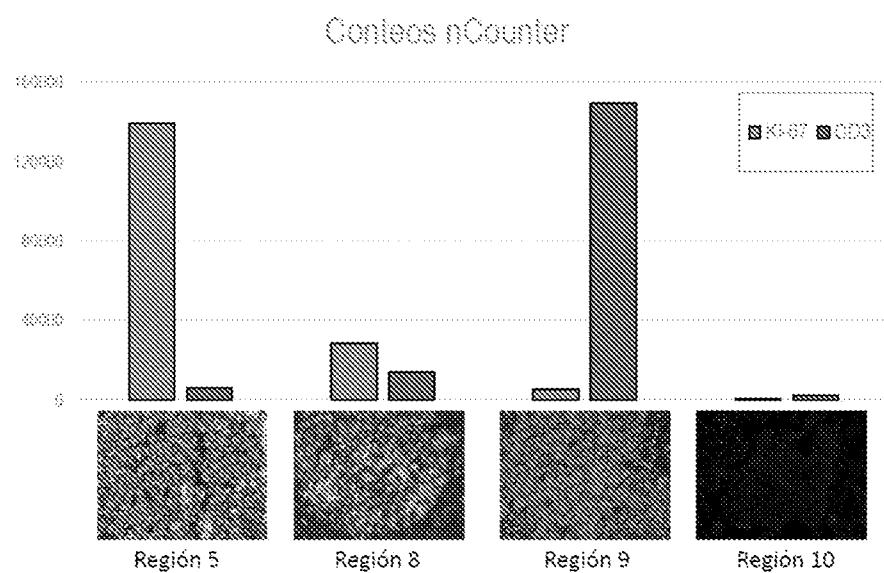


Figura 20

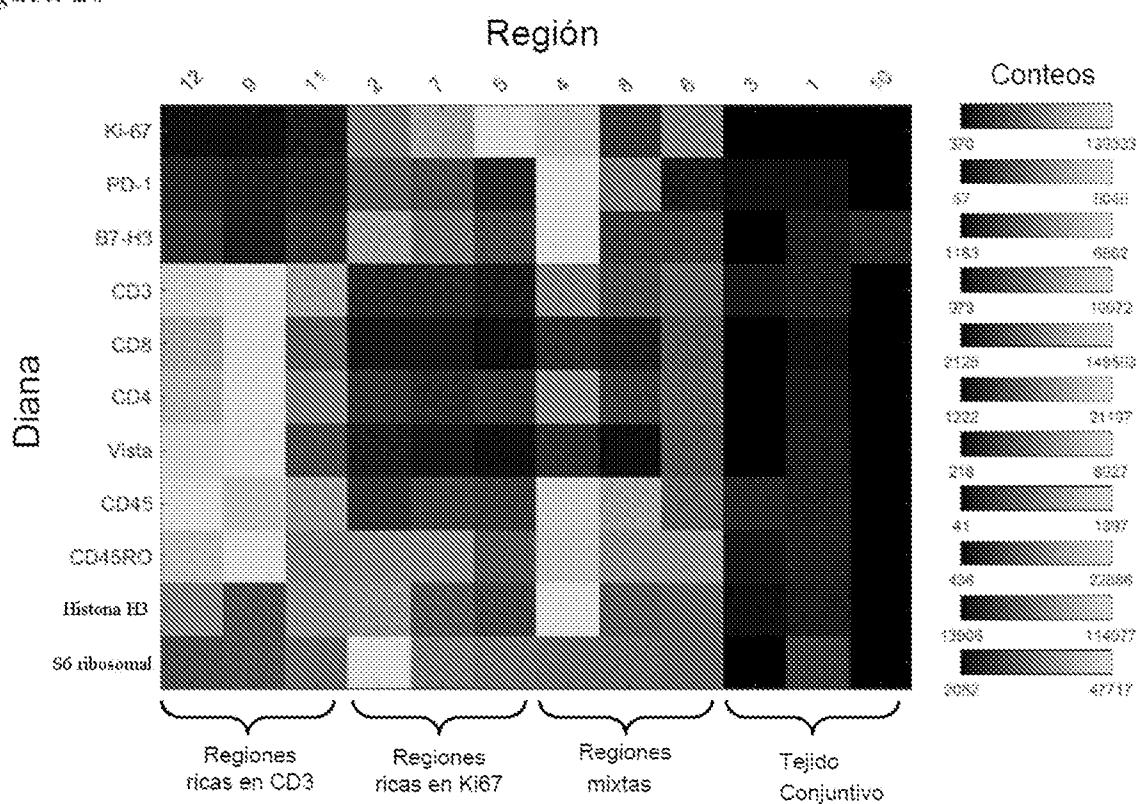


Figura 21

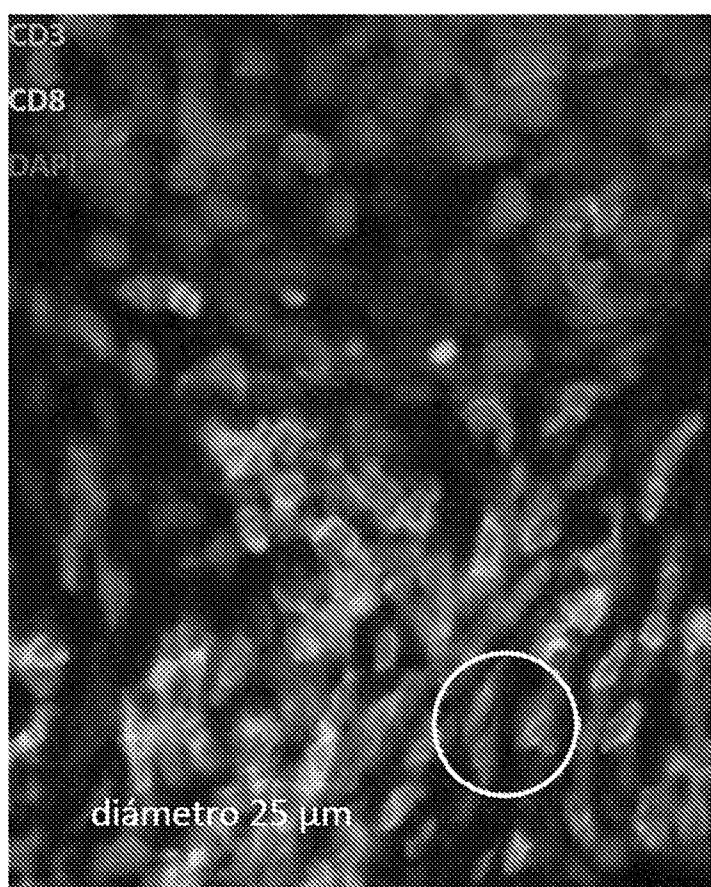


Figura 22

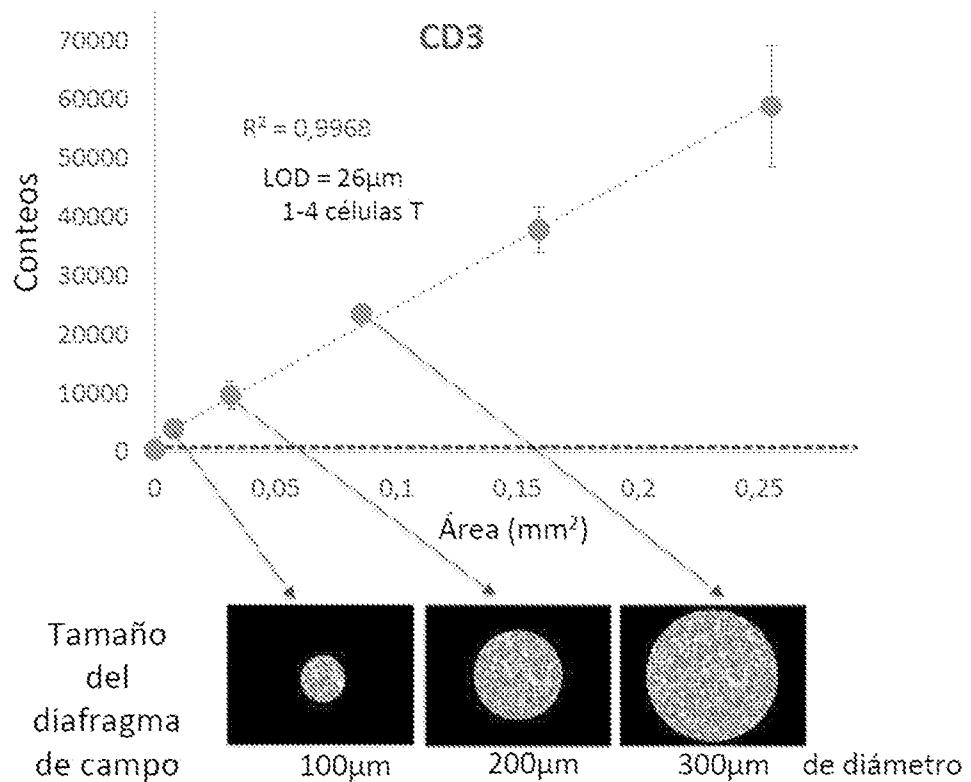


Figura 23

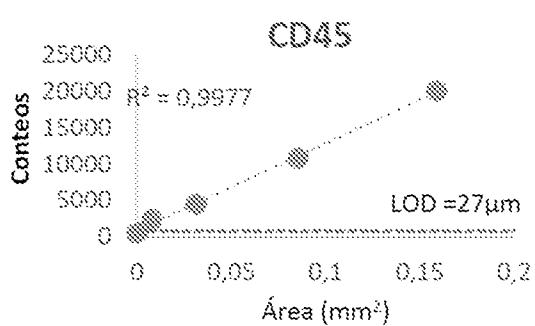


Figura 24

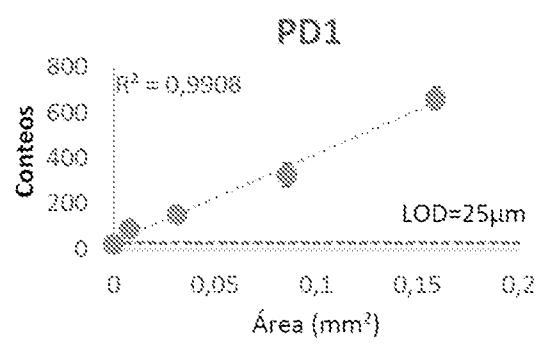


Figura 25

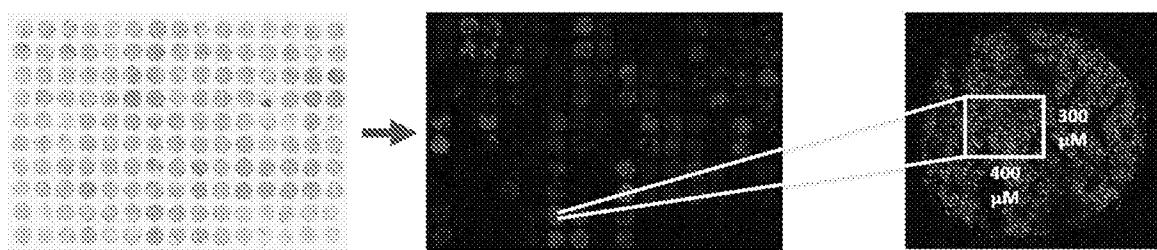


Figura 26

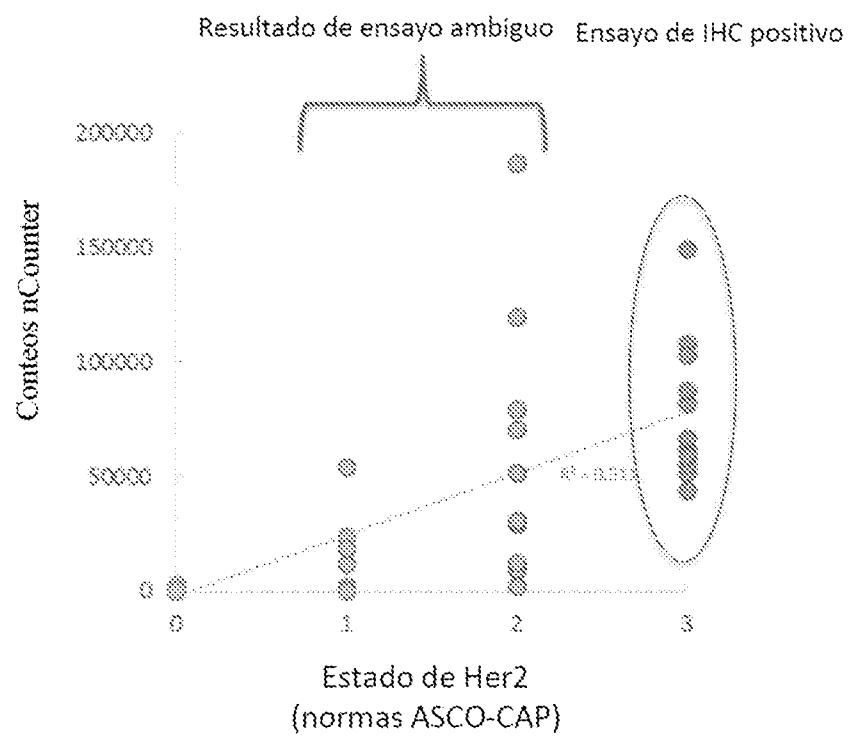


Figura 27

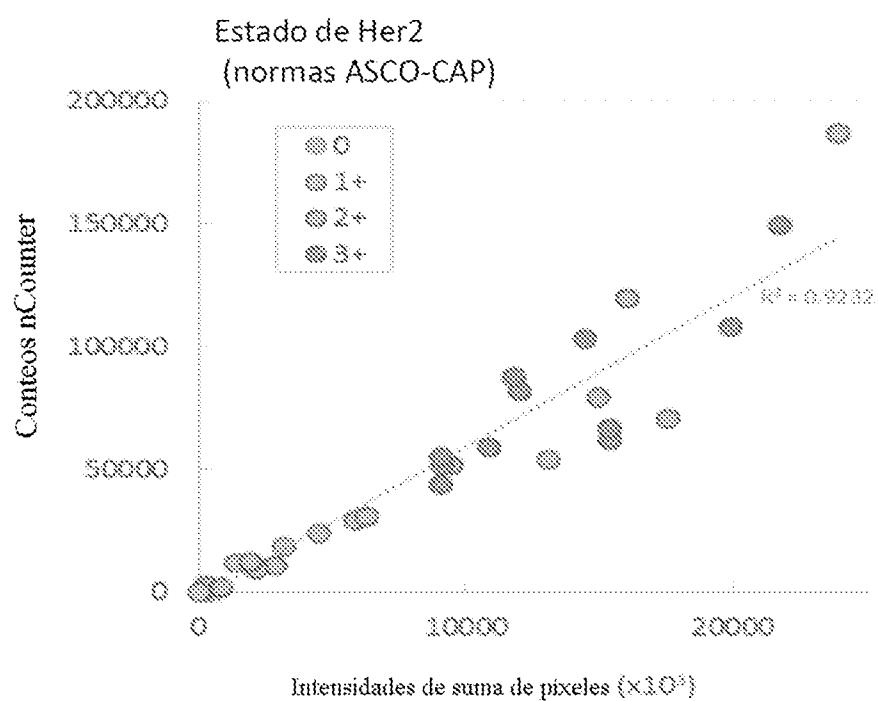


Figura 28

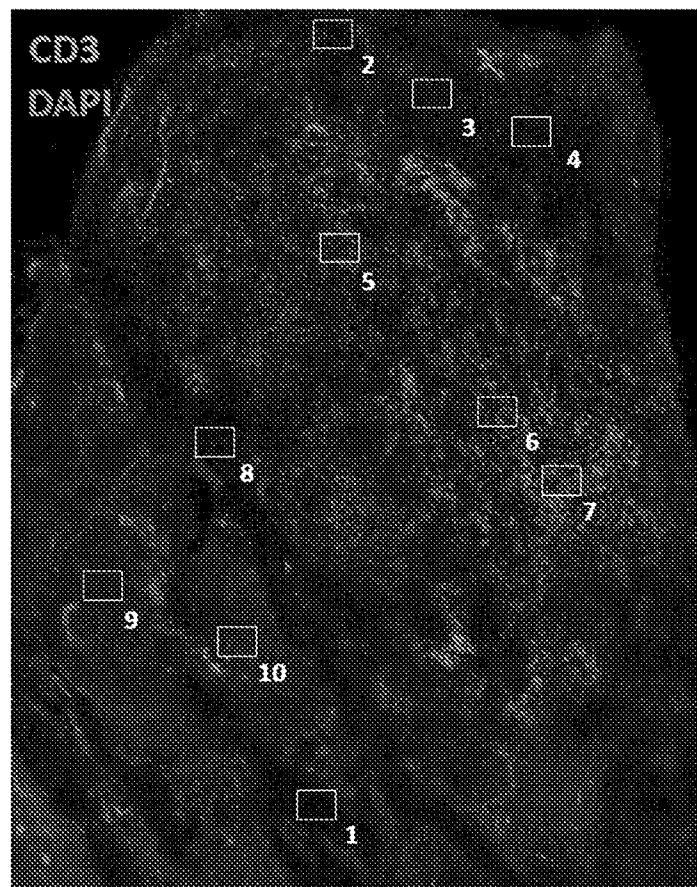
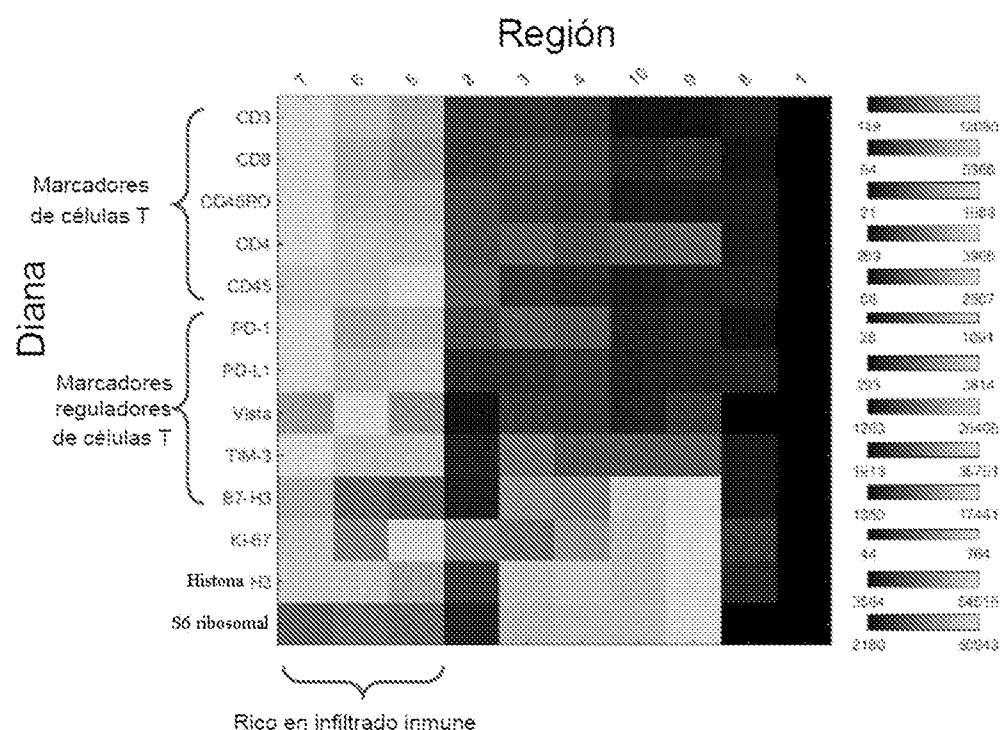


Figura 29



ES 2 975 361 T3

Figura 30A

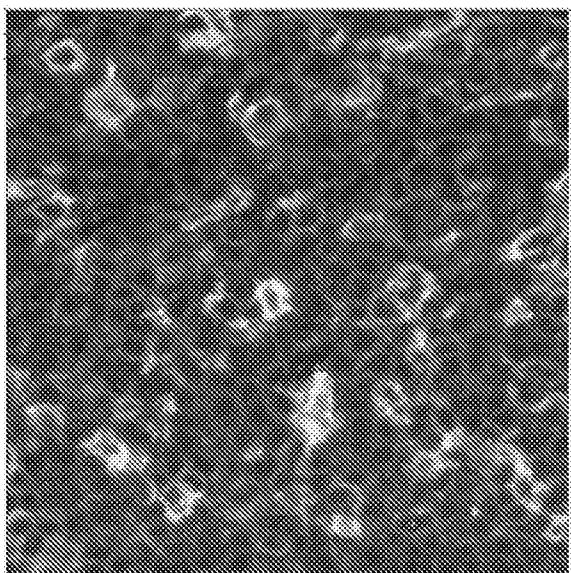
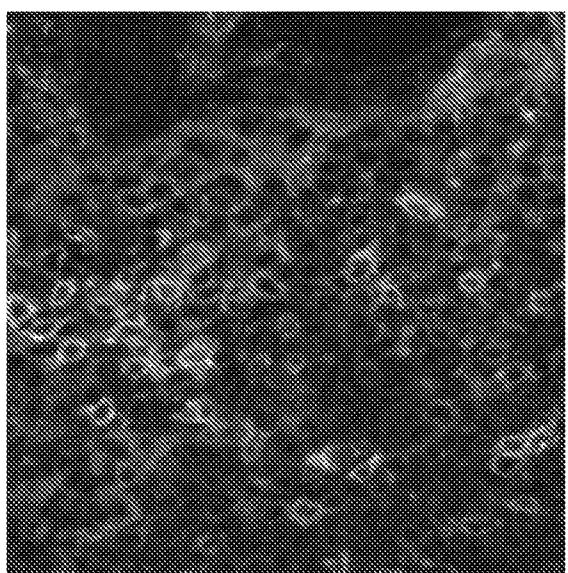


Figura 30B



ES 2 975 361 T3

Figura 31B

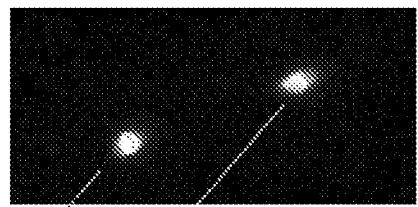


Figura 31D

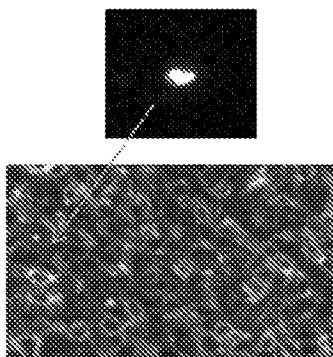


Figura 31C

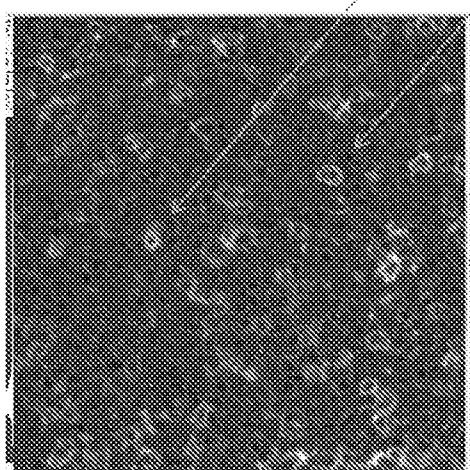


Figura 31A

Figura 32

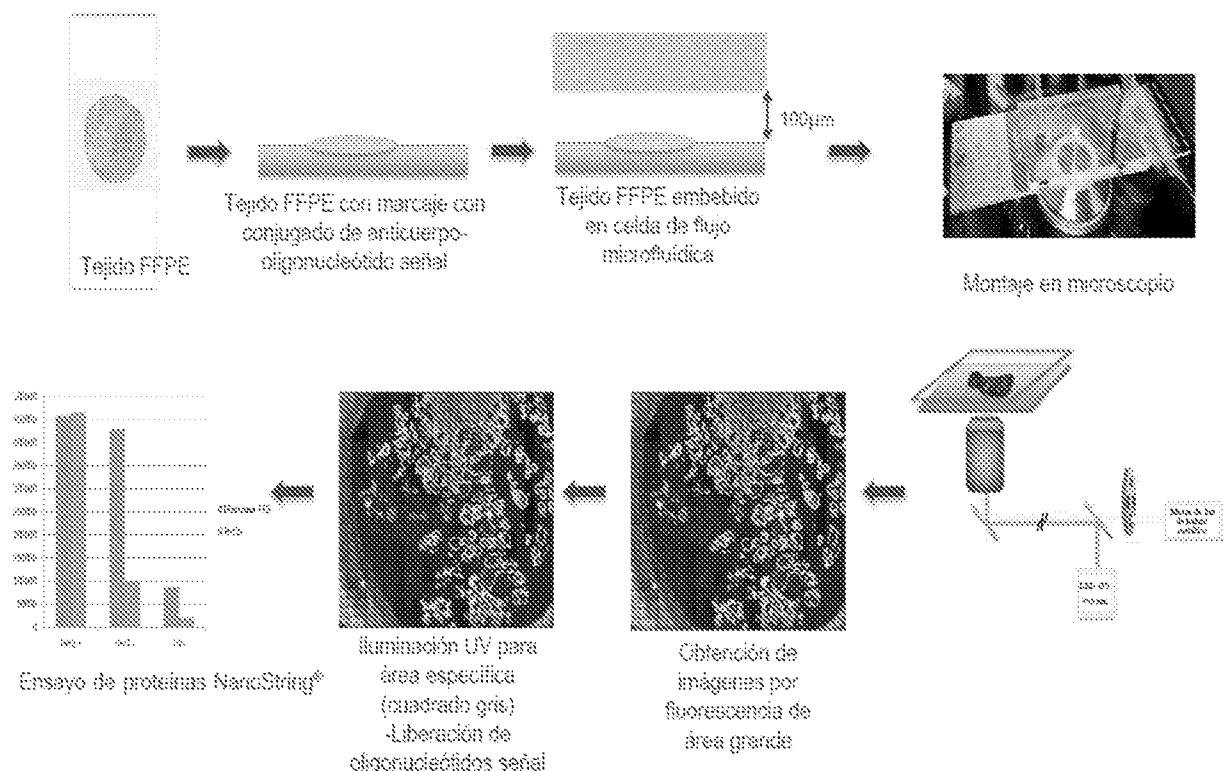


Figura 33



Figura 34

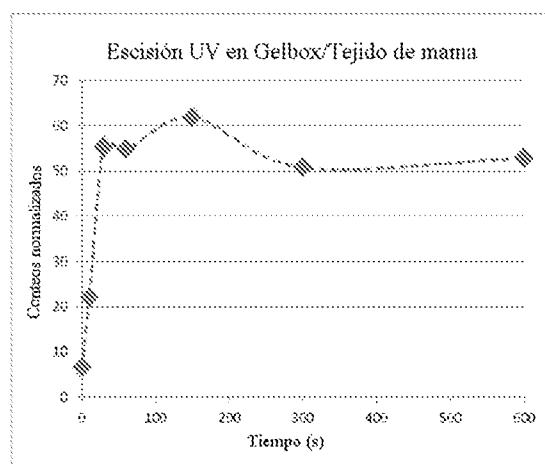


Figura 35

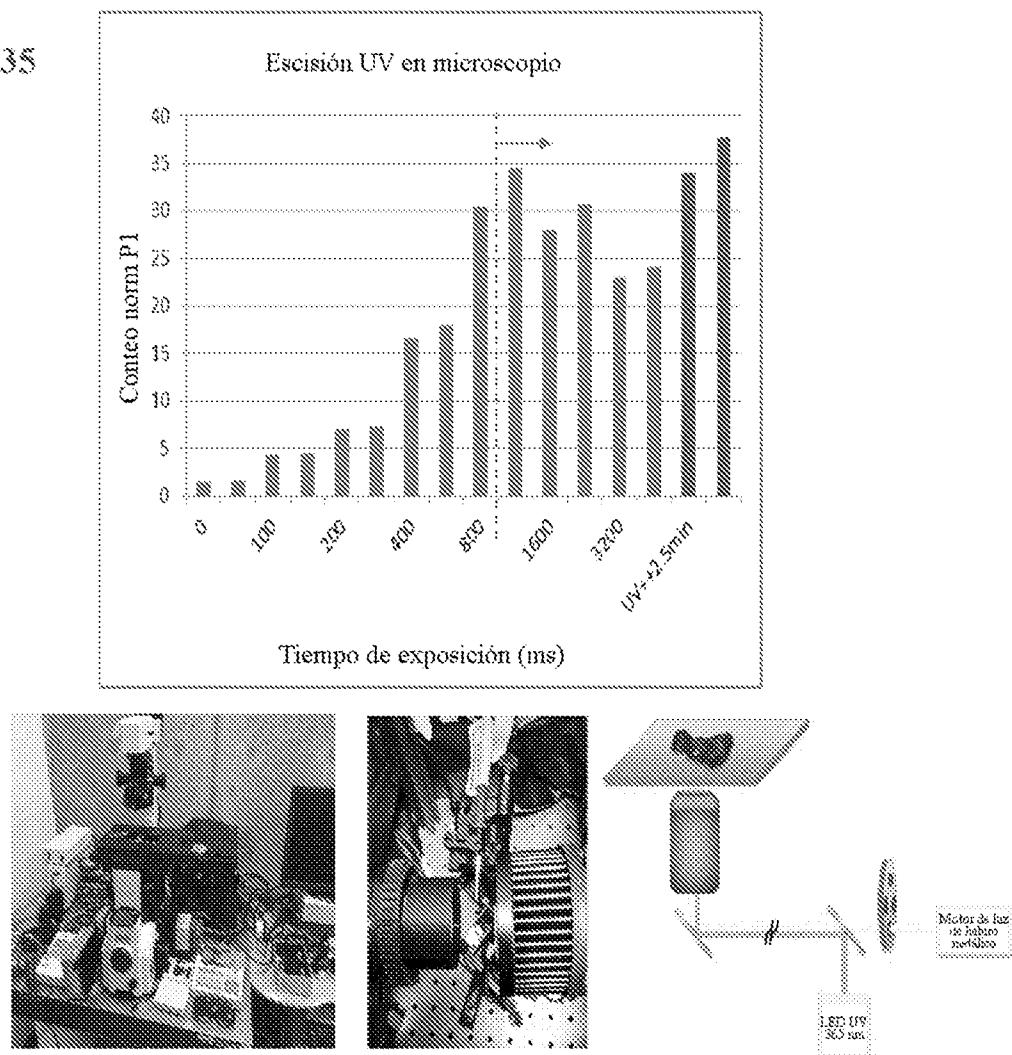


Figura 36

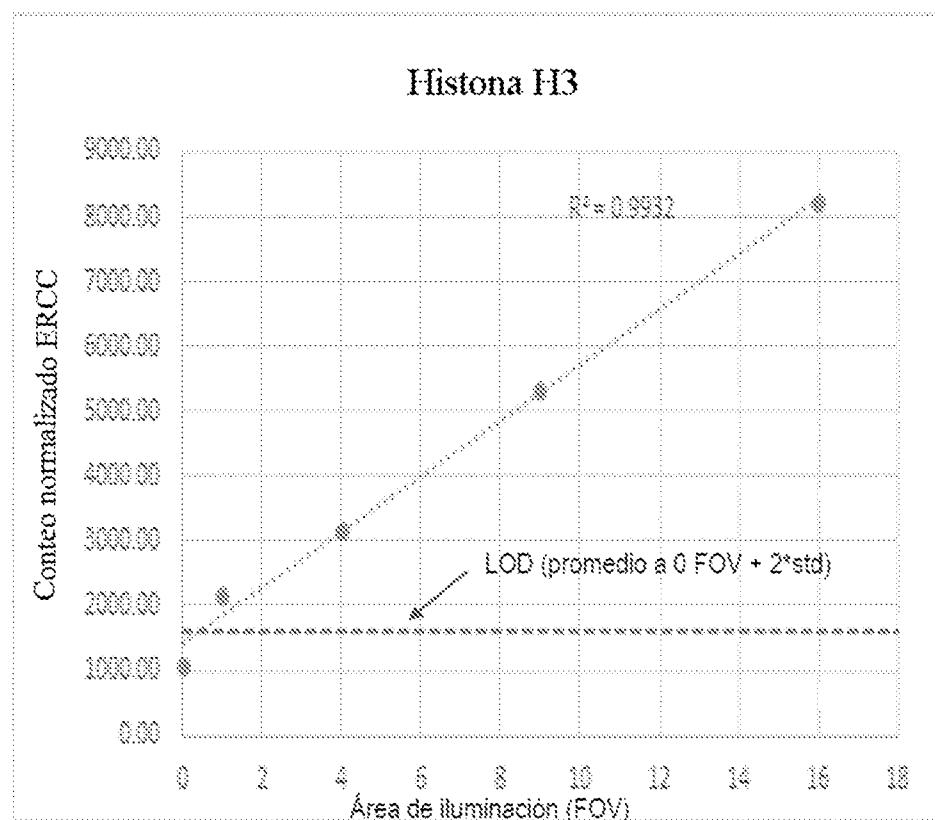


Figura 37

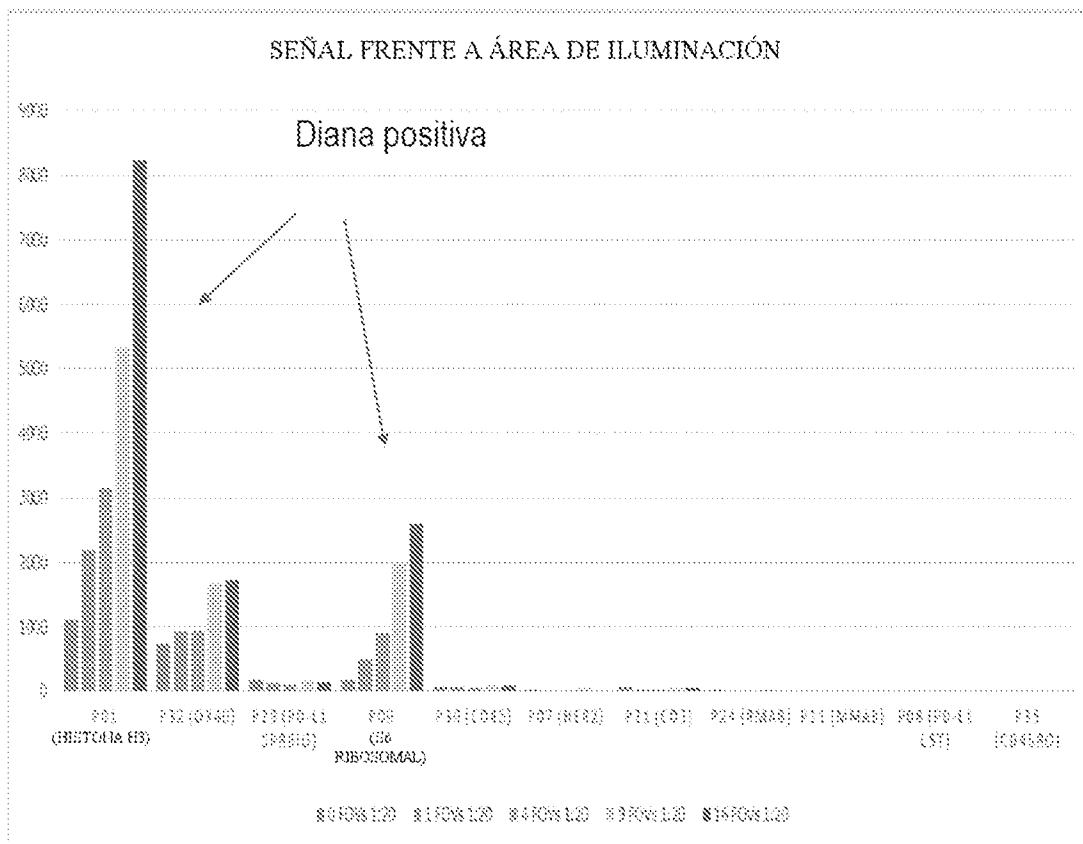


Figura 38

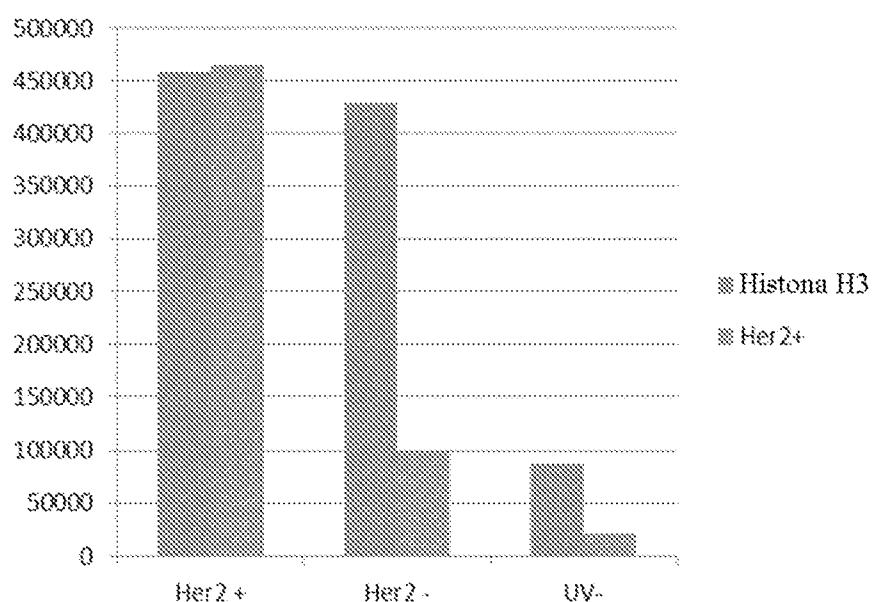
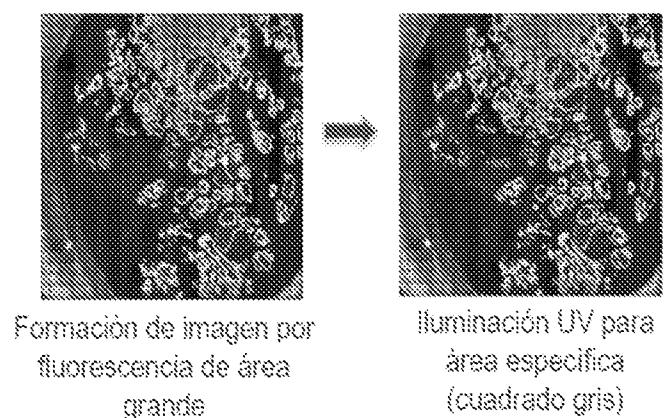


Figura 39

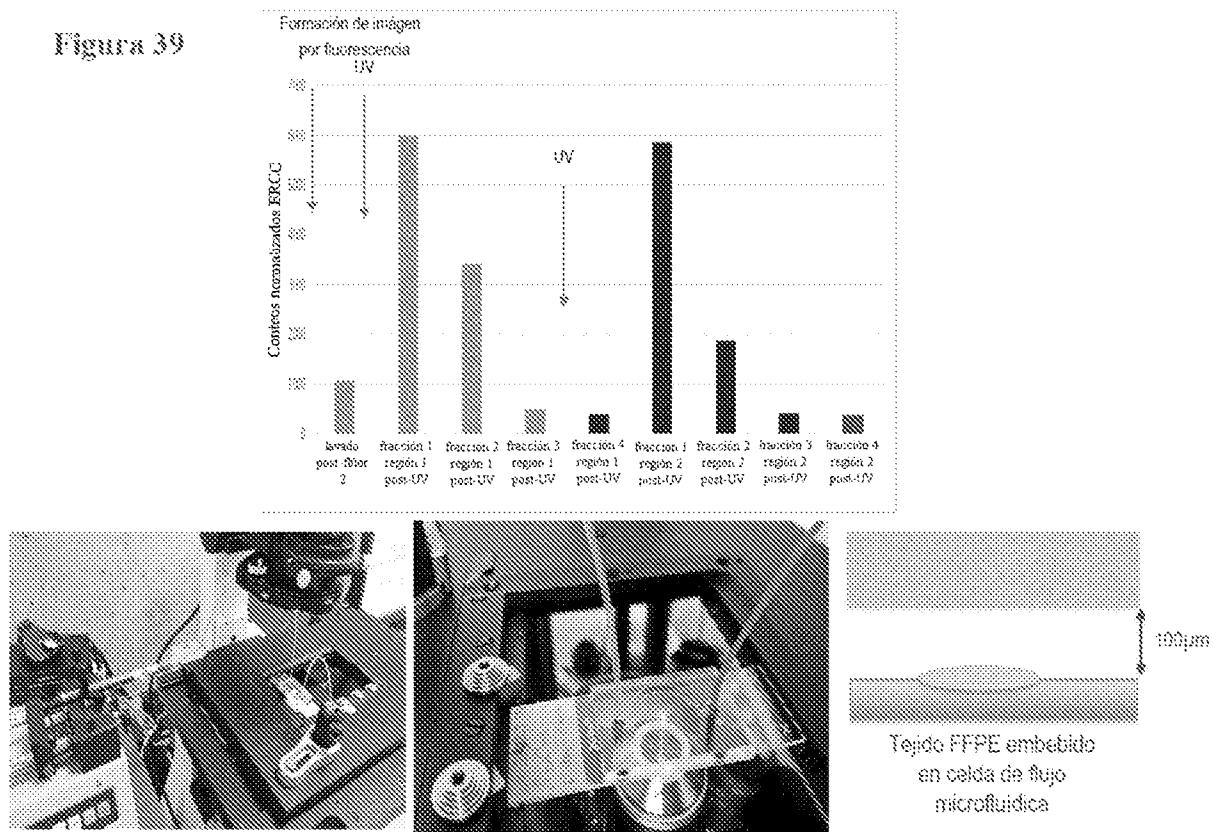


Figura 40

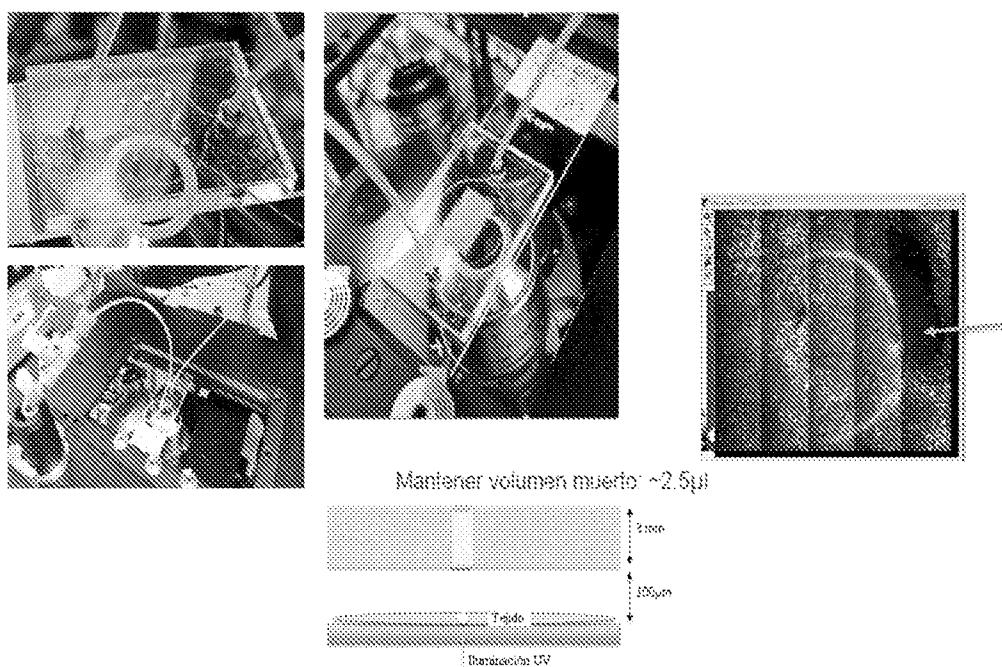


Figura 41A.

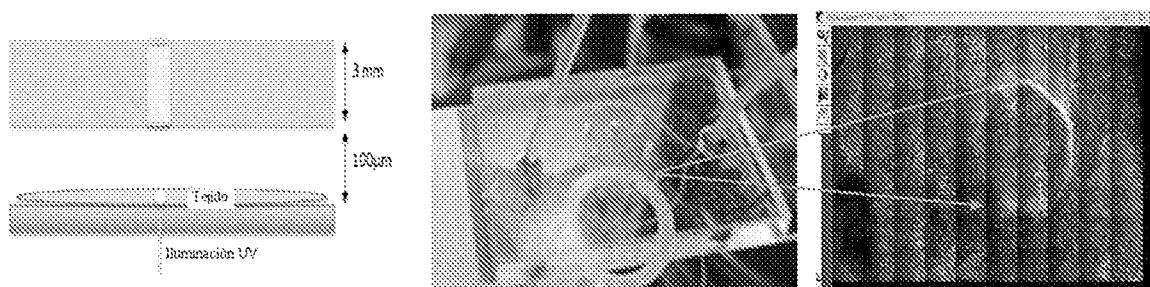
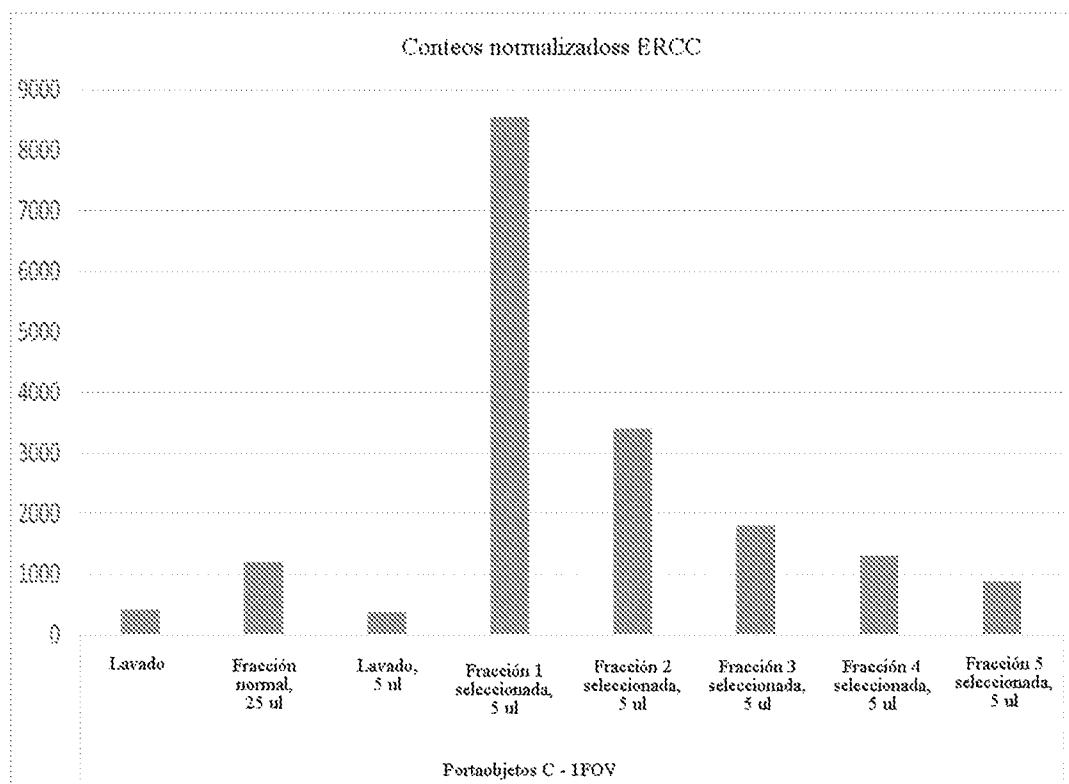


Figura 41B



ES 2 975 361 T3

Figura 41C

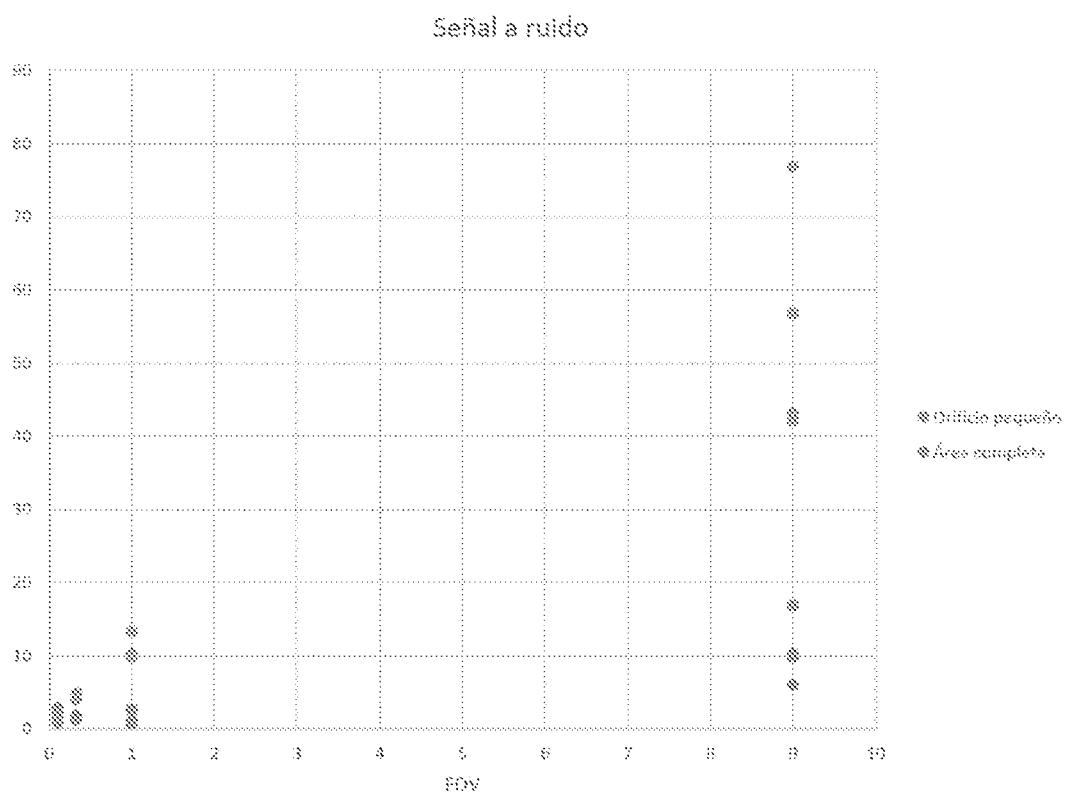
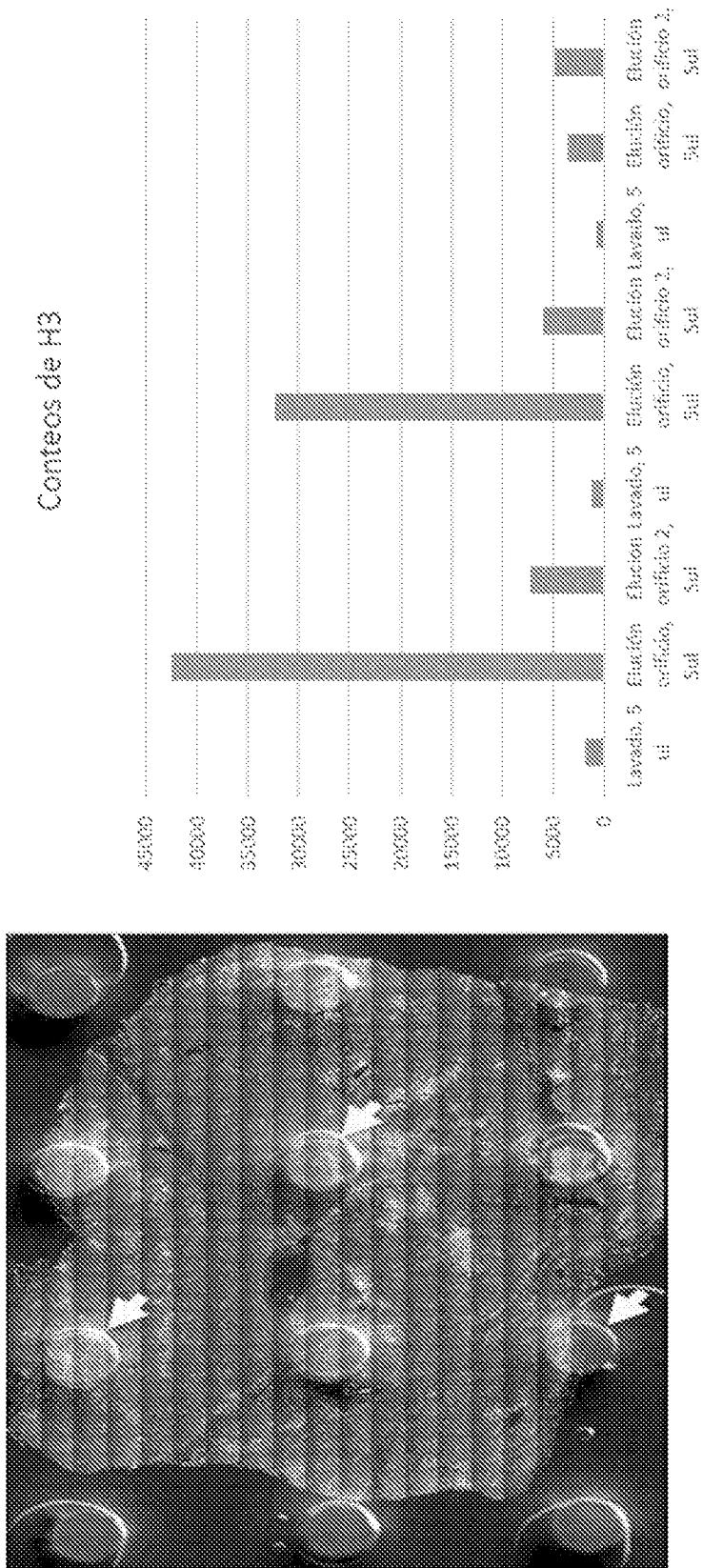


Figure 42A

Formato de 12 orificios



ES 2 975 361 T3

Figure 42B

formato de 96 artículos

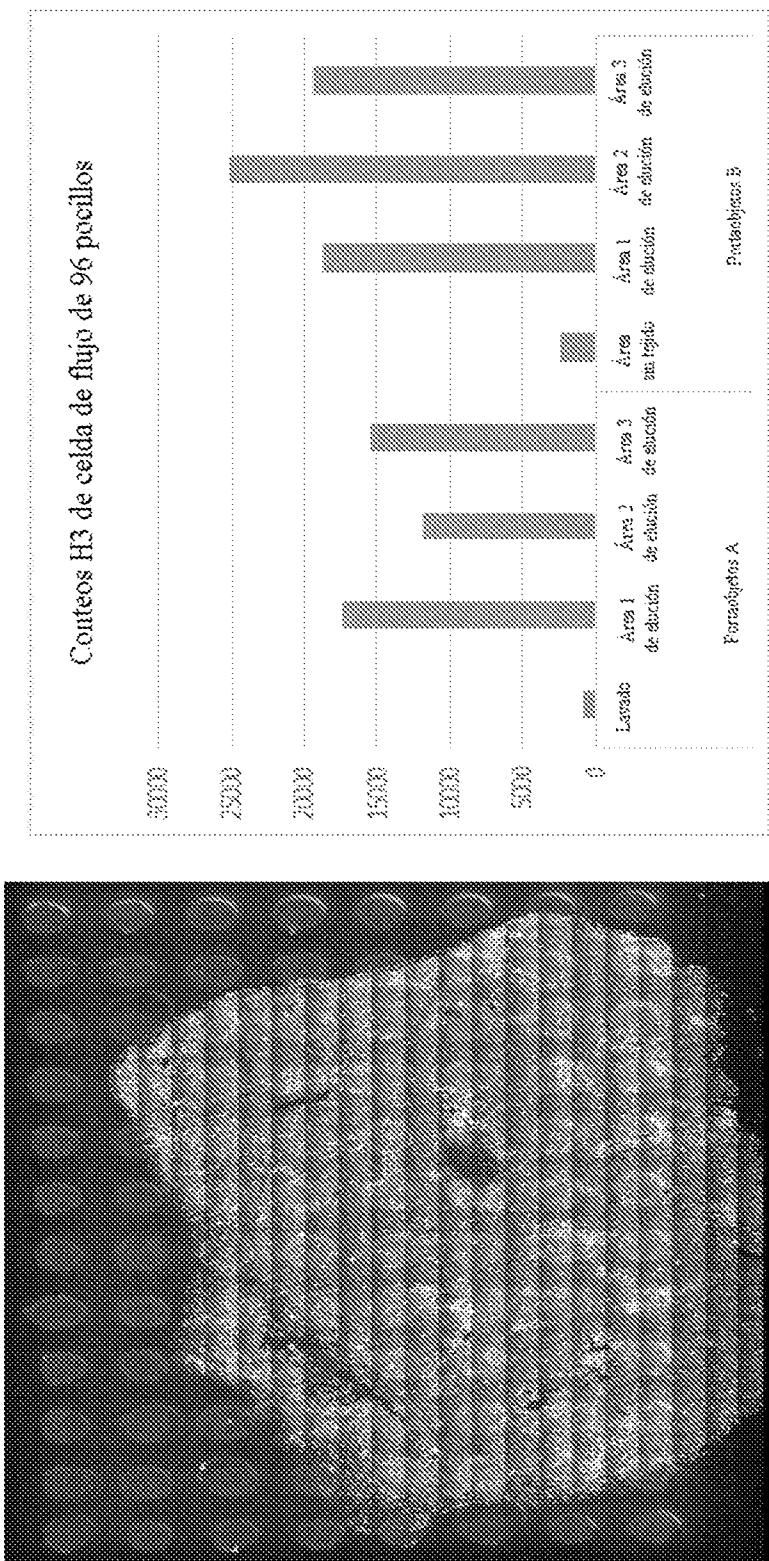
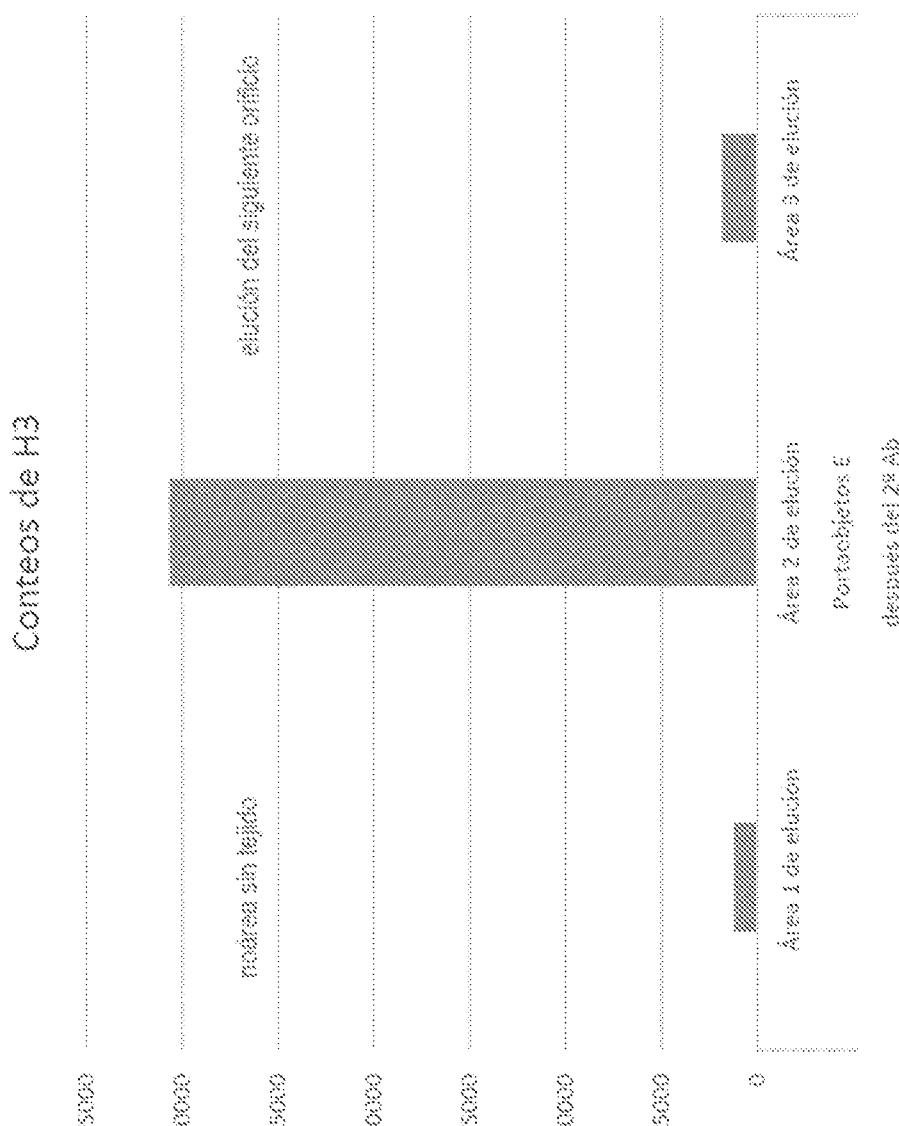


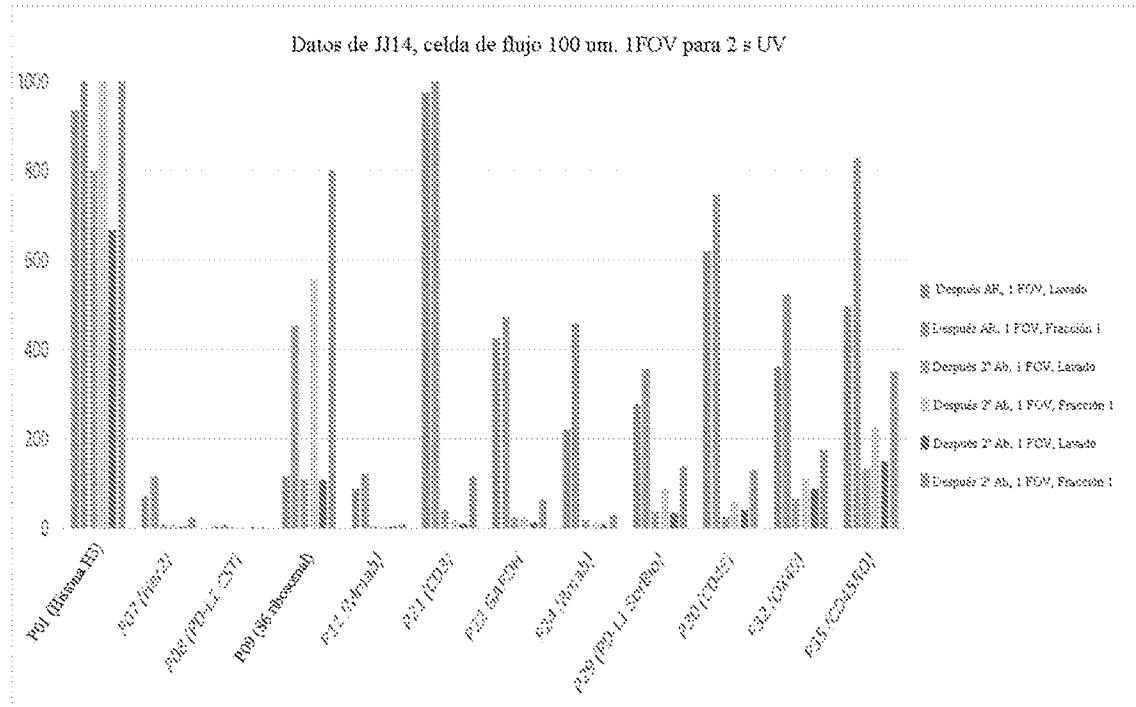
Figure 42C

ES 2 975 361 T3



ES 2 975 361 T3

Figura 43A



ES 2 975 361 T3

Figura 43B

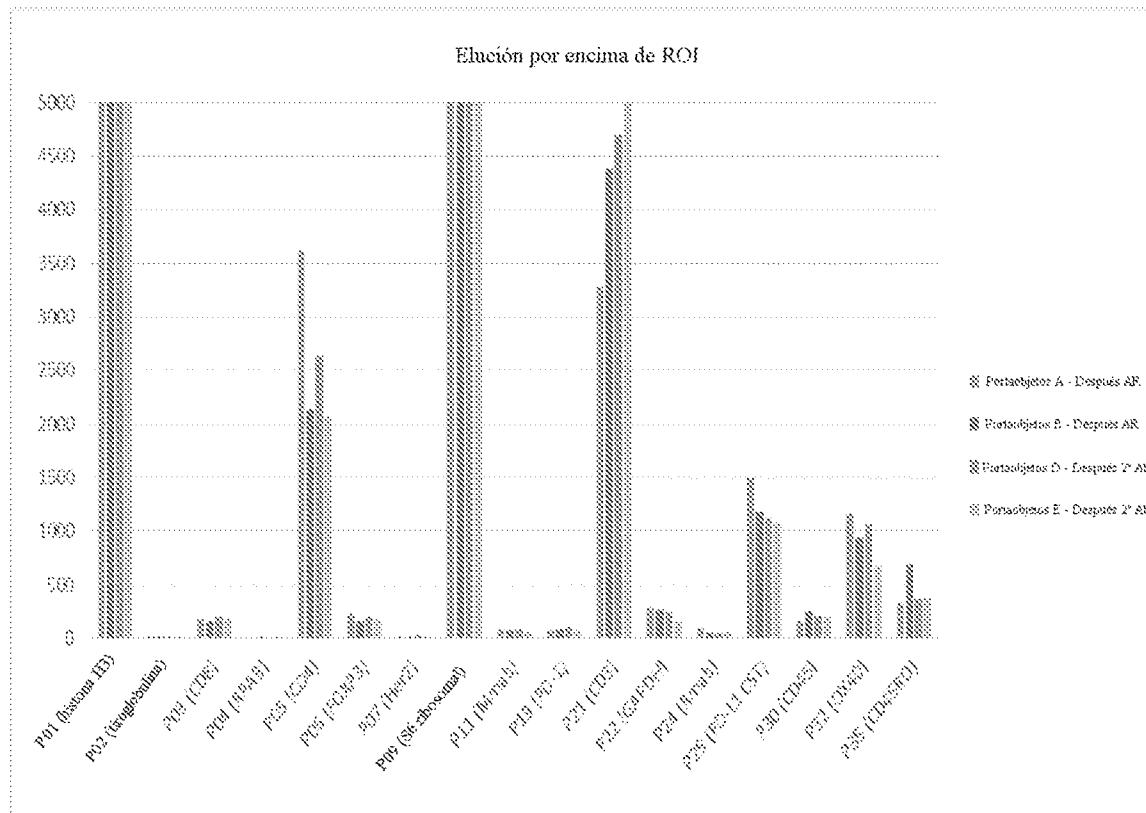


Figura 44

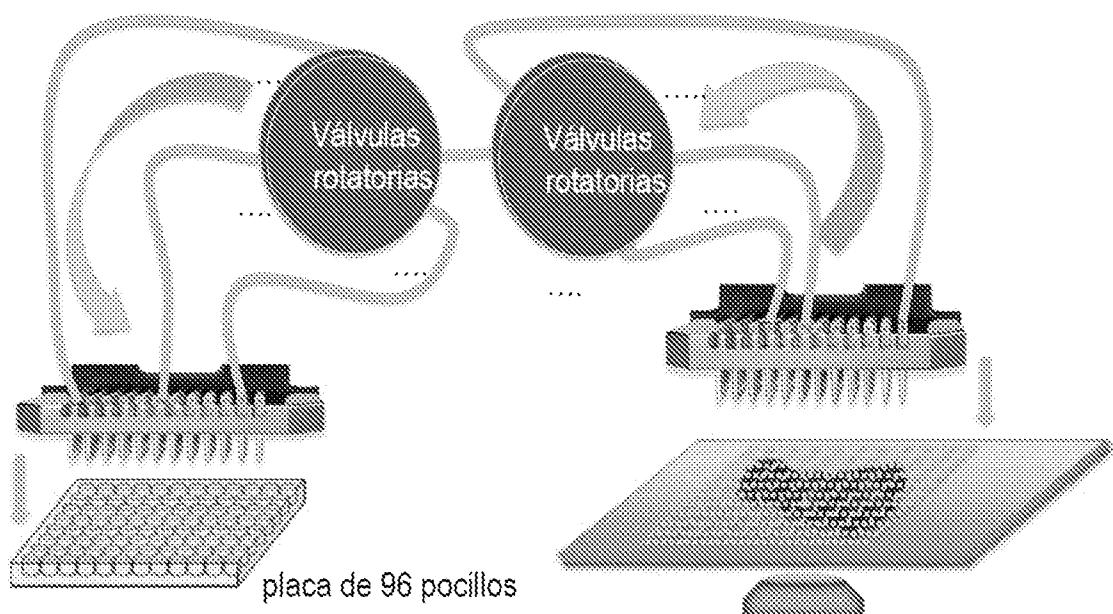


Figura 45

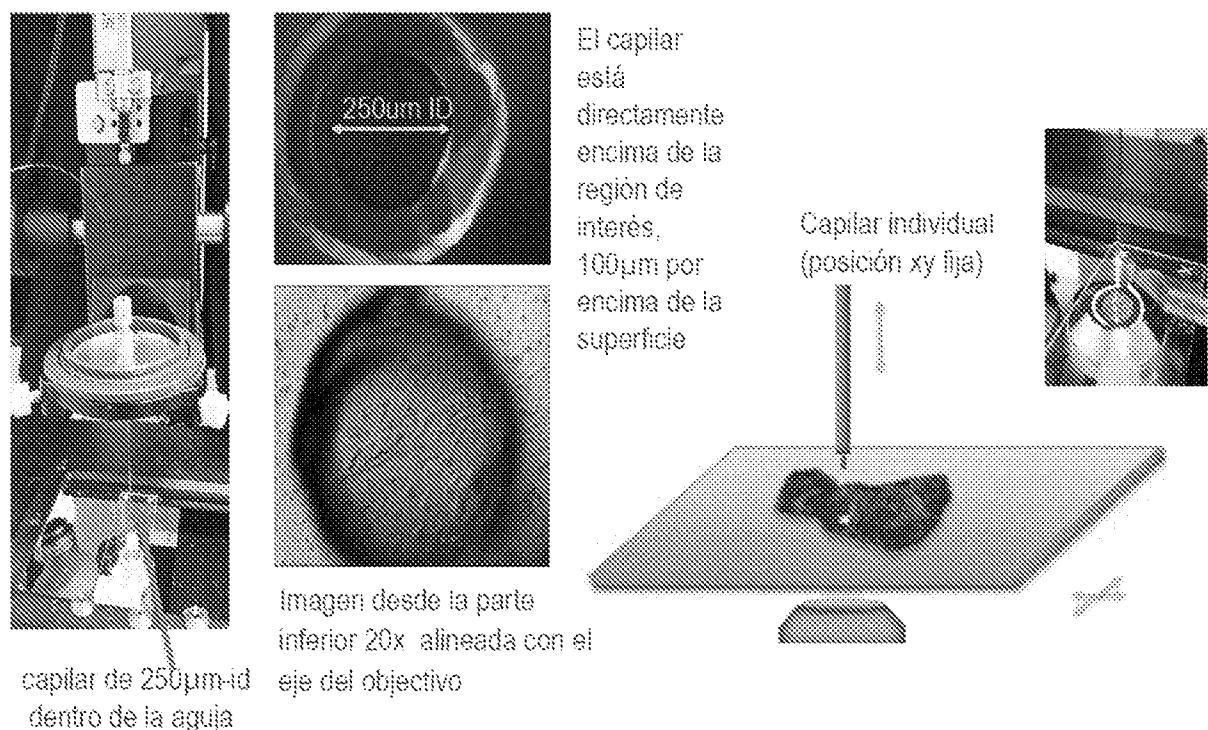


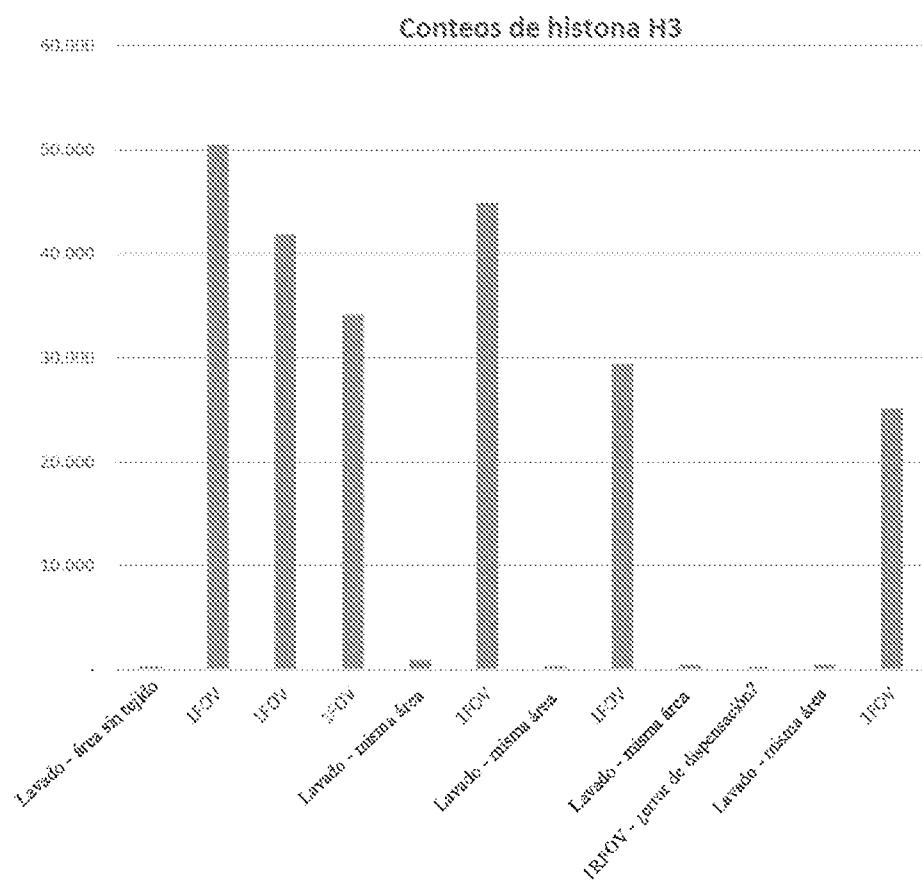
Figura 46A

Figura 46B

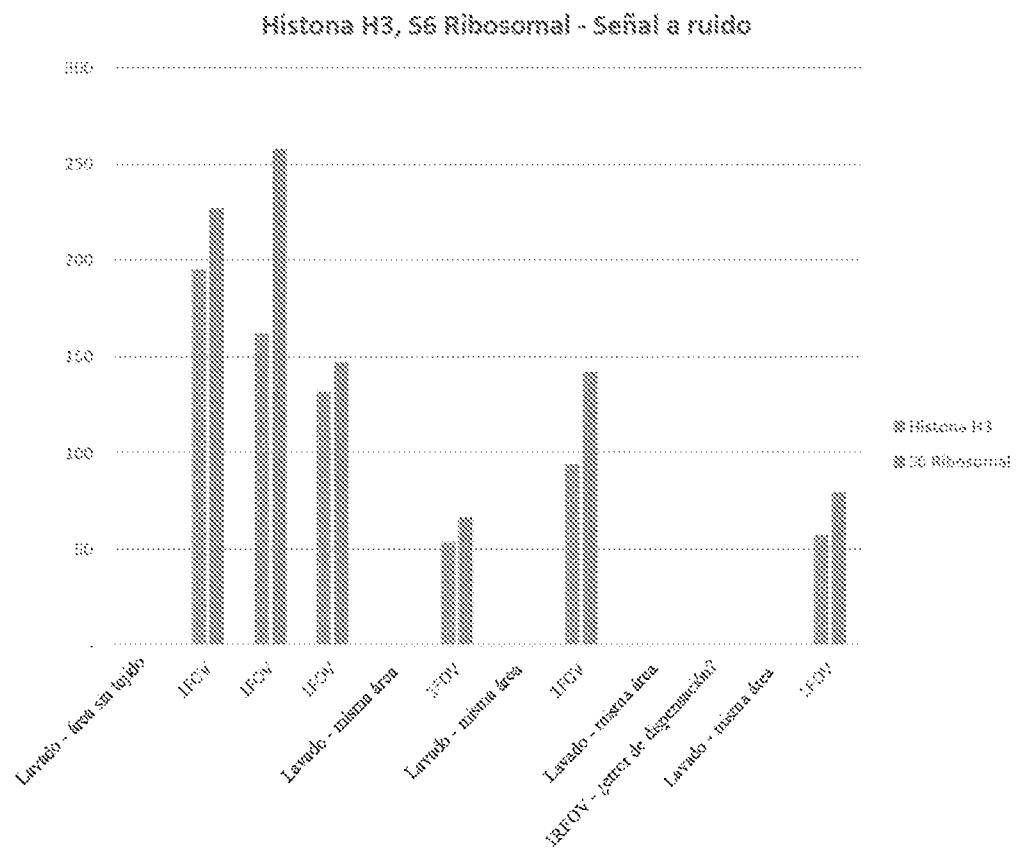


Figura 47

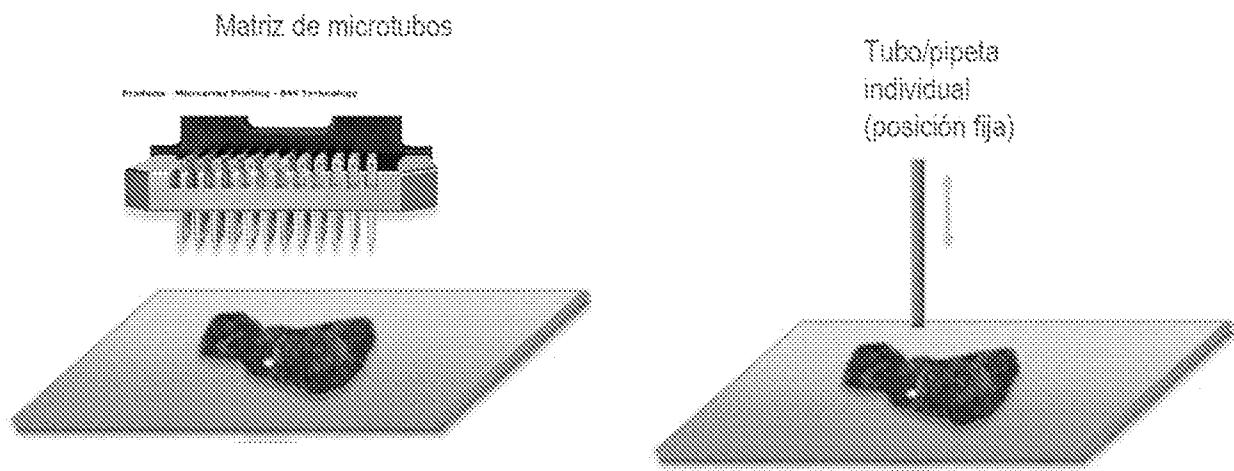


Figura 48

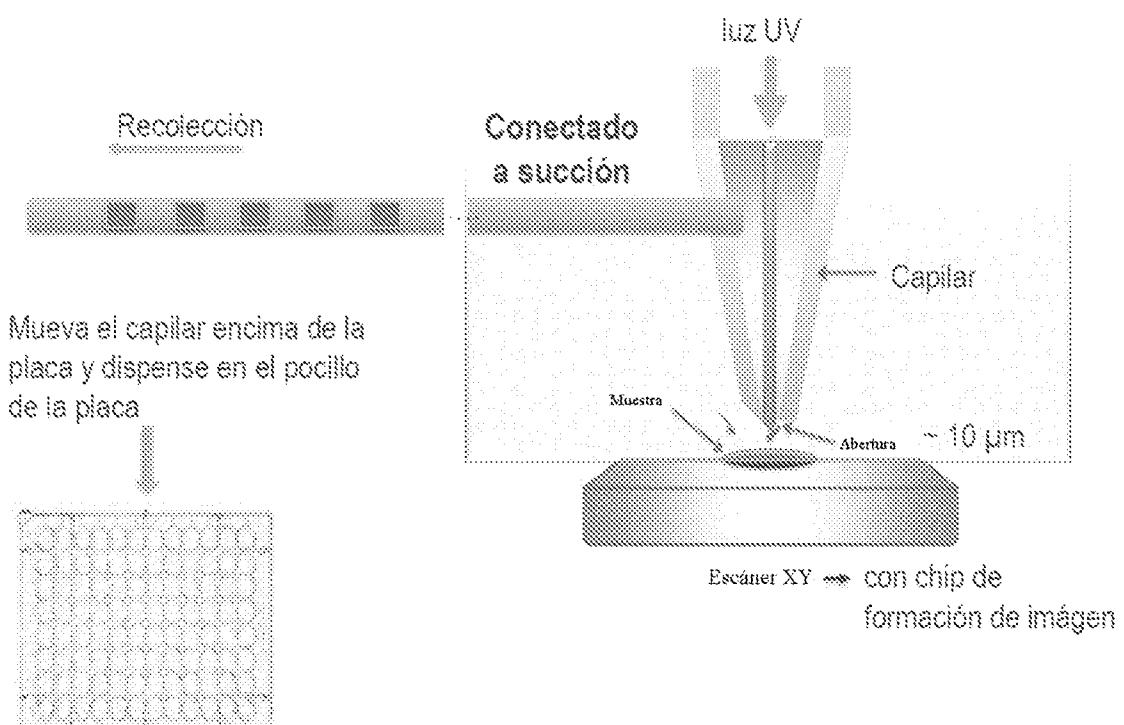


Figura 49

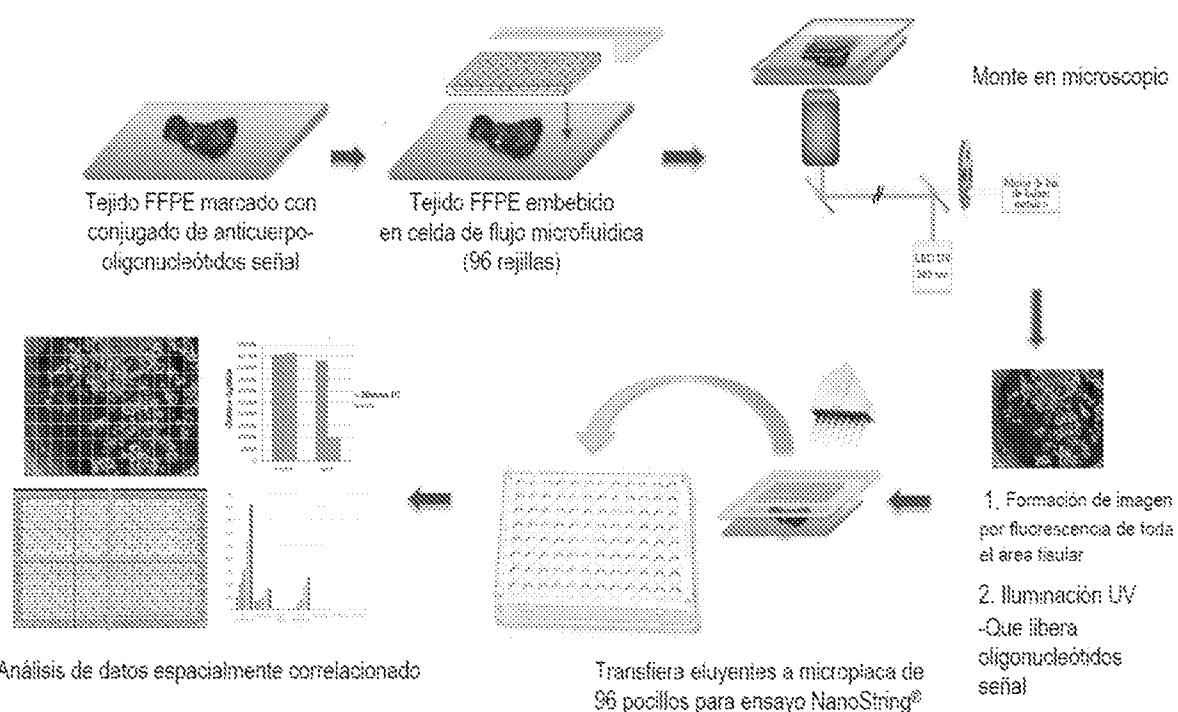


Figura 50

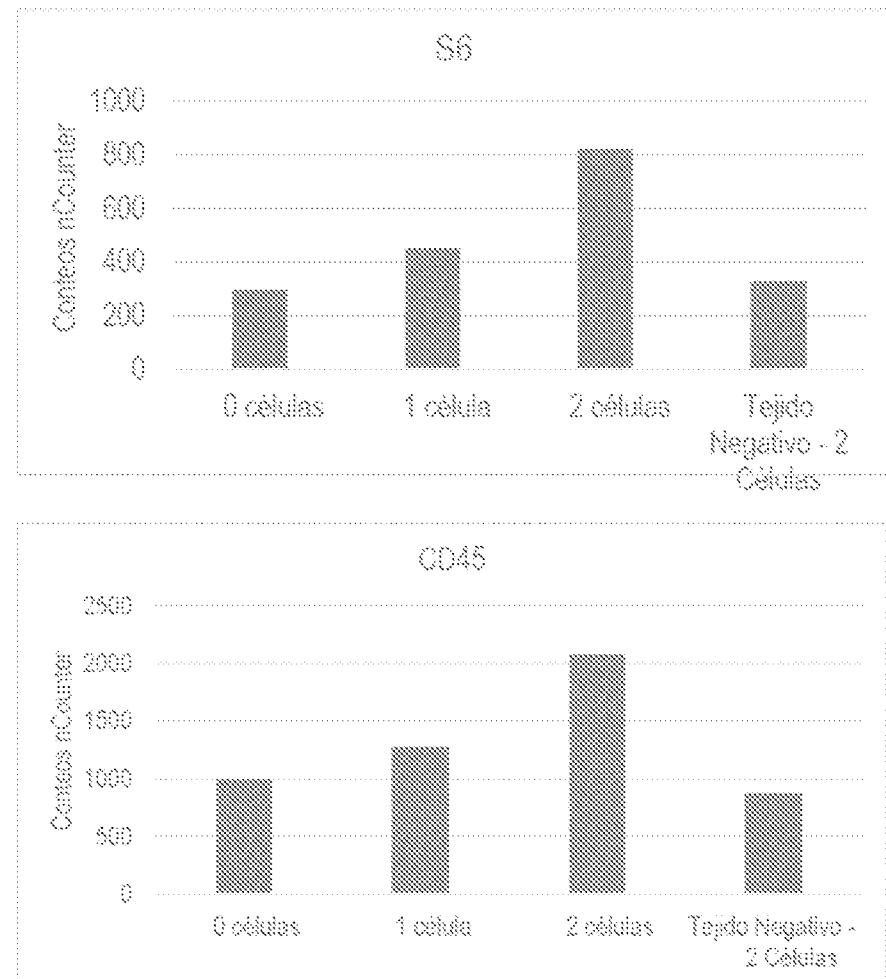


Figura S1

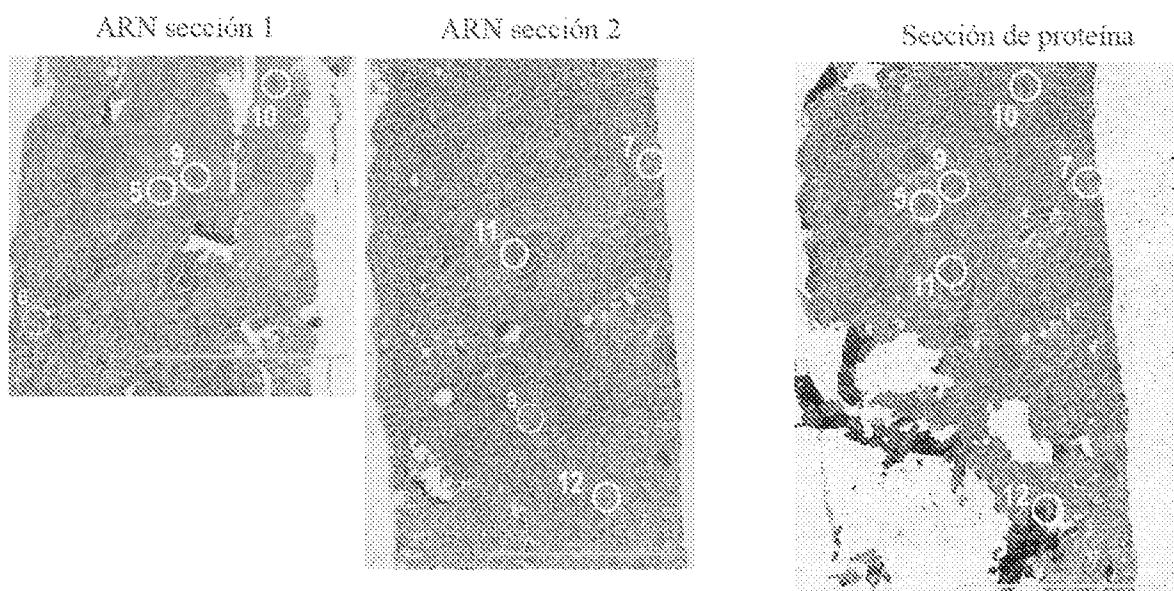
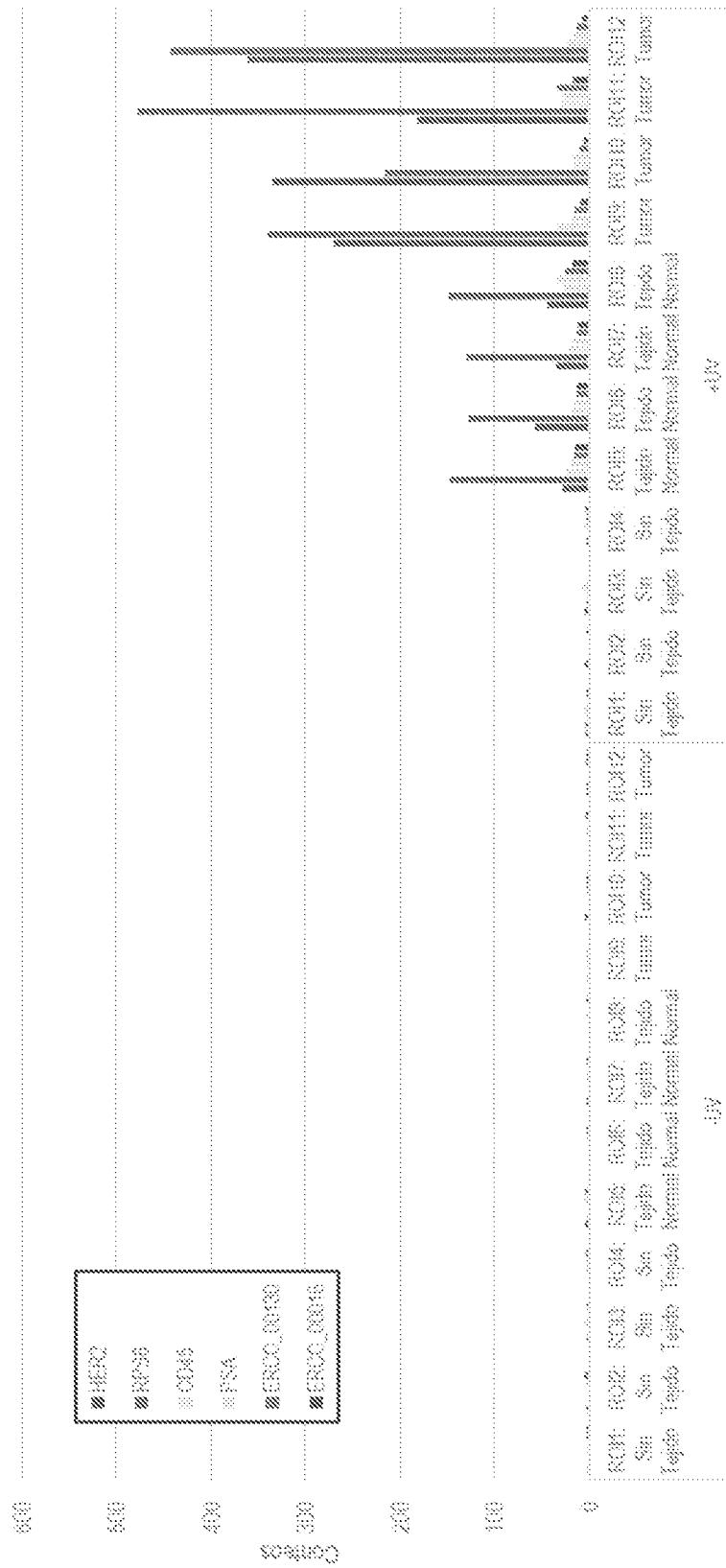


Figure 52

Contencs de sonda de ARN en tejido de mama HER2 3+



ES 2 975 361 T3

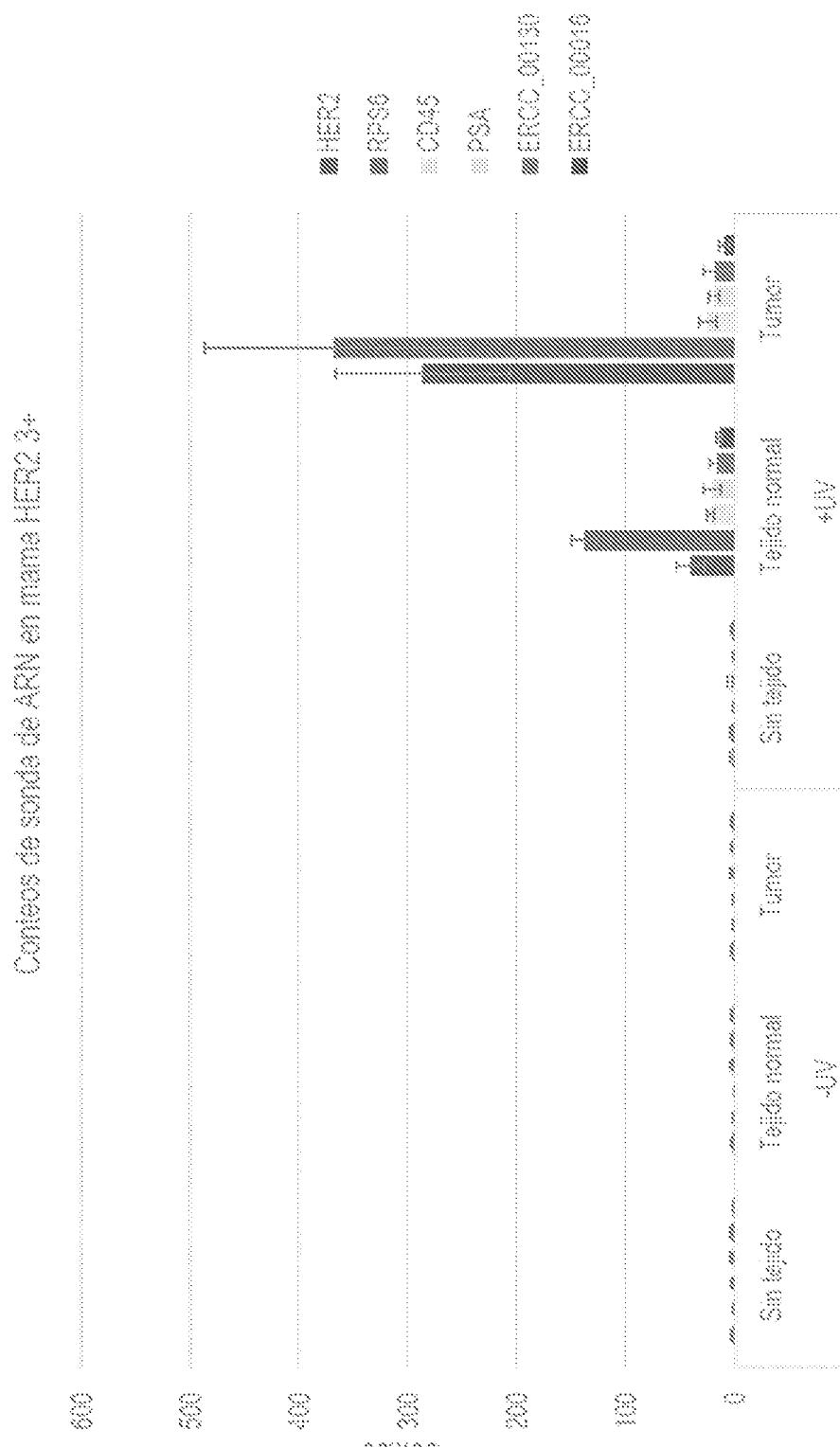


Figura 53

ES 2 975 361 T3

Figure 54

Centros de servicios de ARN en red de manejo HER2

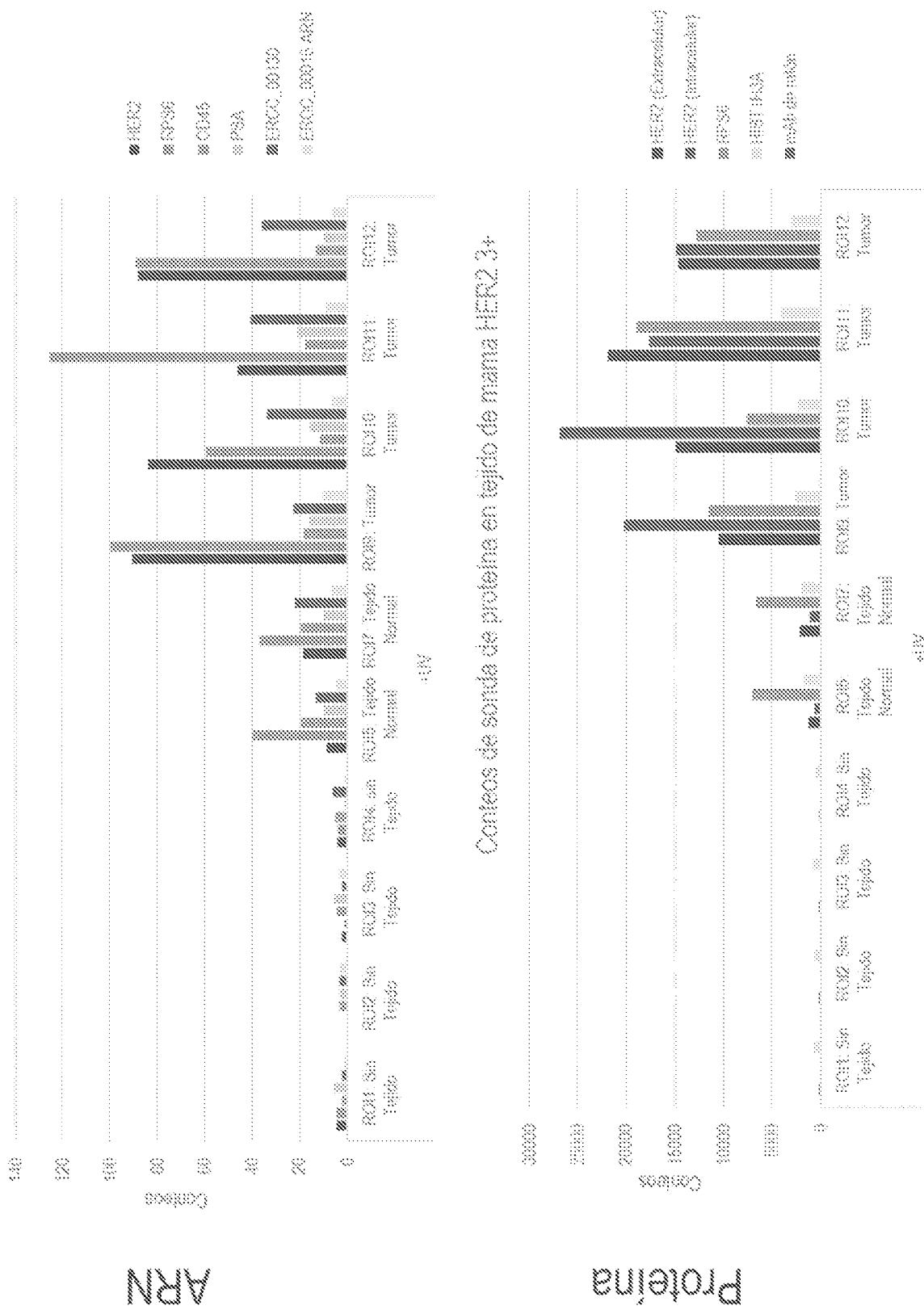
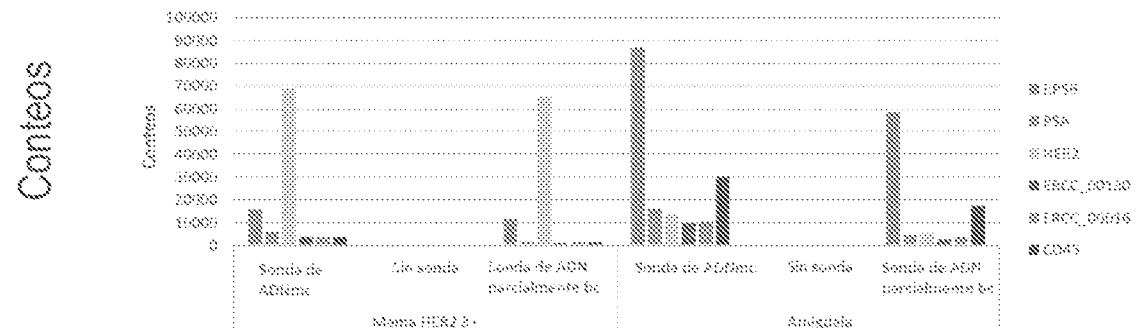
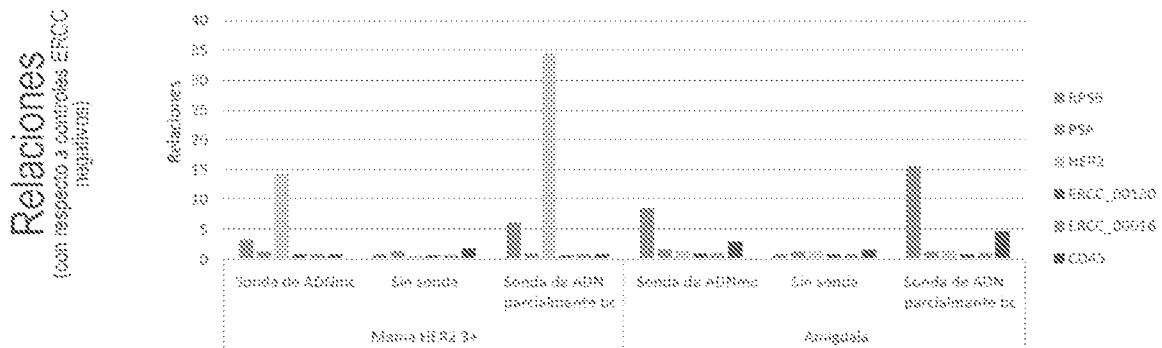


Figura 55

Expresión de ARN detectada mediante sondas de ADN monocatenario
y parcialmente bicatenario



Relaciones de expresión de ARN detectada mediante sondas de ADN monocatenario y parcialmente bicatenario



Relaciones
(con respecto a controles ERCC
negativos)

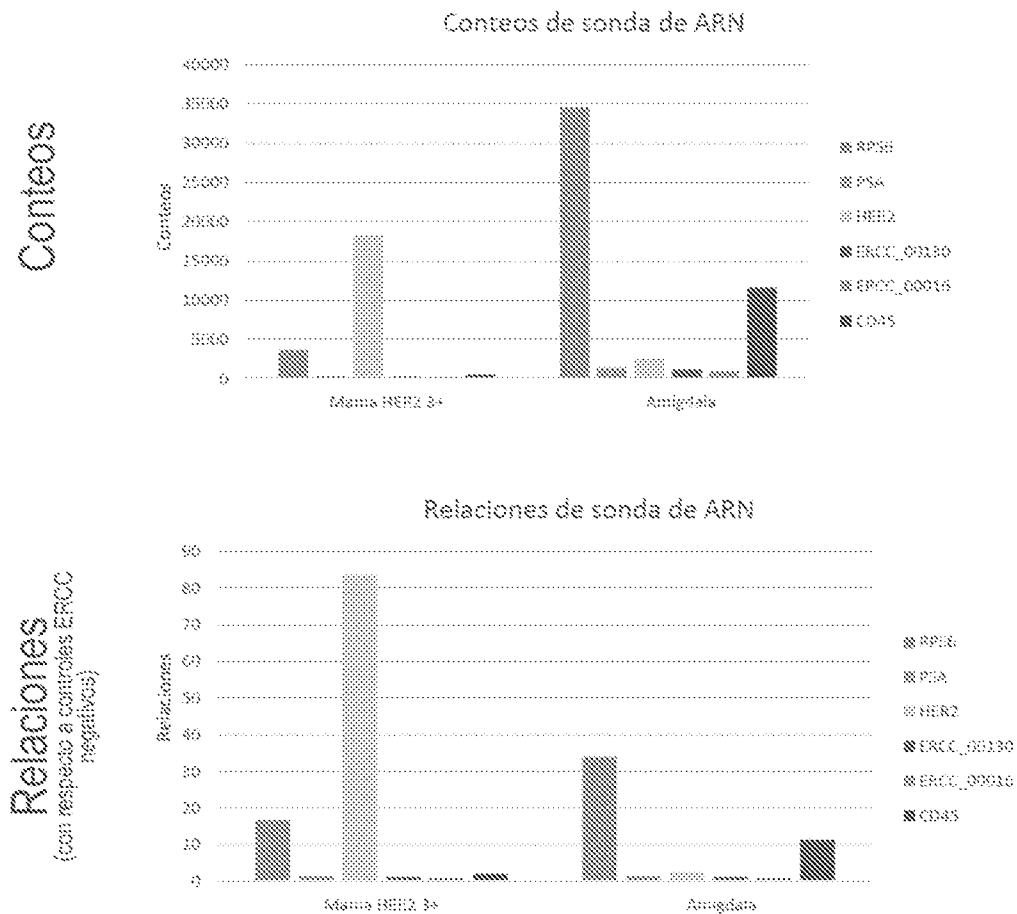
Figura 56

Figura 57

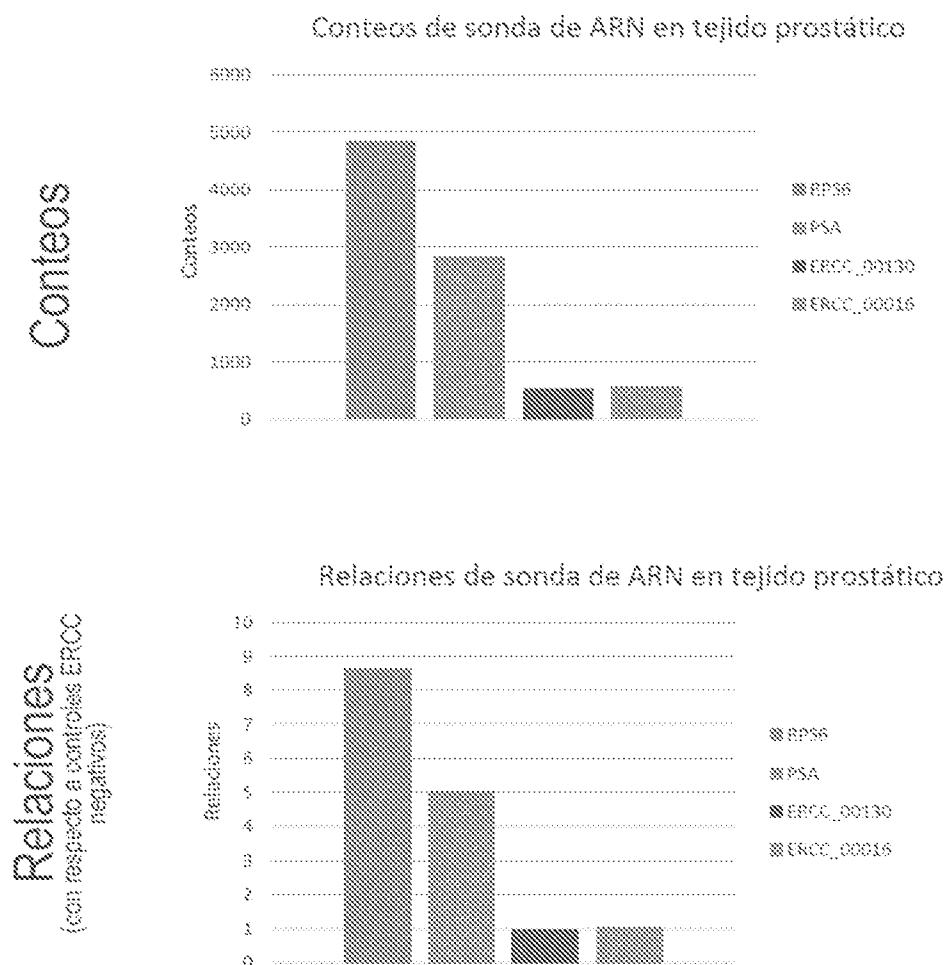


Figura 58

