

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 459 725**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/542

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2007 E 11175116 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2381257**

(54) Título: **Análisis secuencial de muestras biológicas**

(30) Prioridad:

**16.11.2006 US 560599
28.09.2007 US 864085**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2014

(73) Titular/es:

**GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US**

(72) Inventor/es:

**PANG, ZHENGYU;
FILKINS, ROBERT, JOHN;
MONTALTO, MICHAEL, CHRISTOPHER;
GINTY, FIONA;
GERDES, MICHAEL, J;
CAN, ALI;
BRESNAHAN, MAUREEN, ANN y
SOOD, ANUP**

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 459 725 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

Análisis secuencial de muestras biológicas

Antecedentes

- 5 En la presente memoria se describen métodos para analizar secuencialmente una muestra biológica para discernir, entre otras cosas, la presencia, la ausencia, la concentración y/o la distribución espacial de múltiples dianas biológicas en la muestra biológica.
- 10 En biología y en medicina se pueden usar diversos métodos para observar diferentes dianas en una muestra biológica. Por ejemplo, el análisis de proteínas en secciones histológicas y otras preparaciones citológicas se puede llevar a cabo usando las técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica (IHC) o inmunofluorescencia. El análisis de proteínas en muestras biológicas también se puede llevar a cabo usando inmunoensayos de estado sólido, por ejemplo, usando las técnicas de immunotransferencia western blot.
- 15 Muchas de las técnicas actuales pueden detectar solo unas pocas dianas a la vez (tal como, IHC o western blots basados en fluorescencia en los que el número de dianas detectables está limitado por el sistema de detección basado en fluorescencia) en una única muestra. Otros análisis de dianas pueden requerir el uso de muestras biológicas adicionales de la fuente lo que limita la capacidad para determinar las características relativas a las dianas, tales como la presencia, la ausencia, la concentración y/o la distribución espacial de múltiples dianas biológicas en la muestra biológica. Además, en determinados casos, puede haber disponible solo una cantidad limitada de muestra para el análisis o la muestra individual puede requerir un análisis adicional. Por lo tanto, se necesitan métodos, agentes y dispositivos capaces de analizar iterativamente una muestra individual.
- 20 El documento US 2003/073149 A1 describe composiciones de inmunomarcado y métodos para su uso en la detección y la medida de una o más dianas en una muestra biológica.
- El documento WO 02/079771 A1 describe un método para eliminar manchas de metales de transición de muestras biológicas que incluyen proteínas, ADN y ARN.
- 25 El documento WO 00/20641 describe un método que comprende combinar tinción morfológica y/o inmunohistoquímica con hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) en la misma sección de una muestra de tejido.

Breve descripción

La presente invención proporciona un método para sondear dianas múltiples en una muestra biológica que comprende una sección de tejido, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una sección de tejido que contiene dianas múltiples.
- 30 (b) unir al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo a una o más dianas presentes en la sección de tejido;
- (c) unir al menos una sonda de control a una o más dianas presentes en la sección de tejido;
- 35 (d) detectar al menos una señal procedente de la al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo unida en la etapa (b) y detectar al menos una señal de control procedente de la al menos una sonda de control unida en la etapa (c);
- (e) aplicar a la muestra de la etapa (d) una disolución que comprende un agente oxidante que desactiva selectivamente la(s) marca(s) de fluoróforo de la al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo y no la(s) sonda(s) de control;
- 40 (f) unir al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo a una o más dianas presentes en la muestra después de la etapa (e); y
- (g) detectar al menos una señal procedente de la al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo unida en la etapa (f).

Descripción de las figuras

FIG. 1: muestra el espectro de absorbancia de la Muestra 1 en función de la longitud de onda, después de 10 minutos y de 15 minutos.

FIG 2: muestra el espectro de absorbancia de las Muestras 1, 2 y 3 en función de la longitud de onda.

FIG. 3: muestra el espectro de absorbancia de la Muestra 4 en función de la longitud de onda, tras 30 minutos y tras 140 minutos.

FIG. 4: muestra el espectro de absorbancia de la Muestra 5 en función de la longitud de onda, tras 20 minutos, 60 minutos y 210 minutos.

FIG. 5: muestra el espectro de absorbancia de la Muestra 6 en función de la longitud de onda, tras 12 minutos y 16 minutos.

5 FIG. 6: muestra el espectro de absorbancia de la Muestra 8 en función de la longitud de onda, tras 22 minutos, 70 minutos y 210 minutos.

FIG. 7: muestra el espectro de absorbancia de las Muestras 9a, 10a y 11a en función de la longitud de onda.

FIG. 8: muestra el espectro de absorbancia de las Muestras 9b y 10b en función de la longitud de onda.

FIG. 9: muestra el espectro de absorbancia de las Muestras 12a y 12b en función de la longitud de onda.

10 FIG. 10: muestra el espectro de absorbancia de las Muestras 13, 14 y 15 en función de la longitud de onda.

FIG. 11: muestra el espectro de absorbancia de las Muestras 16 y 17 en función de la longitud de onda.

FIG. 12: muestra las microfotografías (con un aumento de 10x) de la Muestra 18A (antes de modificación de señal) y de la Muestra 18B (después de modificación de señal).

15 FIG. 13: muestra las microfotografías (con un aumento de 10x) de la Muestra 19A (antes de modificación de señal) y de la Muestra 19B (después de modificación de señal).

FIG. 14: muestra las microfotografías de la Muestra 20A (antes de la modificación de señal) y la Muestra 20B (tras modificación de señal).

FIG. 15: muestra las microfotografías de las Muestras 21A y 21B (antes de la modificación de señal) y la Muestra 21C (tras modificación de señal).

20 FIG. 16: muestra las microfotografías de las Muestras 22A y 22B (antes de la modificación de señal) y la Muestra 22C (tras modificación de señal).

FIG. 17: muestra las microfotografías de las Muestras 23 A-E.

FIG. 18: muestra las microfotografías de la Muestra 24A (antes de la modificación de señal) y la Muestra 24B (tras modificación de señal).

25 FIG. 19: muestra las microfotografías de la Muestra 25A (canales Cy3 y Cy5), la Muestra 25B (canales Cy3 y Cy5) y las Muestras 25C-25J.

FIG. 20: muestra las microfotografías de las muestras 26A-H.

FIG. 21: muestra las microfotografías de las muestras 27A-C.

30 FIG. 22: muestra la representación de la intensidad de píxel media del ruido de fondo para cada ciclo en la obtención de imágenes del Ejemplo 20.

FIG. 23: muestra la comparación entre las microfotografías de las Muestras 28A-C y 29A-C.

FIG. 24: muestra las microfotografías de las Muestras 30A-D.

FIG. 25: muestra las microfotografías de las Muestras 30C-F.

35 FIG. 26: muestra la representación de la intensidad de píxel media del ruido de fondo para cada ciclo para las Muestras 30C y 30D.

FIG. 27: muestra las microfotografías de las Muestras 31A, 31B y 31C.

FIG. 28: muestra las microfotografías de las Muestras 32A, 32B y 32C.

FIG. 29: muestra las microfotografías de las Muestras 33, 34, 35 y 36.

FIG. 30: muestra los gráficos de dotplot de las muestras 37, 38, 39 y 40.

40 FIG. 31: muestra el gráfico de barras de las intensidades relativas de señal de los dots correspondientes a las Muestras 37, 38, 39 y 40.

FIG. 32: muestra el perfil temporal de los espectros de Cy3 y Cy5.

FIG. 33: muestra los valores de absorbancia de Cy3 en función del tiempo para diferentes concentraciones de H₂O₂.

FIG. 34: muestra los valores de absorbancia en función del tiempo para diferentes fluoróforos.

FIG. 35: muestra los valores de absorbancia QD 655 en función del tiempo para H₂O₂.

FIG. 36: muestra el espectro de absorbancia para fluoresceína usando H₂O₂.

5 Descripción detallada

Para describir más clara y concisamente, y destacar la materia objetivo de la invención reivindicada, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se usan en la descripción presentada a continuación y en las reivindicaciones anexas.

10 Las formas singulares “un/uno/una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Se puede aplicar un lenguaje de aproximación, tal como el usado aquí en toda la especificación y reivindicaciones, para modificar cualquier representación cuantitativa que pudiera variar permisiblemente sin producir un cambio en la función básica a la que se refiere. Por consiguiente, un valor modificado por un término tal como “aproximadamente” no está limitado al valor exacto especificado. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de 15 reacción, empleados en la especificación y reivindicaciones deben entenderse como modificables en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos fijados en la siguiente especificación y reivindicaciones anexas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busque obtener mediante la presente invención. Como mínimo, cada parámetro numérico debería construirse al menos en relación al número de dígitos significativos reportados y 20 aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

Definiciones

Para describir más clara y concisamente, y destacar la materia objetivo de la invención reivindicada, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se usan en la descripción presentada a continuación y en las reivindicaciones anexas.

25 Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina que se une específicamente y por ello se define como complementaria a una organización espacial particular y polar de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica tales como la inmunización de un hospedante y la recolección de suero (policlonal), o preparando líneas celulares híbridas continuas y recolectando la proteína secretada (monoclonal), o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas, que codifican al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isótipos, tal como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM. Los fragmentos de anticuerpos funcionales pueden incluir porciones de un anticuerpo capaz de retener la unión con una afinidad similar a anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, Fab, Fv y F(ab')₂ ó Fab'). Adicionalmente, se pueden usar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado, siempre que se mantenga sustancialmente la afinidad de unión a una molécula particular.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “elemento de unión” se refiere a una molécula que puede unirse a una o más dianas de una muestra biológica. Un elemento de unión puede unirse a una diana de forma específica.

40 Los elementos de unión adecuados pueden incluir uno o más péptidos naturales o modificados, proteínas (p.ej. anticuerpos, aficuerpos o aptámeros), ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos, ADN, ARN o aptámeros); polisacáridos (p.ej., lectinas, azúcares), lípidos, enzimas, sustratos o inhibidores enzimáticos, ligandos, receptores, antígenos o haptenos. Un elemento de unión adecuado puede seleccionarse en función de la muestra que se vaya a analizar y de las dianas disponibles para detección. Por ejemplo, una diana de una muestra puede incluir un ligando y el elemento de unión puede incluir un receptor, o una diana puede incluir un receptor y el elemento de unión puede incluir un ligando. De forma similar, una diana puede incluir un antígeno y el elemento de unión puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o viceversa. En algunas realizaciones, una diana puede incluir un ácido nucleico y el elemento de unión puede incluir un ácido nucleico complementario. En algunas realizaciones, tanto la diana como el elemento de unión pueden incluir proteínas capaces de unirse unas a otras.

45 50 Tal como se emplea en la presente memoria, el término “muestra biológica” se refiere a una muestra obtenida de un sujeto biológico, que incluye una muestra de origen de tejido o fluido biológico obtenida *in vivo* o *in vitro*. Dichas muestras pueden ser, aunque sin limitación, fluidos corporales (p.ej., sangre, plasma sanguíneo, suero u orina), órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de mamíferos que incluyen humanos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de la muestra biológica que incluyan tejidos (p.ej., porciones seccionales de un órgano o tejido). Las muestras biológicas también pueden incluir extractos procedentes de una muestra biológica, por ejemplo, un antígeno de un fluido biológico (p.ej., sangre u orina).

Una muestra biológica puede ser de origen procariótico o de origen eucariótico (p.ej., insectos, protozoos, aves, peces, reptiles). En algunas realizaciones, la muestra biológica es de mamífero (p.ej., rata, ratón, vaca, perro, mono, cobaya o conejo). En determinadas realizaciones, la muestra biológica es de origen primate (por ejemplo, de chimpancé o de humano).

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sonda de control" se refiere a un agente que tiene un elemento de unión acoplado a un generador de señal o un generador de señal capaz de tinción directamente, de tal modo que el generador de señal retiene al menos el 80 por ciento de la señal tras el contacto con una disolución de un agente oxidante empleado para desactivar la sonda fluorescente. Un generador de señal adecuado en una sonda de control no se oxidado sustancialmente o desactivado sustancialmente al entrar en contacto con el agente oxidante. Los ejemplos adecuados de generadores de señal pueden incluir una marca radiactiva o un fluoróforo no oxidable (p.ej., DAPI).

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "enzima" se refiere a una molécula de proteína que puede catalizar una reacción química de un sustrato. En algunas realizaciones, una enzima adecuada cataliza una reacción química del sustrato para formar un producto de reacción que se puede unir a un receptor (p.ej., grupos fenólicos) presente en la muestra o a un soporte sólido al cual está unido la muestra. Un receptor puede ser exógeno (es decir, un receptor extrínsecamente adherido a la muestra o al soporte sólido) o endógeno (receptores presentes intrínsecamente en la muestra o el soporte sólido). Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa, oxidasas, fosfatases, esterasas y glicosidasas. Los ejemplos específicos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β-D-galactosidasa, lipasa y glucosa oxidasa.

- 10 15 20 25 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sustrato enzimático" se refiere a un compuesto químico que es catalizado químicamente por una enzima para formar un producto de reacción. En algunas realizaciones, el producto de reacción es capaz de unirse a un receptor presente en la muestra o a un soporte sólido al que está unida la muestra. En algunas realizaciones, los sustratos enzimáticos empleados en los métodos de la presente memoria pueden incluir sustratos no cromogénicos o no quimioluminiscentes. Se puede unir un generador de señal al sustrato enzimático como marcaje.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "fluoróforo" o "generador de señal fluorescente" se refiere a un compuesto químico, que cuando es excitado por exposición a una longitud de onda particular, emite luz a una longitud de onda diferente. Los fluoróforos se pueden describir en términos de su perfil de emisión, o "color". Los fluoróforos verdes (por ejemplo Cy3, FITC y Verde Oregón) pueden caracterizarse por su emisión a longitudes de onda generalmente en el rango de 515-540 nanómetros. Los fluoróforos rojos (por ejemplos Rojo Texas, Cy5 y tetrametilrrodamina) pueden caracterizarse por su emisión a longitudes de onda generalmente en el rango de 590-690 nanómetros. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, sin limitación, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, acridina, derivados de acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoethyl)-aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]-fenil]-naftalimida-3,5-disulfonato (Amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)-maleimida, antranilamida, Amarillo Brillante, cumarina, derivados de cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-trifluorometilcumarina (Cumarina 151), cianosina; 4'-6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Rojo de Bromopirogalol), ácido 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico, cloruro de 5-[dimetilamino]-naftalen-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo), eosina, derivados de eosina tales como isotiocianato de eosina, eritrosina, derivados de eritrosina tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), QFITC (XRITC); derivado de fluorescamina (fluorescente tras reacción con aminas); IR144; IR1446; isotiocianato de Verde Malaquita; 4-metilumbelifera; orto-cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo Fenol, B-ficoeritrina; derivado de oftaldialdehído (fluorescente tras reacción con aminas); pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Rojo Reactivo 4 (Cibacron RTM, Rojo Brillante 3B-A), rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulfurorodamina B, sulfurorodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo de sulfurorodamina 101 (Rojo Texas), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA); tetrametil rodamina, isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de lantánido, puntos cuánticos, cianinas, colorantes de pirelo y escuaridinas.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "*in situ*" generalmente se refiere a un evento que se produce en la localización original, por ejemplo, en el tejido u órgano intacto o en un segmento representativo de un tejido u órgano. En algunas realizaciones, el análisis *in situ* de dianas se puede llevar a cabo sobre células derivadas de una variedad de fuentes, que incluyen un organismo, un órgano, muestras de tejido o un cultivo celular. El análisis *in situ* proporciona información contextual que puede perderse cuando se extrae la diana de su sitio de origen. Por consiguiente, el análisis *in situ* de dianas describe el análisis de sonda ligada a diana localizada dentro de una célula entera o una muestra de tejido, tanto si la membrana celular está completamente intacta como si está parcialmente intacta, donde la sonda unida a diana permanece dentro de la célula. Además, los métodos descritos en la presente memoria se pueden emplear para analizar dianas *in situ* en muestras de células o tejidos que estén fijadas o no fijadas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "peroxidasa" se refiere a una clase de enzimas que cataliza una reacción de oxidación de un sustrato enzimático junto con un donante electrónico. Los ejemplos de enzimas de peroxidasa incluyen peroxidasa de rábano, citocromo C peroxidasa, glutationa peroxidasa, microperoxidasa, mieloperoxidasa, lactoperoxidasa o peroxidasa de soja.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sustrato de peroxidasa" se refiere a un compuesto químico que es catalizado químicamente por peroxidasa para formar un producto de reacción. En algunas realizaciones, los sustratos de peroxidasa empleados en los métodos de la presente memoria pueden incluir sustratos no cromogénicos o no quimioluminiscentes. Se puede unir un generador de señal fluorescente al sustrato de peroxidasa como marca.
- 10 Tal como usa en la presente memoria, el término "sonda" se refiere a un agente que tiene un elemento de unión y una marca, tal como un generador de señal o una enzima. En algunas realizaciones, el elemento de unión y la marca (generador de señal o la enzima) forman parte de una única entidad. El elemento de unión y la marca pueden estar unidos directamente (p.ej., a través de una molécula fluorescente incorporada en el elemento de unión) o indirectamente (p.ej., a través de un ligando, que puede incluir un sitio de ruptura) y aplicarse a la muestra biológica en una única etapa. En realizaciones alternativas, el elemento de unión y la marca están incluidos en entidades discretas (p.ej., un anticuerpo primario capaz de unirse a una diana y una enzima o un anticuerpo secundario marcado con generador de señal capaz de unirse al anticuerpo primario). Cuando el elemento de unión y la marca (el generador de señal o la enzima) son entidades separadas, pueden aplicarse a una muestra biológica en una única etapa o etapas múltiples. Tal como se usa en la presente memoria, el término "sonda fluorescente" se refiere a un agente que tiene un elemento de unión acoplado a un generador de señal fluorescente.
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "generador de señal" se refiere a una molécula capaz de proporcionar una señal detectable usando una o más técnicas de detección (p.ej., espectrometría, calorimetría, espectroscopía o inspección visual). Los ejemplos adecuados de una señal detectable pueden incluir una señal óptica, y una señal eléctrica o una señal radiactiva. Los ejemplos de generadores de señal incluyen uno o más 20 cromóforos, un fluoróforo, una marca activa en Raman, o una marca radiactiva. Como se ha indicado antes, con respecto a la sonda, en algunas realizaciones el generador de señal y el elemento de unión pueden estar presentes en una única entidad (p.ej., una proteína de unión a diana con una marca fluorescente). Alternativamente, el elemento de unión y el generador de señal pueden ser entidades discretas (p.ej., una proteína receptora y un anticuerpo marcado contra dicha proteína receptora particular) que se asocian una a otra antes o al ser introducidas 25 en la muestra.
- 30 Tal como se usa en la presente memoria, el término "soporte sólido" se refiere a un artículo sobre el que se pueden inmovilizar las dianas presentes en la muestra biológica y ser detectadas posteriormente mediante los métodos aquí descritos. Las dianas se pueden inmovilizar sobre el soporte sólido por adsorción física, mediante la formación de 35 enlaces covalentes o por combinaciones de ambas. Un soporte sólido puede incluir un material polimérico, de vidrio o metálico. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen una membrana, una placa de microtitulación, una bolita, un filtro, una tira de ensayo, un portaobjetos, un cubreobjetos y un tubo de ensayo.
- 40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "unión específica" se refiere al reconocimiento específico de una o dos moléculas diferentes por la otra en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Las moléculas pueden presentar áreas sobre sus superficies o en sus cavidades que dan lugar a un reconocimiento específico entre las dos moléculas como resultado de una o más interacciones electrostáticas, 45 enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Los ejemplos de unión específica incluyen, aunque sin limitación, interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones enzima-sustrato, interacciones de polinucleótidos y similares. En algunas realizaciones, una molécula de unión puede presentar una constante de equilibrio de asociación intrínseca (KA) para la diana no inferior a aproximadamente 10^5 M^{-1} en condiciones ambientales tales como un pH de entre 50 aproximadamente 6 y aproximadamente 8 y una temperatura que oscile entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 37°C.
- 55 Tal como se usa en la presente memoria, el término "diana" se refiere al componente de una muestra biológica que puede ser detectado cuando está presente en la muestra biológica. La diana puede ser cualquier sustancia para la cual existe un elemento de unión específico natural (p.ej., un anticuerpo), o para el cual se puede preparar un elemento de unión específico (p.ej., un elemento de unión o aptámero de molécula pequeña). En general, se puede unir un elemento de unión a una diana a través de uno o más restos químicos discretos de la diana o de un componente estructural tridimensional de la diana (p.ej., estructuras 3D resultado de plegamiento de péptidos). La diana puede incluir uno o más de péptidos naturales o modificados, proteínas (p.ej., anticuerpos, aficuerpos o aptámeros), ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos, ADN, ARN o aptámeros); polisacáridos (p.ej., lectinas o azúcares), lípidos, enzimas, sustratos enzimáticos, ligandos, receptores, antígenos o haptenos. En algunas realizaciones, las dianas pueden incluir proteínas o ácidos nucleicos.
- 60 La invención incluye realizaciones que generalmente se relacionan a métodos aplicables en aplicaciones analíticas, diagnósticas o prognósticas tal como la detección de analitos, histoquímica, inmunoquímica o inmunofluorescencia. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden ser particularmente aplicables en histoquímica, inmunotinción, inmunohistoquímica, inmunoensayos o inmunofluorescencia.

Los métodos descritos se refieren generalmente a la detección de dianas múltiples en una muestra biológica individual. En algunas realizaciones, se describen los métodos para detectar dianas múltiples en una muestra biológica individual usando el mismo canal de detección. Las dianas pueden estar presentes sobre la superficie de secciones histológicas, o sobre la superficie de soportes sólidos (tal como portaobjetos de vidrio).

5 Los métodos descritos en la presente memoria pueden permitir la detección de una pluralidad de dianas en la misma muestra biológica con poco o ningún efecto sobre la integridad de la muestra biológica. La detección de dianas en la misma muestra biológica puede proporcionar además información espacial sobre las dianas de la muestra biológica. Los métodos descritos en la presente memoria también pueden ser aplicables a aplicaciones analíticas en las que puede disponerse de una cantidad limitada de muestra biológica para el análisis y la misma muestra puede tener
10 que ser procesada para análisis múltiple. Los métodos aquí descritos también pueden facilitar análisis múltiples de muestras en estado sólido (p.ej., secciones de tejidos) o muestras adheridas a un soporte sólido (p.ej., dots) sin despegar sustancialmente las sondas y las dianas. Además, se puede emplear el mismo canal de detección para la detección de diferentes dianas de la muestra, permitiendo que haya menos requisitos químicos para los análisis de dianas múltiples. Los métodos además pueden facilitar los análisis basados en métodos de detección que pueden
15 estar limitados en el número de dianas detectables simultáneamente debido a limitaciones de las señales resolubles. Por ejemplo, usando detección basada en fluorescencia, el número de dianas que pueden ser detectadas simultáneamente puede limitarse a aproximadamente cuatro, ya que solo aproximadamente cuatro señales fluorescentes pueden ser resolubles en base a sus propiedades de longitud de onda de excitación y emisión. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden permitir la detección de más de cuatro dianas usando un sistema de detección basado en fluorescencia.

20 En algunas realizaciones, el método para detectar dianas múltiples en una muestra biológica incluye la detección secuencial de dianas en la muestra biológica. El método incluye generalmente las etapas de detectar una primera diana en la muestra biológica, modificar la señal de la primera diana usando un agente químico que comprende un agente oxidante y detectar la primera diana en la muestra biológica. El método puede incluir adicionalmente repetir
25 la etapa de modificación de señal de la segunda diana seguido de la detección de una tercera diana de la muestra biológica, y así sucesivamente.

25 En algunas realizaciones, el método incluye las etapas de poner en contacto una muestra biológica con una primera sonda de anticuerpo y unir físicamente una primera sonda de anticuerpo a una primera diana. El método incluye además observar una primera señal procedente de la primera sonda. Se aplica un agente oxidante a la sonda para modificar la primera señal. El método incluye además poner en contacto la muestra biológica con una segunda sonda de anticuerpo y unir físicamente la segunda sonda de anticuerpo a una segunda diana de la muestra biológica seguido de la observación de una segunda señal de la segunda sonda.

30 En otras realizaciones adicionales, el método incluye las etapas de proporcionar una muestra biológica que contiene dianas múltiples adheridas a un soporte sólido y unir al menos una sonda fluorescente a una o más dianas presentes en la muestra. El método incluye adicionalmente observar una señal procedente de la sonda fluorescente. La sonda fluorescente unida es oxidada con un agente oxidante que desactiva sustancialmente la sonda fluorescente. El método incluye además la unión de al menos un sonda fluorescente adicional a una o más dianas presentes en la muestra seguido de la observación de una señal procedente de la sonda fluorescente adicional unida.

35 40 En otras realizaciones adicionales, el método incluye las etapas de proporcionar una muestra biológica que contiene dianas múltiples adheridas a un soporte sólido y unir al menos una sonda de anticuerpo fluorescente a una o más dianas presentes en la muestra. El método incluye además la unión de al menos una sonda de control a una o más dianas de la muestra. El método incluye además observar una señal procedente de la sonda de anticuerpo fluorescente unida y una señal de control procedente de la sonda de control. La sonda fluorescente unida es oxidada con un agente oxidante que desactiva sustancialmente la sonda fluorescente y no la sonda de control. El método incluye además la unión de al menos una sonda fluorescente adicional a una o más dianas presentes en la muestra seguido de la observación de una señal procedente de la sonda fluorescente unida adicional.

Muestras biológicas

45 50 Una muestra biológica según una realización de la invención puede ser sólida. Los ejemplos adecuados de muestras biológicas incluyen secciones de tejido sólido. En algunas realizaciones, la muestra biológica puede analizarse tal cual, es decir, sin recolección y/o aislamiento de la diana de interés. En una realización alternativa, se puede llevar a cabo la recolección y aislamiento de dianas previamente al análisis. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden ser particularmente adecuados para el análisis *in vitro* de muestras biológicas.

55 Una muestra biológica puede incluir cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente independientemente de su condición física, tal como, aunque sin limitación, estar congelada o teñida, o haber sido tratada de cualquier otro modo. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede incluir compuestos que no están mezclados de forma natural con la muestra en la naturaleza, tal como conservantes, anticoagulantes, tampones, reactivos de fijación, nutrientes, antibióticos o similares.

- La muestra biológica incluye una muestra de tejido. En algunas realizaciones, una muestra biológica incluye esencialmente una muestra de tejido. Una muestra de tejido puede incluir una recolección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto biológico que pueden tener una función similar. En algunas realizaciones, una muestra de tejido puede incluir una recolección de células similares obtenidas de un tejido de un humano. Los ejemplos adecuados de tejidos humanos incluyen, aunque sin limitación, (1) epitelio; (2) tejidos conectivos, que incluyen vasos sanguíneos, huesos y cartílagos; (3) tejido muscular; y (4) tejido nervioso. La fuente de la muestra de tejido puede ser un tejido sólido obtenido de una muestra o una biopsia de órgano o tejido fresca, congelada y/o conservada.
- En algunas realizaciones, una muestra biológica incluye secciones de tejido procedentes de muestras de tejido sanas o enfermas (p.ej., sección de tejido de colon, tejido de mama, próstata). Una sección de tejido puede incluir una parte o trozo individual de una muestra de tejido, por ejemplo, una lámina fina de tejido o células cortada de una muestra de tejido. En algunas realizaciones, se pueden tomar múltiples secciones de muestras de tejido y someterlas a análisis, siempre que los métodos descritos en la presente memoria se puedan usar para el análisis de la misma sección de la muestra de tejido con respecto a al menos dos dianas diferentes (a nivel morfológico o molecular). En algunas realizaciones, la misma sección de muestra de tejido se puede analizar con respecto a al menos cuatro dianas diferentes (a nivel morfológico o molecular). En algunas realizaciones, la misma sección de muestra de tejido puede analizarse con respecto a más de cuatro dianas diferentes (a nivel morfológico o molecular). En algunas realizaciones, la misma sección de muestra de tejido puede analizarse tanto a nivel morfológico como molecular.
- Una sección de tejido, si se emplea como muestra biológica puede presentar un espesor en un intervalo que es inferior a aproximadamente 100 micrómetros, en un intervalo que es inferior a aproximadamente 50 micrómetros, en un intervalo que es inferior a aproximadamente 25 micrómetros, o en un intervalo que es inferior a aproximadamente 10 micrómetros.
- En algunas realizaciones, una muestra biológica o las dianas de la muestra biológica pueden estar adheridas a un soporte sólido. Un soporte sólido puede incluir microarrays, portaobjetos de vidrio o placas ELISA. En algunas realizaciones, una muestra biológica o las dianas de la muestra biológica pueden estar adheridas a una membrana seleccionada entre nylon, nitrocelulosa y difluoruro de polivinilideno. En algunas realizaciones, el soporte sólido puede incluir una superficie de plástico seleccionada entre poliestireno, policarbonato y polipropileno.
- Dianas
- Una diana puede estar presente sobre la superficie de una muestra biológica (por ejemplo, un antígeno sobre una superficie de una sección de tejido). En algunas realizaciones, una diana puede no estar presente inherentemente sobre la superficie de una muestra biológica y la muestra biológica puede tener que ser procesada para hacer que la diana esté disponible sobre la superficie (p.ej., recuperación de antígeno, digestión enzimática, retirada de epítopo, o bloqueo). En algunas realizaciones, la diana puede estar fijada a un tejido, bien en la superficie celular o bien dentro de una célula.
- La adecuación de las dianas que van a ser analizadas se debe determinar por el tipo y la naturaleza de análisis requeridos para la muestra biológica. En algunas realizaciones, una diana puede proporcionar información sobre la presencia o la ausencia de un analito en la muestra biológica. En otra realización, una diana puede proporcionar información sobre el estado de una muestra biológica. Por ejemplo, si la muestra biológica incluye una muestra de tejido, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para detectar dianas que pueden ayudar a comparar diferentes tipos de células o tejidos, a comparar diferentes etapas de desarrollo, a detectar la presencia de una enfermedad o anormalidad, o a determinar el tipo de enfermedad o anormalidad.
- Las dianas pueden incluir uno o más péptidos, proteínas (p.ej., anticuerpos, aficuerpos o aptámeros), ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos, ADN, ARN o aptámeros); polisacáridos (p.ej., lectinas o azúcares), lípidos, enzimas, sustratos enzimáticos, ligandos, receptores, antígenos o haptones. En algunas realizaciones, las dianas pueden incluir esencialmente proteínas o ácidos nucleicos. Una o más de las dianas mencionadas anteriormente pueden ser características de células concretas, mientras que otras dianas pueden estar asociadas a una enfermedad o afección particular. En algunas realizaciones, las dianas que pueden detectarse y analizarse usando los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir, aunque sin limitación, dianas pronósticas, dianas hormonales o de receptores hormonales, dianas linfoideas, dianas tumorales, dianas asociadas a ciclo celular, dianas de tejido neural y tumoral, o dianas de diferenciación de agrupaciones.
- Los ejemplos adecuados de dianas pronósticas pueden incluir dianas enzimáticas tales como la galactosil transferasa II, la enolasa específica de neurona, la protón ATPasa-2 o la fosfatasa ácida.
- Los ejemplos adecuados de dianas hormonales o de receptor hormonal pueden incluir gonadotropina coriónica (HCG), hormona adrenocorticotrópica, antígeno carcinoembriónico (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de andrógeno, receptor de complemento gC1q-R/p33, receptor de IL-2, receptor de neurotrofina p75, receptor PTH, receptor de hormona tiroidea o receptor de insulina.

- 5 Los ejemplos adecuados de dianas linfoideas pueden incluir alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, diana de célula B, bcl-2, bcl-6, antígeno de linfocito B de 36 kD, BM1 (diana mieloide), BM2 (diana mieloide), galectina-3, granzima B, antígeno de HLA de clase I, antígeno de HLA de clase II (DP), antígeno de HLA de clase II (DQ), antígeno de HLA de clase II (DR), defensinas de neutrófilo humanas, inmunoglobulina A, inmunoglobulina D, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, cadena ligera kappa, cadena ligera kappa, cadena ligera lambda, antígeno de linfocito/histocito, diana de macrófago, muramidasa (lisozima), linfoma quinasa anaplástica p80, diana celular plasmática, inhibidor de proteasa de leucocito secretor, receptor de antígeno de célula T (JOVI 1), receptor de antígeno de célula T (JOVI 3), desoxinucleotidil transferasa terminal, o diana de células B no agrupadas.
- 10 Los ejemplos adecuados de dianas tumorales pueden incluir alfa fetoproteína, apolipoproteína D, BAG-1 (proteína RAP46), CA19-9 (sialil lewisa), CA50 (antígeno mucino asociado a carcinoma), CA125 (antígeno de cáncer de ovario), CA242 (antígeno mucino asociado a tumor), cromogranina A, clusterina (apolipoproteína J), antígeno de membrana epitelial, antígeno relacionado a epitelio, antígeno específico de epitelio, proteína-15 de fluido de enfermedad cística crudo, antígeno específico de hepatocito, heregulina, mucina gástrica humana, glóbulo de grasa láctea humana, MAGE-1, metaloproteinasa de matriz, melan A, diana de melanoma (HMB45), mesotelina, 15 metalotioneína, factor de transcripción de microftalmia, glicoproteína de núcleo Muc-1, glicoproteína Muc-1, glicoproteína Muc-2, glicoproteína Muc-5AC, glicoproteína Muc-6, mieloperoxidasa, Myf-3 (diana de Rhabdomiosarcoma), Myf-4 (diana de Rhabdomiosarcoma), MyoD1 (diana de Rhabdomiosarcoma), mioglobina, proteína nm23, fosfatasa alcalina de placenta, prealbúmina, antígeno específico de próstata, fosfatasa ácida prostática, péptido de inhibina prostático, PTEN, diana de carcinoma de célula renal, antígeno mucinoso de intestino delgado, tetranectina, factor-1 de transcripción tiroidea, inhibidor de tejido de metaloproteinasa 1 de matriz, inhibidor de tejido de metaloproteinasa 2 de matriz, tirosinasa, proteína-1 relacionada con tirosinasa, villina o factor de Willebrand.
- 20 Los ejemplos adecuados de dianas asociadas al ciclo celular pueden incluir factor-1 activante de proteasa de apoptosis, bcl-w, bcl-x, bromodesoxiuridina, CAK (quinasa activante de cdk), proteína de susceptibilidad de apoptosis celular (CAS), caspasa 2, caspasa 8, CPP32 (caspasa-3), CPP32 (caspasa-3), quinasas dependientes de ciclina, ciclina A, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, ciclina E, ciclina G, factor de fragmentación de ADN (extremo N), Fas (CD95), proteína de dominio de muerte asociado a Fas, ligando Fas, Fen-1, IPO-38, Mcl-1, 25 proteínas de mantenimiento de minicromosoma, proteína de reparación de defectos (MSH2), poli (ADP-Ribosa) polimerasa, antígeno nuclear de célula proliferante, proteína p16, proteína p27, p34cdc2, proteína p57 (Kip2), proteína p105, Stat 1 alfa, topoisomerasa I, topoisomerasa II alfa, topoisomerasa III alfa o topoisomerasa II beta.
- 30 Los ejemplos adecuados de dianas de tejido neural y tumoral pueden incluir alfa B cristalina, alfa-internexina, alfa sinucleína, proteína precursora amiloide, beta amiloide, calbindina, acetiltransferasa de colina, transportador 1 de aminoácido excitador, GAP43, proteína ácida glial fibrilar, receptor 2 de glutamato, proteína básica de mielina, receptor de factor de crecimiento nervioso (gp75), diana de neuroblastoma, neurofilamento 68 kD, neurofilamento 160 kD, neurofilamento 200 kD, enolasa específica de neurona, receptor alfa4 de acetilcolina nicotínica, receptor beta2 de acetilcolina nicotínica, producto génico proteico 9, proteína A-100, serotonina, SNAP-25, sinapsina I, sinaptofisina, tau, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa o ubiquitina.
- 35 Los ejemplos adecuados de dianas de diferenciación de agrupaciones pueden incluir CD1a, CD1b, CD1c, CD1e, CD2, CD3delta, CD3epsilon, CD3gamma, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8alfa, CD8beta, CD9, CD10, CD11a, CD11b, 40 CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, 45 CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CD76, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CDw93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD115, CD116, CD117, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CDw125, CD126, CD127, CDw128a, CDw128b, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, 50 CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CDw150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 y TCR-zeta.
- 55 Otras dianas prognósticas adecuadas pueden incluir centrómero de proteína F (CENP-F), giantina, involucrina, lamina A&C (XB 10), LAP-70, mucina, proteínas complejas de poro nuclear, proteína de cuerpo lamelar p180, ran, r, catepsina D, proteína Ps2, Her2-neu, P53, S100, antígeno de diana epitelial (EMA), TdT, MB2, MB3, PCNA o Ki67.
- 60 Sondas
En algunas realizaciones, se pueden acoplar un elemento de unión (anticuerpo) y una marca (generador de señal que sea una sonda fluorescente) directamente uno con otro (es decir, sin ningún ligando). En otras realizaciones, se pueden acoplar un elemento de unión y una marca uno con otro a través de un ligando. Tal como se emplea en la presente memoria, "acoplado" generalmente se refiere a dos entidades (por ejemplo, un elemento de unión y un

- generador de señal) unidos de forma estable uno al otro a través de cualquier medio fisicoquímico. La naturaleza del acoplamiento puede ser tal que no perjudique sustancialmente a la eficacia de ninguna de las entidades. Se pueden acoplar un elemento de unión y una marca uno al otro a través de interacciones covalentes o no covalentes. Las interacciones no covalentes puede incluir, aunque sin limitación, interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas, interacciones por enlaces de hidrógeno, interacciones de alta afinidad (tal como, formación de complejos biotina-avidina o biotina-estreptavidina), u otras interacciones de afinidad.
- Un ligando puede incluir una forma de estructura o secuencia de unión formada debido a la formación de enlaces covalentes o no covalentes. En algunas realizaciones, el ligando puede ser estable químicamente, es decir, puede mantener su integridad en presencia de un agente químico. En algunas realizaciones, el ligando puede ser susceptible a agentes químicos, es decir, puede ser capaz de disociarse, descomponerse o hidrolizarse en presencia de un agente químico. Los ejemplos adecuados de ligandos pueden incluir enlaces de disulfuro (p.ej., SPDPA o SMPT), estructuras/secuencias sensibles al pH, estructuras/secuencias que pueden reducirse en presencia de un agente reductor, estructuras/secuencias que pueden oxidarse en presencia de un agente oxidante, o cualquier otro enlace químico o físico que pueda manipularse fácilmente (disociarse, descomponerse o hidrolizarse) en presencia de un agente químico.
- En algunas realizaciones, se puede unir químicamente un elemento de unión y una marca uno al otro a través de grupos funcionales capaces de reaccionar y formar un enlace en las condiciones adecuadas. Los ejemplos adecuados de combinaciones de grupos funcionales pueden incluir, aunque sin limitación, aminoésteres y aminas o anilinas; azidas de acilo y aminas o anilinas; haluros de acilo y aminas, anilinas, alcoholes o fenoles; nitrilo de acilo y alcoholes o fenoles; aldehído y aminas o anilinas; haluro de alquilo y aminas, anilinas, alcoholes, fenoles o tioles; alquilsulfonato y tioles, alcoholes o fenoles; anhídrido y alcoholes, fenoles, aminas o anilinas; haluro de arilo y tioles; aziridina y tioles o tioéteres; ácido carboxílico y aminas, anilinas, alcoholes o haluros de alquilo; diazoalcano y ácidos carboxílicos; epóxido y tioles; haloacetamida y tioles; halotriazina y aminas, anilinas o fenoles; hidracina y aldehídos o cetonas; hidroxiamina y aldehídos o cetonas; imido éster y aminas o anilinas; isocianato y aminas o anilinas; e isocianato y aminas o anilinas. Un grupo funcional de uno de los pares de grupos funcionales mencionados anteriormente puede estar presente en un elemento de unión y el grupo funcional correspondiente puede estar presente en el generador de señal o la enzima. Por ejemplo, un elemento de unión puede incluir un ácido carboxílico y el generador de señal o la enzima pueden incluir una amina, anilina, alcohol o haluro de acilo, o viceversa. La conjugación entre el elemento de unión y el generador de señal o la enzima puede efectuarse en este caso mediante la formación de una amida o de un enlace tipo éster.
- En algunas realizaciones, el elemento de unión y la marca están incluidos en una única entidad. En realizaciones alternativas, el elemento de unión y la marca están incluidos en entidades discretas (p.ej., un anticuerpo primario capaz de unirse a una diana y un anticuerpo secundario marcado con generador de señal capaz de unirse al anticuerpo primario o un anticuerpo primario marcado con hapteno capaz de unirse a una diana y un anticuerpo anti-hapteno marcado con generador de señal capaz de unirse al anticuerpo primario marcado con hapteno). Cuando el elemento de unión y el generador de señal son entidades separadas, se pueden aplicar a una muestra biológica en una etapa única o en etapas múltiples. En algunas realizaciones, el elemento de unión y la marca son entidades separadas que han sido pre-ligadas antes de la aplicación a la muestra biológica y que son aplicadas en la muestra biológica en una sola etapa. En otras realizaciones adicionales, el elemento de unión y la marca son entidades separadas que se aplican a la muestra biológica de forma independiente y se combinan tras la aplicación.
- Elementos de unión**
- Los métodos descritos en la presente memoria implican el uso de elementos de unión (anticuerpos) que se unen físicamente a la diana de un modo específico. En algunas realizaciones, un elemento de unión se puede unir a una diana con una especificidad suficiente, es decir, un elemento de unión se puede unir a una diana con mayor afinidad de lo que lo hace a cualquier otra molécula. En algunas realizaciones, el elemento de unión se puede unir a otras moléculas, pero la unión puede ser tal que la unión no específica se encuentre a nivel de ruido de fondo. En algunas realizaciones, la afinidad del elemento de unión por la diana de interés puede estar en un rango que sea al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o más, su afinidad por otras moléculas. En algunas realizaciones, se pueden emplear los elementos de unión con la mayor afinidad diferencial, aunque puede que no sean los de mayor afinidad por la diana.
- En algunas realizaciones, la unión entre la diana y el elemento de unión se puede efectuar a través de enlace físico. La unión física puede incluir la unión efectuada usando interacciones no covalentes. Las interacciones no covalentes pueden incluir, aunque sin limitación, interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas, interacciones de enlace de hidrógeno, o interacciones de afinidad. En algunas realizaciones, la diana y el elemento de unión pueden presentar áreas sobre sus superficies o en cavidades que den lugar a un reconocimiento específico entre ambos, que da como resultado la unión física. En algunas realizaciones, un elemento de unión se puede unir a una diana biológica en base al ajuste recíproco de una porción de sus formas moleculares.
- Los elementos de unión y sus correspondientes dianas pueden considerarse como pares de unión, de los cuales los ejemplos no limitantes incluyen pares de unión de tipo inmune, tales como, antígeno/anticuerpo o antígeno/fragmento de anticuerpo.

En algunas realizaciones, el elemento de unión puede ser un elemento de unión específico de secuencia o de estructura, donde la secuencia o estructura de una diana reconocida y ligada por el elemento de unión puede ser suficientemente única en dicha diana.

- 5 En algunas realizaciones, el elemento de unión puede ser específico de estructura y puede reconocer una estructura primaria, secundaria o terciaria de una diana. Una estructura primaria de una diana puede incluir la especificación de su composición atómica y los enlaces químicos que conectan dichos átomos (lo que incluye estereoquímica), por ejemplo, el tipo y la naturaleza de la disposición lineal de los aminoácidos en una proteína. Una estructura secundaria de una diana se puede referir a la forma tridimensional general de los segmentos de biomoléculas, por ejemplo, para una proteína una estructura secundaria se puede referir al plegamiento de la "cadena principal" de péptidos en conformaciones diversas que pueden dar como resultado que aminoácidos distantes queden próximos unos de otros. Los ejemplos adecuados de estructuras secundarias pueden incluir, aunque sin limitación, hélices alfa, láminas beta plegadas o bobinas aleatorias. Una estructura terciaria de una diana puede ser su estructura tridimensional general. Una estructura cuaternaria de una diana puede ser la estructura formada por su interacción no covalente con una o más dianas o macromoléculas (tales como interacciones de proteínas). Un ejemplo de una estructura cuaternaria puede ser la estructura formada por las cuatro subunidades de proteína globina que constituyen la hemoglobina. Un elemento de unión de acuerdo a las realizaciones de la invención puede ser específico para cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente.
- 10
- 15
- 20
- Un ejemplo de un elemento de unión específico de estructura puede incluir una molécula específica de proteínas que puede unirse a una diana proteica. Los ejemplos de moléculas específicas de proteínas incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.
- 25
- En la presente invención, la diana incluye un antígeno y el elemento de unión incluye un anticuerpo. Un anticuerpo adecuado puede incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bi-específicos) o fragmentos de anticuerpos, siempre que se unan específicamente a un antígeno diana.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- La muestra biológica incluye una muestra de tejido y los métodos descritos en la presente memoria pueden emplearse en inmunohistoquímica (IHC). La inmunohistoquímica puede implicar la unión de un antígeno diana a un elemento de unión basado en anticuerpos para proporcionar información sobre los tejidos o células (por ejemplo, células enfermas frente a células normales). Los ejemplos de anticuerpos (y las correspondientes enfermedades/células enfermas) adecuados como elementos de unión para los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, anticuerpo de receptor anti-estrógeno (cáncer de mama), anticuerpo de receptor anti-progesterona (cáncer de mama), anticuerpo anti-p53 (múltiples cánceres), anticuerpo anti-Her-2/neu (múltiples cánceres), anticuerpo anti-EGFR (factor de crecimiento epidérmico, múltiples cánceres), anticuerpo anti-catepsina D (cáncer de mama y otros), anticuerpo anti-Bcl-2 (células apoptóticas), anticuerpo anti-E-caderina, anticuerpo anti-CA125 (cáncer de ovario y otros), anticuerpo anti-CA15-3 (cáncer de mama), anticuerpo anti-CA19 (cáncer de colon), anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-glicoproteína P (MDR, resistencia multifármaco), anticuerpo anti-CEA (antígeno carcinoembriónico), anticuerpo anti-proteína de retinoblastoma (Rb), anticuerpo anti-oneoproteína ras (p21), anticuerpo anti-Lewis X (también denominado CD15), anticuerpo anti-Ki-67 (proliferación celular), anticuerpo anti-PCNA (múltiples cánceres), anticuerpo anti-CD3 (células T), anticuerpo anti-CD4 (células T colaboradoras), anticuerpo anti-CD5 (células T), anticuerpo anti-CD7 (timocitos, células T inmaduras, células asesinas NK), anticuerpo anti-CD8 (células T supresoras), anticuerpo anti-CD9/p24 (ALL), anticuerpo anti-CD10 (también denominado CALLA) (leucemia linfoblástica aguda común), anticuerpo anti-CD11c (Monocitos, granulocitos, AML), anticuerpo anti-CD13 (células mielomonocíticas, AML), anticuerpo anti-CD14 (monocitos maduros, granulocitos), anticuerpo anti-CD15 (enfermedad de Hodgkin), anticuerpo anti-CD19 (células B), anticuerpo anti-CD20 (células B), anticuerpo anti-CD22 (células B), anticuerpo anti-CD23 (células B activadas, CLL), anticuerpo anti-CD30 (células T y B activadas, enfermedad de Hodgkin), anticuerpo anti-CD31 (marcador de angiogénesis), anticuerpo anti-CD33 (células mieloídes, AML), anticuerpo anti-CD34 (células madre endoteliales, tumores estromales), anticuerpo anti-CD35 (células dendríticas), anticuerpo anti-CD38 (células plasmáticas, células T, B y mieloides activadas), anticuerpo anti-CD41 (plaquetas, megacariocitos), anticuerpo anti-LCA/CD45 (antígeno común de leucocitos), anticuerpo anti-CD45RO (células T colaboradoras inductoras), anticuerpo anti-CD99 (marcador de Sarcoma de Ewing, producto genético MIC2), anticuerpo anti-CD106 (VCAM-1, células endoteliales activadas), anticuerpo anti-ubiquitina (enfermedad de Alzheimer), anticuerpo anti-CD71 (receptor de transferrina), anticuerpo anti-c-myc (oncoproteína y un hapteno), anticuerpo anti-citoqueratinas (receptor de transferrina), anticuerpo anti-vimentinas (células endoteliales) (células B y T), anticuerpo anti-proteínas HPV (virus de papiloma humano), anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa (célula B), anticuerpo anti-cadenas ligeras lambda (célula B), anticuerpo anti-melanosomas (HMB45) (melanoma), anticuerpo anti-antígeno específico de próstata (PSA) (cáncer de próstata), anticuerpo anti-S-100 (células de melanoma, salivares, gliales), anticuerpo anti-antígeno tau (enfermedad de Alzheimer), anticuerpo anti-fibrina (células epiteliales), anticuerpo anti-queratinas, anticuerpo anti-citoqueratina (tumor), anti-alfa-catenina (membrana celular) o anticuerpo anti-antígeno Tn (carcinoma de colon, adenocarcinomas y cáncer pancreático).

- Otros ejemplos específicos de anticuerpo adecuados pueden incluir, aunque sin limitación, anti-antígeno nuclear de célula proliferante, clon pc10 (Sigma Aldrich, P8825); anti-actina alfa de músculo liso (SmA), clon 1A4 (Sigma, A2547); anti-beta catenina de conejo (Sigma, C 2206); anti-pan citoqueratina de ratón, clon PCK-26 (Sigma, C1801); anti-receptor alfa de estrógeno de ratón, clon 1D5 (DAKO, M 7047); anticuerpo de beta catenina, clon 15B8 (Sigma, C 7738); anti-vimentina de cabra (Sigma, V4630); clon de receptor de andrógeno cíclico AR441 (DAKO, M3562); Factor 7 de Von Willebrand, queratina 5, queratina 8/18, e-caderina, Her2/neu, receptor de estrógeno, p53, receptor de progesterona, beta catenina; anti-ratón de asno (Jackson Immunoresearch, 715-166-150); o anti-conejo de asno (Jackson Immunoresearch, 711-166-152).
- En algunas realizaciones, se puede someter una muestra de tejido a hibridación *in situ* además de a inmunohistoquímica (IHC) para obtener la información deseada de la muestra.
- Independientemente del tipo de elemento de unión y de la diana, la especificidad de la unión entre el elemento de unión y la diana también se puede afectada, dependiendo de las condiciones de unión (por ejemplo, las condiciones de hibridación en caso de ácidos nucleicos complementarios). Las condiciones de unión adecuadas se pueden alcanzar a través de la modulación de uno o más de pH, temperatura o concentración salina.
- Un elemento de unión se puede marcar intrínsecamente (generador de señal unido durante la síntesis del elemento de unión) o se puede marcar extrínsecamente (generador de señal unido durante una etapa posterior). Por ejemplo, para un elemento de unión basado en proteína, se puede preparar un elemento de unión marcado intrínsecamente empleando aminoácidos marcados. En algunas realizaciones, se puede sintetizar un elemento de unión de tal modo que los generadores de señal se incorporen en una etapa posterior. Por ejemplo, este último marcaje se puede realizar por medios químicos introduciendo grupos amino o tiol activos en las cadenas peptídicas. En algunas realizaciones, un elemento de unión tal como una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) puede marcarse directamente de forma química usando los métodos químicos apropiados.
- En algunas realizaciones, se pueden usar combinaciones de elementos de unión que pueden proporcionar una mayor especificidad o en determinadas aplicaciones la amplificación de la señal. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede usar un sandwich de elementos de unión, donde el primer elemento de unión puede unirse a la diana y servir para proporcionar la unión secundaria, donde el elemento de unión secundario puede o no incluir una marca, el cual puede proporcionar adicionalmente una unión terciaria (si se requiere) donde el miembro de la unión terciaria puede incluir una marca.
- Los ejemplos adecuados de combinaciones de elementos de unión pueden incluir una de anticuerpo primario-anticuerpo secundario. Algunos ejemplos específicos de pares de elementos de unión adecuados pueden incluir proteínas anti-myc de ratón recombinantes expresadas con epítopo c-myc; anti-HisG de ratón para proteína recombinante con epítopo His-Tag, anti-xpress de ratón para proteína recombinante con marca de epítopo, anti-cabra de conejo para moléculas primarias de IgG de cabra; anti-tio de ratón para proteínas de fusión de tiorredoxina, o anti-GFP de conejo para proteína de fusión.
- En algunas realizaciones, se puede usar como elemento de unión una combinación de un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario. Un anticuerpo primario puede ser capaz de unirse a una región específica de la diana y el anticuerpo secundario puede ser capaz de unirse al anticuerpo primario. Se puede unir un anticuerpo secundario a un generador de señal antes de unirse al anticuerpo primario o puede ser capaz de unirse a un generador de señal en una etapa posterior. En una realización alternativa, se puede usar un anticuerpo primario y pares ligando-receptor de unión específica (tal como biotina-estreptavidina). El anticuerpo primario puede unirse a un miembro del par (por ejemplo, biotina) y el otro miembro (por ejemplo, estreptavidina) puede marcarse con un generador de señal. El anticuerpo secundario puede marcarse independientemente con un generador de señal o una enzima.
- En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden emplearse en un procedimiento de inmunolectinación, y se puede usar un anticuerpo primario para unirse específicamente a la proteína diana. Se puede usar un anticuerpo secundario para unirse específicamente al anticuerpo primario, formando de este modo un puente entre el anticuerpo primario y el reactivo posterior (por ejemplo, un generador de señal o una enzima), si hay alguno. Por ejemplo, un anticuerpo primario puede ser IgG de ratón (un anticuerpo creado en ratón) y el correspondiente anticuerpo secundario puede ser un anti-ratón de cabra (anticuerpo creado en cabra) que tenga regiones capaces de unirse a una región de la IgG de ratón.
- En algunas realizaciones, se puede obtener una amplificación de señal cuando varios anticuerpos secundarios pueden unirse a epítopos sobre el anticuerpo primario. En un procedimiento de inmunolectinación, un anticuerpo primario puede ser el primer anticuerpo usado en el procedimiento y el anticuerpo secundario puede ser el segundo anticuerpo usado en el procedimiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo primario puede ser el único anticuerpo usado en un procedimiento de inmunolectinación.
- Generadores de señal
- El tipo de sonda fluorescente adecuado para los métodos descritos en la presente memoria puede depender de una variedad de factores, que incluyen la naturaleza de los análisis que se estén llevando a cabo, el tipo de fuente de

energía y el detector usado, el tipo de agente oxidante empleado, el tipo de elemento de unión, el tipo de diana, o el modo de unión entre el elemento de unión y el generador de señal (p.ej., reversible o no reversible).

Un generador de señal (sonda) adecuado puede ser estéricamente y químicamente compatible con los constituyentes a los que está ligado, por ejemplo, un elemento de unión. Adicionalmente, un generador de señal adecuado no puede interferir con la unión del elemento de unión a la diana, ni puede afectar a la especificidad de unión del elemento de unión. Un generador de señal adecuado puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica. En algunas realizaciones, un generador de señal puede ser de naturaleza química, de péptido o de ácido nucleico.

5 Un generador de señal adecuado es una marca fluorescente que emite luz de una longitud de onda particular tras excitación por luz de otra longitud de onda inferior característica y/o absorber luz de una longitud de onda particular.

10 Un generador de señal, adecuado según los métodos descritos en la presente memoria puede ser susceptible de manipulación en aplicación de un agente químico. En algunas realizaciones, un generador de señal puede ser capaz de ser destruido químicamente al ser expuesto a un agente oxidante. La destrucción química puede incluir la desintegración completa del generador de señal o la modificación del componente del generador de señal que genera la señal. La modificación del componente que genera la señal puede incluir cualquier modificación química (tal como adición, sustitución o eliminación) que pueda dar como resultado la modificación de las propiedades de generación de señal. Por ejemplo, la desconjugación de un generador de señal conjugado puede dar como resultado la destrucción de las propiedades cromogénicas del generador de señal. De forma similar, la sustitución de un grupo funcional de inhibición de fluorescencia en un generador de señal fluorescente puede dar como resultado la modificación de sus propiedades fluorescentes. En algunas realizaciones, se puede usar uno o más generadores de señal sustancialmente resistentes a la desactivación por parte de un agente químico específico como sonda de control en los métodos proporcionados.

15 Un generador de señal incluye una molécula emisora de luz capaz de absorber y emitir luz a través de fluorescencia, o de fluorescencia polarizada.

20 Un generador de señal puede incluir esencialmente un fluoróforo unido a un anticuerpo, por ejemplo, en un análisis de inmunohistoquímica. Los fluoróforos adecuados que pueden conjugarse a un anticuerpo primario incluyen, aunque sin limitación, Fluoresceína, Rhodamina, Rojo Texas, Rojo VECTOR, ELF (Fluorescencia Marcada Enzimáticamente), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy7, FluorX, Calceína, Calceína-AM, CRYPTOFLUOR, Naranja (42 kDa), Tangerina (35 kDa), Oro (31 kDa), Rojo (42 kDa), Carmesí (40 kDa), BHMP, BHD MAP, Br-Oregón, Amarillo Lucifer, familia de colorante Alexa, N-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-il)amino]caproil] (NBD), BODIPY, difluoruro de dipirrometeno de boro, Verde Oregón, Rojo MITOTRACKER, Ficoeritrina, Ficobiliproteínas BPE (240 kDa), RPE (240 kDa), CPC (264 kDa), APC (104 kDa), Azul Spectrum, Agua Spectrum, Verde Spectrum, Oro Spectrum, Naranja Spectrum, Rojo Spectrum, Colorantes de Infra-Rojo (IR), GDP-Ribosa cíclica (cGDP), Blanco Calcofluor, Lisamina, Umbeliferona, Tirosina o Triptófano. En algunas realizaciones, un generador de señal puede incluir esencialmente un colorante de cianina. En algunas realizaciones, un generador de señal puede incluir esencialmente uno o más de colorante Cy3, colorante Cy5 o colorante Cy7.

25 En algunas realizaciones, el generador de señal puede ser parte de un par FRET. El par FRET incluye dos fluoróforos que son capaces de someterse a FRET para producir o eliminar una señal detectable cuando se posicionan en proximidad uno respecto al otro. Algunos ejemplos de donantes pueden incluir Alexa 488, Alexa 546, BODIPY 493, Oyster 556, Fluor (FAM), Cy3 o TTR (Tamra). Algunos ejemplos de aceptores pueden incluir Cy5, Alexa 594, Alexa 647 u Oyster 656.

30 En algunas realizaciones, un generador de señal puede incluir un fluoróforo capaz de ser destruido químicamente por un agente oxidante. En algunas realizaciones, un generador de señal puede incluir esencialmente cianina, cumarina, BODIPY, ATTO 658 o ATTO 634, capaces de ser destruidos químicamente por un agente oxidante. En algunas realizaciones, un generador de señal puede incluir uno o más de colorante Cy3, colorante Cy5 o colorante Cy7 capaces de ser destruidos o detenidos.

45 Agentes químicos

La presente invención emplea un agente químico que comprende una disolución que comprende un agente oxidante capaz de modificar el generador de señal.

50 En algunas realizaciones los agentes oxidantes pueden ser, por ejemplo, especies de oxígeno activo, radicales hidroxilo, oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno u ozono. En algunas realizaciones, el agente químico puede incluir peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, dicromato sódico, bromuro acuoso, yoduro de potasio-yodo o t-butil hidroperóxido.

55 Uno o más de los agentes químicos mencionados anteriormente pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria dependiendo de la susceptibilidad del generador de señal, del elemento de unión, de la diana o de la muestra biológica frente al agente químico. En algunas realizaciones, se puede emplear un agente químico que esencialmente no afecta a la integridad del elemento de unión, la diana y la muestra biológica. En algunas

realizaciones, se puede emplear un agente químico que no afecte a la especificidad de la unión entre el elemento de unión y la diana.

- En algunas realizaciones, en las que se pueden emplear dos o más (hasta cuatro) generadores de señal simultáneamente, un agente químico puede ser capaz de modificar selectivamente uno o más generadores de señal.
- 5 La susceptibilidad de los diferentes generadores de señal frente a un agente químico puede depender, en parte, de la concentración del generador de señal, la temperatura o el pH. Por ejemplo, dos fluoróforos diferentes pueden presentar diferente susceptibilidad frente a un agente oxidante dependiendo de la concentración del agente oxidante.
- 10 En algunas realizaciones, un agente químico puede incluir esencialmente un agente oxidante. En otras realizaciones, un agente químico puede incluir esencialmente una disolución básica de un agente oxidante. En algunas realizaciones específicas, una disolución básica puede tener un pH en un intervalo de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 10. En algunas realizaciones, una disolución básica (p.ej., de bicarbonato sódico) puede tener un pH de aproximadamente 10.
- 15 Un agente oxidante adecuado puede seleccionarse entre peróxido, peryodato sódico u ozono. En algunas realizaciones, un agente oxidante adecuado puede incluir peróxido o una fuente de peróxido y la disolución básica puede incluir peróxido de hidrógeno. La concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución básica puede seleccionarse para oxidar sustancialmente el generador de señal fluorescente en un periodo predeterminado de tiempo. En algunas realizaciones, la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución básica se puede seleccionar para desactivar sustancialmente tanto el generador de señal fluorescente como la enzima en un periodo de tiempo dado. La concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución básica puede seleccionarse de tal modo que se mantenga la integridad de la muestra, las dianas, el elemento de unión, o la especificidad diana-elemento de unión.
- 20 En algunas realizaciones, una disolución básica puede incluir peróxido de hidrógeno en una cantidad que esté en el intervalo de entre aproximadamente 0,5 por ciento en volumen hasta aproximadamente 5 por ciento en volumen, en un intervalo de entre aproximadamente 1 por ciento en volumen hasta aproximadamente 4 por ciento en volumen, o en un intervalo de entre aproximadamente 1,5 por ciento en volumen hasta aproximadamente 3,5 por ciento en volumen. En realizaciones específicas, una disolución básica puede incluir peróxido de hidrógeno en una cantidad que esté en un intervalo de aproximadamente 3 por ciento en volumen.
- 25 En algunas realizaciones, la disolución básica no puede incluir reactivos que separen o lixivien de la muestra los elementos de unión, las dianas o tanto los elementos de unión como las dianas, tales como agentes reductores o tensioactivos.
- 30 Análisis secuencial de una muestra biológica, puesta en contacto y unión de la sonda
- Una muestra biológica se puede poner en contacto con una sonda para unir la sonda a una diana de la muestra biológica. En algunas realizaciones, una diana puede no ser fácilmente accesible para la unión con la sonda y una muestra biológica puede ser procesada adicionalmente para facilitar la unión entre la diana y el elemento de unión de la sonda, por ejemplo mediante recuperación de antígeno, digestión enzimática, recuperación de epítopo, o bloqueo.
- 35 En algunas realizaciones, se puede poner en contacto una sonda con la muestra biológica en forma de disolución. En algunas realizaciones, una sonda puede incluir un elemento de unión acoplado a una marca (generador de señal fluorescente). El elemento de unión y la marca (generador de señal) pueden constituir una única molécula y se puede aplicar la disolución de sonda en una única etapa. Alternativamente, el elemento de unión y la marca (generador de señal) pueden ser entidades distintas y la disolución de sonda se puede aplicar en una sola etapa o en etapas múltiples. En todas las realizaciones, una sonda de control puede ligarse adicionalmente a una o más dianas de la muestra.
- 40 En algunas realizaciones, dependiendo de la naturaleza del elemento de unión, de la diana y de la unión entre ambos, se puede permitir el tiempo de contacto suficiente. En algunas realizaciones, se puede emplear un exceso de moléculas sonda (y por consiguiente de moléculas de elemento de unión) para asegurar que se unen todas las dianas de la muestra biológica. Tras proporcionar un tiempo suficiente para la acción de unión, la muestra puede ponerse en contacto con una disolución de lavado (por ejemplo una disolución tampón apropiada) para eliminar por lavado las sondas no ligadas. Dependiendo de la concentración y del tipo de sonda usada, se puede someter una muestra biológica a una serie de etapas de lavado con las mismas o con diferentes disoluciones de lavado que se estén empleando en cada etapa.
- 45 En algunas realizaciones, la muestra biológica puede ponerse en contacto con más de una sonda en la primera etapa de unión. La pluralidad de sondas pueden ser capaces de unirse a diferentes dianas de la muestra biológica. Por ejemplo, una muestra biológica puede incluir dos dianas: diana 1 y diana 2, y para este caso se pueden usar dos conjuntos de sondas: sonda 1 (que tiene un elemento de unión 1 capaz de unirse a la diana 1) y sonda 2 (que tiene el elemento de unión 2 que es capaz de unirse a la diana 2). Se puede poner en contacto una pluralidad de sondas
- 50
- 55

con la muestra biológica de forma simultánea (por ejemplo, como una mezcla única) o de forma secuencial (por ejemplo, se puede poner en contacto una sonda 1 con la muestra biológica, seguido de una etapa de lavado para eliminar cualquier sonda 1 no ligada, seguido de la puesta en contacto de una sonda 2 con la muestra biológica, etcétera).

- 5 El número de sondas que pueden ligarse simultáneamente a la diana puede depender del tipo de detección empleada, es decir, de la resolución espectral alcanzable. Por ejemplo, para generadores de señal basados en fluorescencia, se pueden emplear cuatro sondas diferentes (que proporcionen cuatro señales fluorescentes resolubles espectralmente) según los métodos descritos. Resolubles espectralmente, en referencia a una pluralidad de generadores de señal fluorescentes, indica que las bandas de emisión fluorescente de los generadores de señal son suficientemente distintas, es decir, suficientemente no solapadas, de tal modo que los elementos de unión a los que se unen los respectivos generadores de señal pueden distinguirse en base a la señal fluorescente generada por los respectivos generadores de señal usando sistemas de fotodetección estándares.
- 10

En algunas realizaciones, una muestra biológica puede ponerse en contacto esencialmente con cuatro o menos de cuatro sondas en la primera etapa de unión. En las realizaciones que emplean sondas basadas en enzimas, el número de sondas que pueden unirse simultáneamente a la diana también puede depender del número de enzimas diferentes y sus correspondientes sustratos disponibles.

15 La muestra biológica incluye una muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse a través de una variedad de procedimientos que incluyen, aunque sin limitación, escisión quirúrgica o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado.

- 20 En algunas realizaciones, la muestra de tejido puede estar fijada y embebida en parafina. La muestra de tejido puede ser fijada, o conservada de otro modo, por metodologías convencionales; la elección de un fijador puede determinarse a través del propósito para el cual el tejido va a ser teñido histológicamente, o analizado de cualquier otro modo. La longitud de la fijación puede depender del tamaño de la muestra de tejido y del fijador usado. Por ejemplo, se puede usar formalina tamponada neutral, Bouin's o paraformaldehído, para fijar o conservar una muestra de tejido.
- 25

En algunas realizaciones, la muestra de tejido puede fijarse primero y posteriormente deshidratarse mediante una serie ascendente de alcoholes, infiltrarse y embeberse en parafina u otro medio de seccionamiento de tal modo que la muestra de tejido pueda ser seccionada. En una realización alternativa, se puede seccionar una muestra de tejido y posteriormente ser fijada. En algunas realizaciones, la muestra de tejido puede embeberse y procesarse en parafina. Los ejemplos de parafinas que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez que la muestra de tejido está embebida, la muestra puede seccionarse con un micrótomo en secciones que pueden tener un espesor en el intervalo de entre aproximadamente tres micras y aproximadamente cinco micras. Una vez seccionado, las secciones pueden unirse a portaobjetos usando adhesivos. Los ejemplos de adhesivos de portaobjeto pueden incluir, aunque sin limitación, silano, gelatina, poli-L-lisina. En algunas realizaciones, si se usa parafina como material para embeber, las secciones de tejido pueden desparafinarse y rehidratarse en agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse, por ejemplo, usando agentes orgánicos (tales como xilenos o una serie gradualmente descendente de alcoholes).

30

35

40

45

50

55

En algunas realizaciones, aparte de los procedimientos de preparación de muestra discutidos anteriormente, la sección de tejido puede someterse a un tratamiento adicional antes, durante o después de la inmunohistoquímica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la sección de tejido puede someterse a métodos de recuperación de epítopos, tales como calentar la muestra de tejido en tampón de citrato. En algunas realizaciones, se puede someter opcionalmente una sección de tejido a una etapa de bloqueo para minimizar cualquier unión no específica.

Después de preparar la muestra de tejido, se puede poner en contacto una disolución de sonda (p.ej., disolución marcada con anticuerpo) con la sección de tejido durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para unir el elemento de unión a la diana (p.ej., antígeno). Tal como se ha descrito anteriormente, se pueden usar dos métodos de detección: directa o indirecta. En una detección directa, se puede incubar un anticuerpo primario marcado con generador de señal (anticuerpo primario marcado con fluoróforo) con un antígeno de la muestra de tejido, que puede visualizarse sin ninguna interacción de anticuerpo adicional. En una detección indirecta, se puede incubar un anticuerpo primario no conjugado con un antígeno y después se puede unir un anticuerpo secundario marcado al anticuerpo primario. Se puede producir una amplificación de señal ya que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos sobre el anticuerpo primario. En algunas realizaciones se puede poner en contacto dos o más (como mucho cuatro) anticuerpos primarios (marcados o no marcados) con la muestra de tejido. A continuación los anticuerpos no marcados se pueden poner en contacto con los correspondientes anticuerpos secundarios marcados.

Observación de una señal procedente de la sonda

Se puede detectar una señal procedente del generador de señal (marca fluorescente) usando un sistema de detección. La naturaleza del sistema de detección usado puede depender de la naturaleza de los generadores de señal usados. El sistema de detección puede incluir un sistema de detección fluorescente.

En algunas realizaciones, la intensidad de señal, la longitud de onda de la señal, la localización de la señal, la frecuencia de la señal o el desplazamiento de la señal se pueden determinar usando una o más de las técnicas mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, una o más de las características de la señal mencionadas anteriormente pueden observarse, medirse y registrarse.

- 5 El generador de señal (acoplado a un elemento de unión) incluye un fluoróforo y se puede determinar la longitud de onda de fluorescencia o la intensidad de fluorescencia usando un sistema de detección de fluorescencia. En algunas realizaciones, se puede observar una señal *in situ*, es decir, se puede observar directamente desde el generador de señal asociado a través del elemento de unión a la diana de la muestra biológica. En algunas realizaciones, se puede analizar una señal procedente del generador de señal dentro de la muestra biológica, obviando la necesidad de sistemas de detección separados basados en arrays.

- 10 En algunas realizaciones, la observación de una señal puede incluir la captura de una imagen de la muestra biológica. En algunas realizaciones, se puede usar un microscopio conectado a un dispositivo de obtención de imágenes como sistema de detección, de acuerdo a los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el generador de señal (fluoróforo) puede ser excitado y la señal (señal de fluorescencia) obtenida puede observarse y registrarse en forma de señal digital (por ejemplo, una imagen digitalizada). Se puede repetir el mismo procedimiento para diferentes generadores de señal (si están presentes) que estén ligados en la muestra usando los filtros de fluorescencia apropiados.

Aplicación de un agente químico para modificar la señal

- 20 Se puede aplicar un agente químico a la muestra para modificar la señal. En algunas realizaciones, la modificación de señal puede incluir uno o más de los siguientes: cambio en las características de la señal, por ejemplo, una disminución de la intensidad de la señal, un desplazamiento del pico de la señal, un cambio en la frecuencia de resonancia, o la ruptura (eliminación) del generador de señal que da como resultado la eliminación de la señal. En la presente invención se aplica un agente químico para modificar la señal a través de la desactivación sustancial del generador de señal de fluorescencia. El agente químico incluye un agente oxidante, que puede oxidar sustancialmente el generador de señal fluorescente. En algunas realizaciones, se puede aplicar un agente químico para modificar la señal mediante la oxidación sustancial del enlace de ruptura para eliminar el generador de señal.

- 25 En algunas realizaciones, un agente químico puede estar en la forma de una disolución y la muestra puede ponerse en contacto con la disolución de agente químico durante un periodo de tiempo predeterminado. En algunas realizaciones, un agente químico puede ser una disolución básica que tiene un agente oxidante. La concentración de la disolución básica y el tiempo de contacto pueden depender del tipo de modificación de señal deseada. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto una disolución de agente químico con la muestra y la etapa de oxidación se puede llevar a cabo durante menos de 30 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de oxidación se puede llevar a cabo durante menos de 15 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de oxidación se puede llevar a cabo durante aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de oxidación se puede llevar a cabo durante aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de oxidación puede llevarse a cabo a temperatura ambiente.

- 30 En algunas realizaciones, las condiciones de contacto para la disolución básica pueden seleccionarse de tal modo que el elemento de unión, la diana, la muestra biológica y la unión entre el elemento de unión y la diana no se vean afectados. En algunas realizaciones, un agente oxidante solo puede afectar al generador de señal y el agente de oxidación no puede afectar a la unión de diana/elemento de unión o a la integridad del elemento de unión. Por tanto, a modo de ejemplo, un elemento de unión puede incluir un anticuerpo primario o una combinación de un anticuerpo primario/secundario. Un agente de oxidación según los métodos descritos en la presente memoria solo puede afectar al generador de señal, y el anticuerpo primario o la combinación de anticuerpo primario/anticuerpo secundario pueden permanecer esencialmente inalterados. En algunas realizaciones, un elemento de unión (tal como, un anticuerpo primario o una combinación de anticuerpo primario/anticuerpo secundario) puede permanecer unido a la diana en la muestra biológica después de poner en contacto la muestra con el agente oxidante.

- 35 En algunas realizaciones, un elemento de unión puede permanecer unido a la diana de la muestra biológica tras poner en contacto la muestra con el agente oxidante, y la integridad del elemento de unión puede permanecer esencialmente inalterada (por ejemplo, un anticuerpo no puede desnaturalizarse sustancialmente o eluirse sustancialmente en presencia de un agente químico). En algunas realizaciones, tras la aplicación del agente oxidante a la muestra menos del 25 por ciento de los elementos de unión pueden ser separados de las dianas de la muestra biológica. En algunas realizaciones, tras la aplicación del agente oxidante a la muestra menos del 20, menos del 15 por ciento, menos del 10 por ciento o menos del 5 por ciento de los elementos de unión pueden ser separados de las dianas de la muestra biológica.

- 40 45 50 55 En algunas realizaciones, se puede observar una característica de la señal tras poner en contacto la muestra con el agente oxidante para determinar la eficacia de la modificación de la señal. Por ejemplo, se puede observar un color antes de la aplicación del agente oxidante y el color puede estar ausente tras la aplicación del agente oxidante. En otro ejemplo, la intensidad de fluorescencia procedente del generador de señal fluorescente puede observarse antes de entrar en contacto con el agente oxidante y tras poner entrar en contacto con el agente oxidante. En algunas

realizaciones, una reducción de la intensidad de señal en una cantidad predeterminada puede referirse como una modificación de señal. En algunas realizaciones, la modificación de la señal puede referirse a una reducción de la intensidad de señal en una cantidad que esté en un intervalo superior a aproximadamente el 50 por ciento. En algunas realizaciones, la modificación de la señal puede referirse a una reducción de la intensidad de señal en una cantidad en un intervalo superior a aproximadamente el 60 por ciento. En algunas realizaciones, la modificación de la señal se puede referir a una reducción de la intensidad de señal en una cantidad en un intervalo superior a aproximadamente el 80 por ciento.

5 Puesta en contacto de la muestra con la sonda subsiguiente y unión a la diana subsiguiente

10 La muestra biológica o la muestra ligada a un soporte sólido puede ponerse en contacto con la sonda subsiguiente usando uno o más de los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria para la primera sonda. La sonda subsiguiente puede ser capaz de unirse a una diana diferente de la diana ligada en las etapas previas. En las realizaciones en las se puede poner en contacto una pluralidad de sondas con la muestra biológica en las etapas de contacto con sonda previas, la sonda subsiguiente puede ser capaz de unirse a una diana diferente de las dianas ligadas por el conjunto de sondas previo. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto una muestra biológica con una pluralidad de sondas en la etapa de contacto con la sonda subsiguiente.

15 En algunas realizaciones, el generador de señal (p.ej., un generador de señal fluorescente) usado en las diferentes etapas puede ser el mismo, es decir, detectable en el mismo canal de detección. Los métodos que emplean el mismo generador de señal en diferentes etapas de unión puede permitir la detección de dianas múltiples cuando se dispone de un número limitado de canales de detección. En algunas realizaciones, en las que se puede usar un 20 conjunto de sondas (de 2 a 4 sondas) en la primera etapa de unión, las sondas subsiguientes pueden incluir los mismos generadores de señal que en las etapas de unión previas. Por ejemplo, una primera etapa de unión puede incluir diferentes elementos de unión conjugados a Cy3, Cy5 y Cy7. En algunas realizaciones, las etapas de unión subsiguientes también pueden incluir el mismo conjunto de colorantes, es decir, Cy3, Cy5 y Cy7.

25 En algunas realizaciones, el generador de señal (p.ej., un generador de señal fluorescente) usado en las diferentes etapas de unión puede ser diferente, es decir, detectable de forma independiente en diferentes canales de detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una primera sonda puede incluir un colorante Cy3, que tiene una longitud de onda de emisión fluorescente en la región verde y una sonda subsiguiente puede incluir un colorante Cy7, que tiene una longitud de onda de emisión fluorescente en la región roja.

Observación de una señal subsiguiente procedente de una sonda subsiguiente

30 Se puede usar uno o más métodos de detección descritos anteriormente en la presente memoria para observar una o más características de una señal subsiguiente (p.ej., segunda, tercera, etc.) procedente de un generador de señal subsiguiente (presente en la sonda subsiguiente). En algunas realizaciones, se puede determinar la intensidad de señal, la longitud de onda de señal, la localización de la señal, la frecuencia de la señal o el desplazamiento de señal usando una o más de las técnicas mencionadas anteriormente. De forma similar a la primera señal, una señal 35 subsiguiente (por ejemplo, una señal de fluorescencia) obtenida se puede registrar en forma de señal digital (por ejemplo, una imagen digitalizada). En algunas realizaciones, la observación de la señal subsiguiente también puede incluir la captura de una imagen óptica de la muestra biológica.

Reiteración de las etapas de puesta en contacto, unión y observación

40 En algunas realizaciones, tras poner en contacto la muestra con una sonda subsiguiente (p.ej., segunda, tercera, etc.), la oxidación del generador de señal y la administración de la sonda subsiguiente puede repetirse múltiples veces. En algunas realizaciones, tras observar una segunda señal procedente de la segunda sonda, la muestra biológica puede ponerse en contacto con un agente oxidante para modificar la señal procedente de la segunda sonda. Además, se puede poner en contacto una tercera sonda con la muestra biológica, donde la tercera sonda 45 puede ser capaz de unirse a una diana diferente de la primera y la segunda sondas. Asimismo, una señal procedente de la tercera sonda puede observarse después de una aplicación de agente oxidante para modificar la señal. La unión, la observación y las etapas de oxidación pueden repetirse iterativamente múltiples veces usando una enésima sonda capaz de unirse a dianas adicionales para proporcionar al usuario información sobre una variedad de dianas usando una variedad de sondas y/o de generadores de señal. En algunas realizaciones, las etapas de oxidación, unión, reacción (si es aplicable) y observación pueden repetirse una o más veces. En algunas 50 realizaciones, las etapas de oxidación, unión, reacción (si es aplicable) y observación pueden repetirse al menos 5, al menos 10 ó al menos 20 veces.

55 En algunas realizaciones, se puede poner en contacto una serie de sondas con la muestra biológica de un modo secuencial para obtener un análisis multiplexado de la muestra biológica. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto una serie de conjuntos de sonda (que incluyen como mucho 4 sondas por conjunto) con la muestra biológica de un modo secuencial para obtener un análisis multiplexado de la muestra biológica. El análisis multiplexado generalmente se refiere al análisis de dianas múltiples de una muestra biológica usando el mismo mecanismo de detección.

- Poner en contacto la muestra con una o más cepas morfológicas
- La muestra biológica incluye un tejido, y la muestra se puede poner en contacto con un tinte morfológico antes, durante o después de la etapa de contacto con la primera sonda o la sonda subsiguiente. Un tinte morfológico puede incluir un colorante que puede teñir diferentes componentes celulares, a fin de facilitar la identificación del tipo celular o del estatus de la enfermedad. En algunas realizaciones, el tinte morfológico puede distinguirse fácilmente de los generadores de señal de las sondas, es decir, el tinte no puede emitir señal que pueda solapar con la señal procedente de la sonda. Por ejemplo, para un tinte morfológico fluorescente, la señal procedente del tinte morfológico no puede autofluorescer en la misma longitud de onda que los fluoróforos usados en las sondas.
- Un tinte morfológico puede ponerse en contacto con la muestra biológica antes, durante o después de una cualquiera de las etapas mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto un tinte morfológico con la muestra biológica antes de poner en contacto la muestra con una gente químico y después de unir la primera sonda con la diana. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto un tinte morfológico con una muestra biológica tras poner en contacto la muestra con un agente químico y modificar la señal. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto un tinte morfológico con una muestra biológica junto con la etapa de contacto de la segunda sonda. En algunas realizaciones, se puede poner en contacto una muestra biológica con el tinte morfológico tras unir la segunda sonda a la diana. En algunas realizaciones, en las que los tintes morfológicos pueden dar como resultado ruido de fondo para la señal fluorescente procedente del generador de señal, los tintes morfológicos pueden ponerse en contacto con la muestra biológica después de las etapas de sondeo, oxidación y resondeo. Por ejemplo, los tintes morfológicos como H&E pueden ser tratados como imágenes secuencialmente y registrados tras los métodos descritos en la presente memoria.
- En algunas realizaciones, se pueden usar cromóforos, fluoróforos o sistemas enzima/sustrato de enzima como tintes morfológicos. Los ejemplos adecuados de cromóforos que pueden usarse como tintes morfológicos (y sus células diana, compartimentos subcelulares o componentes celulares) pueden incluir, aunque sin limitación, Eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hematoxilina (ácidos nucleicos), Naranja G (sangre roja, páncreas y células pituitarias), Verde Claro SF (colágeno), Romanowsky-Giemsa (morfología celular general), May-Grunwald (células sanguíneas), Contratinte Azul (Trevigen), Verde de Etilo (CAS) (amiloide), Amarillo S Feulgen-Naftol (ADN), Giemsa (tiñe diferencialmente varios compartimentos celulares), Verde de Metilo (amiloide), Pironina (ácidos nucleicos), Amarillo de Naftol (células sanguíneas rojas), Rojo Neutro (núcleos), tinte Papanicolaou (una mezcla de Hematoxilina, Eosina Y, Naranja G y mezcla de Marrón Bismarck (morfología celular general)), Contratinte Rojo B (Trevigen), Contratinte Rojo C (Trevigen), Rojo Sirius (amiloide), reactivo de Feulgen (pararosanilina) (ADN), crom-alum de Gallocianina (ADN), crom-alum de Gallocianina y Amarillo Naftol S (ADN), Verde de metilo-Pironina Y (ADN) Tionina-reactivo de Feulgen (ADN), Naranja de Acridina (ADN), Azul de Metileno (ARN y ADN), Azul de Toluidina (ARN y ADN), Azul Alciano (carbohidratos), Rojo de Rutenio (carbohidratos), Negro de Sudán (lípidos), Sudán IV (lípidos), Rojo Aceite-O (lípidos), tinte tricromo de Van Gieson (mezcla de fucsina ácida y ácido pícrico) (células de músculo), tinte tricromo de Masson (mezcla de hematoxilina, fucsina ácida y Verde Ligero) (tiñe colágeno, citoplasma y nucleólos diferencialmente), Fucsina de Aldehído (fibras de elastina) o tinte de Weigert (diferencia entre fibras reticulares y de colágeno).
- Los ejemplos de tintes morfológicos fluorescentes adecuados (y sus células diana, compartimentos subcelulares o componentes celulares si es aplicable) pueden incluir, aunque sin limitación: 4',6-diamidino-2-fenilindona (DAPI) (ácidos nucleicos), Eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hoechst 33258 y Hoechst 33342 (dos bisbenzimidazoles) (ácidos nucleicos), Yoduro de Propidio (ácidos nucleicos), Naranja Spectrum (ácidos nucleicos), Verde Spectrum (ácidos nucleicos), Quinacrina (ácidos nucleicos), Fluoresceína-falloïdina (fibras de actina), Cromomicina A 3 (ácidos nucleicos), Acriflavina-reacción de Feulgen (ácido nucleico), Auramina O-reacción de Feulgen (ácidos nucleicos), Bromuro de Etidio (ácidos nucleicos), tintes Nissl (neuronas), fluoróforos de alta afinidad de ADN tales como POPO, BOBO, YOYO y TOTO y otros, y Proteína Fluorescente Verde fusionada a proteína de unión a ADN, tales como histonas, ACMA, Quinacrina y Naranja de Acridina.
- Los ejemplos de enzimas adecuadas (y sus localizaciones o actividades celulares primarias) pueden incluir, aunque sin limitación, ATPasas (fibras musculares), succinato deshidrogenasas (mitocondrias), citocromo c oxidases (mitocondrias), fosforilasas (mitocondrias), fosfofructocinasas (mitocondrias), acetil colinesterasas (células nerviosas), lactasas (intestino delgado), fosfatases ácidas (lisosomas), leucina aminopeptidasas (células hepáticas), deshidrogenasas (mitocondrias), miodenilato desaminasas (células musculares), NADH diaforasas (eritrocitos) y sacarasas (intestino delgado).
- En algunas realizaciones, un tinte morfológico puede ser estable frente a un agente oxidante, es decir, las propiedades generadoras de señal del tinte morfológico pueden no verse afectadas sustancialmente por el agente oxidante. En algunas realizaciones, en las que se puede teñir una muestra biológica con una sonda y un tinte morfológico al mismo tiempo, la aplicación de agente oxidante para modificar la señal procedente de la sonda no puede modificar la señal procedente del tinte morfológico. En algunas realizaciones, se puede usar un tinte morfológico como un control para co-registrar la información molecular (obtenida a través de etapas de sondeo iterativas) y la información morfológica (obtenida a través de tintes morfológicos).
- 60 Puesta en contacto de la muestra con una o más sondas de control

En la presente invención, se puede ligar una sonda de control a una o más dianas de la muestra biológica. En algunas realizaciones, se puede enlazar una sonda de control a dianas junto con la primera etapa de contacto de sonda. En algunas realizaciones, se puede aplicar una sonda de control a la muestra biológica simultáneamente a la primera sonda. En algunas realizaciones, se puede aplicar una sonda de control a la muestra biológica de forma secuencial, es decir antes o después de la aplicación de la primera sonda, pero antes de la aplicación del agente oxidante.

Una sonda de control puede incluir un generador de señal que sea estable frente a un agente oxidante o las propiedades de generación de señal del generador de señal no se ven afectadas sustancialmente cuando se ponen en contacto con el agente oxidante. Un generador de señal puede incluir un radioisótopo que sea estable frente al agente oxidante o un fluoróforo que sea estable frente al agente oxidante. Un radioisótopo adecuado puede incluir ^{32}P ó ^{3}H , ^{14}C , ^{125}I ó ^{131}I . Un fluoróforo puede incluir DAPI.

En algunas realizaciones, se puede acoplar un generador de señal adecuado a un elemento de unión para formar una sonda de control. Por ejemplo, se puede acoplar una marca radioactiva a un anticuerpo para formar una sonda de control y el anticuerpo se puede unir a uno o más antígenos diana presentes en la muestra biológica. En otras realizaciones, un generador de señal adecuado puede ser capaz de unirse a una o más dianas de la muestra y también de proporcionar una señal detectable, que es estable en presencia del agente oxidante. Por ejemplo, una sonda de control adecuada puede ser DAPI, que es capaz de unirse a ácidos nucleicos en la muestra y también es capaz de proporcionar una señal fluorescente que sea estable frente al agente oxidante.

En algunas realizaciones, se puede emplear una sonda de control en los métodos descritos en la presente memoria para proporcionar una indicación de la estabilidad de las dianas en las etapas de tinción iterativas. Por ejemplo, se puede enlazar una sonda de control a una diana conocida de la muestra y se puede observar y cuantificar una señal procedente del control. La señal del control puede monitorizarse a continuación durante las etapas de tinción iterativas para proporcionar una indicación de la estabilidad de las dianas o elementos de unión frente a los agentes oxidantes. En algunas realizaciones, se puede monitorizar una medida cuantitativa de la señal de control (por ejemplo, la intensidad de señal) para cuantificar la cantidad de dianas presentes en la muestra después de las etapas de sondeo iterativas.

En algunas realizaciones, se puede emplear una sonda de control para obtener información cuantitativa de la muestra de interés, por ejemplo la concentración de dianas de la muestra o el peso molecular de las dianas de la muestra. Por ejemplo, se puede cargar una diana de control (que tenga una concentración conocida o un peso molecular conocido) junto con la muestra de interés en una técnica de inmunotinción. Se puede enlazar una sonda de control a la diana de control y se puede observar una señal de control. A continuación la señal de control se puede correlacionar con las señales observadas procedentes de la muestra de interés usando los métodos descritos a continuación en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se puede emplear una sonda de control en los métodos descritos en la presente memoria para proporcionar el co-registro de información molecular múltiple (obtenida a través de etapas de sondeo iterativas) y de información morfológica (obtenida, p.ej., usando DAPI). En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir el co-registro de múltiples imágenes fluorescentes con las imágenes morfológicas de campo brillante obtenidas, p.ej., usando H&E. En algunas realizaciones, las sondas empleadas en las etapas de sondeo iterativas no pueden tener ninguna información compartimental común que pueda ser usada para registrar con las imágenes de H&E. Se puede emplear una sonda de control como un tinte nuclear DAPI para co-registrar los núcleos teñidos con hematoxilina en las imágenes de campo brillante con las imágenes fluorescentes. Las imágenes fluorescentes y las imágenes de campo brillante puede co-registrarse usando algoritmos de registro de imágenes que pueden agruparse en dos categorías: técnicas basadas en intensidad y técnicas basadas en características.

Correlación de la primera señal y las señales subsiguientes

En algunas realizaciones, se puede analizar una primera señal, una señal subsiguiente, o la primera señal y las señales subsiguientes para obtener información relativa a la muestra biológica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presencia o la ausencia de una primera señal puede indicar la presencia o la ausencia de la primera diana (capaz de unirse al primer elemento de unión) en la muestra biológica. De forma similar, la presencia o la ausencia de una segunda señal puede indicar la presencia o la ausencia de la segunda diana (capaz de unirse al segundo elemento de unión de la muestra biológica). En realizaciones en las que se pueden analizar dianas múltiples usando una pluralidad de sondas, la presencia o la ausencia de una señal particular puede indicar la presencia o la ausencia de la diana correspondiente en la muestra biológica.

En algunas realizaciones, las etapas de observación pueden incluir una medida cuantitativa de al menos una diana de la muestra. En algunas realizaciones, se puede medir un valor de intensidad de una señal (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) y puede correlacionarse con la cantidad de diana de la muestra biológica. Se puede determinar una correlación entre la cantidad de diana y la intensidad de señal usando patrones de calibración. En algunas realización, los valores de intensidad de la primera y segunda señales pueden medirse y correlacionarse con las respectivas cantidades de diana. En algunas realizaciones, comparando las dos intensidades de señal, se pueden determinar las cantidades relativas de la primera diana y la segunda diana (una respecto a la otra, o

- respecto a un control). De forma similar, cuando se pueden analizar dianas múltiples usando sondas múltiples, se pueden determinar las cantidades relativas de diferentes dianas de la muestra biológica midiendo diferentes intensidades de señal. En algunas realizaciones, se puede usar una o más muestras de control como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Observando la presencia o la ausencia de una señal en las muestras (muestra biológica de interés frente a control), se puede obtener información relativa a la muestra biológica. Por ejemplo, comparando una muestra de tejido enfermo con una muestra de tejido normal, se puede obtener información relativa a las dianas presentes en la muestra de tejido enfermo. De forma similar, comparando intensidades de señal entre las muestras (es decir, la muestra de interés y una o más de control), se puede obtener información relativa a la expresión de dianas en la muestra.
- 10 En algunas realizaciones, las etapas de observación incluyen la co-localización de al menos dos dianas en la muestra. Los métodos para co-localizar dianas en una muestra se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de Serie 11/686.649, titulada "System and Methods for Analyzing Images of Tissue Samples", presentada el 15 de marzo de 2007; en la Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de Serie 11/500.028, titulada "System and Method for Co-Registering Multi-Channel Images of a Tissue Micro Array", presentada el 7 de agosto de 2006; en la Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de Serie 11/606.582, titulada "System and Methods for Scoring Images of a Tissue Micro Array", presentada el 30 de noviembre de 2006, y en la Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de Serie 11/680.063, titulada "Automated Segmentation of Image Structures", presentada el 28 de febrero de 2007, todas las cuales se incorporan a la presente memoria a modo de referencia.
- 15 En algunas realizaciones, se puede observar una localización de la señal en la muestra biológica. En algunas realizaciones, se puede observar una localización de la señal en la muestra biológica usando tintes morfológicos. En algunas realizaciones se pueden observar las localizaciones relativas de dos o más señales. Una localización de la señal se puede correlacionar con una localización de la diana en la muestra biológica, proporcionando información relativa a la localización de dianas diferentes en la muestra biológica. En algunas realizaciones, se puede correlacionar un valor de intensidad de la señal y una localización de la señal para obtener información relativa a la localización de diferentes dianas de la muestra biológica. Por ejemplo, se pueden expresar determinadas dianas más en el citoplasma que en el núcleo, o viceversa. En algunas realizaciones, se puede obtener información relativa a la localización de dianas comparando la localización y los valores de intensidad de dos o más señales.
- 20 En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo una o más de las etapas de observación o correlación usando medios asistidos por ordenador. En las realizaciones en las que la(s) señal(es) procedentes del generador de señal puede(n) almacenarse en forma de imagen(es) digital(es), se puede llevar a cabo un análisis de imagen(es) asistido por ordenador. En algunas realizaciones, las imágenes (p.ej., las señales procedentes de sonda(s) y tintes morfológicos) pueden sobreponerse usando superposición asistida por ordenador para obtener una información completa de la muestra biológica, por ejemplo información topológica o de correlación.
- 25 En algunas realizaciones, se puede automatizar una o más de las mencionadas anteriormente y se pueden llevar a cabo usando sistemas automatizados. En algunas realizaciones, todas las etapas se pueden llevar a cabo usando sistemas automatizados.
- 30 Los métodos descritos en la presente memoria pueden encontrar aplicación en aplicaciones analíticas, diagnósticas y terapéuticas en biología y en medicina. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden encontrar aplicación en histoquímica, particularmente inmunohistoquímica. El análisis de muestras de células o de tejido de un paciente, según los métodos descritos en la presente memoria, se pueden emplear para diagnóstico (p.ej., para identificar pacientes que tienen una enfermedad particular, que han sido expuestos a una toxina particular o que responden bien a una terapia particular o a un trasplante de órgano) y para prognosis (p.ej., para identificar pacientes que tienen probabilidad de desarrollar una enfermedad particular, de responder bien a una terapia particular o de aceptar un trasplante de órgano particular). Los métodos descritos en la presente memoria pueden facilitar un análisis preciso y fiable de una pluralidad (p.ej. potencialmente un número infinito) de dianas (p.ej., marcadores de enfermedad) procedentes de la misma muestra biológica.
- 35 EJEMPLO 1. Oxidación selectiva de colorantes de cianina usando peróxido de hidrógeno sin afectar DAPI
- 40 Una disolución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se preparó en un tampón de bicarbonato sódico mezclando 1 volumen de bicarbonato sódico 1M, 3 volúmenes de agua y 1 volumen de peróxido de hidrógeno al 30 por ciento (v/v). El pH del bicarbonato sódico se ajustó a un pH 10 usando hidróxido sódico, antes de mezclar con peróxido de hidrógeno.
- 45 Tres disoluciones separadas de colorantes de cianina: Cy3, Cy5 y Cy7 se prepararon en agua en una concentración de aproximadamente 2 μM . Se mezcló una alícuota de una disolución de colorante de cianina con una alícuota de la disolución de H_2O_2 para preparar una disolución de muestra con una concentración final de aproximadamente 3 por ciento en volumen de H_2O_2 y 1 micromolar 1 μM de colorante de cianina (Muestras 1 (Cy3), 2 (Cy5) y 3 (Cy7)). Como control se usó una disolución de colorante de cianina 1 μM en agua (sin H_2O_2).
- 50 La reacción de oxidación del colorante de cianina se monitorizó midiendo el espectro de absorbancia del colorante en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (UV/Vis) en función del tiempo. La Figura 1 muestra los espectros de

absorbancia de la Muestra 1 en función de la longitud de onda, tras una duración de 10 minutos y 15 minutos. El valor de absorbancia disminuyó considerablemente en comparación con el control. La Figura 2 muestra los valores de absorbancia para las Muestras 1, 2 y 3 en función de la longitud de onda. La absorbancia de las Muestras 1, 2 y 3 se redujo a cero tras una duración de tiempo que exhibía la destrucción química del colorante por H₂O₂. El tiempo de duración para las Muestras 1, 2 y 3 fue diferente para los diferentes colorantes: 19 minutos para la Muestra 1, 15 minutos para la Muestra 2, y 3 minutos para la Muestra 3.

Se preparó una disolución de 4',6-diamidino-2-fenilindona (DAPI) en agua a una concentración de aproximadamente 57 μM. Se mezcló una alícuota de disolución DAPI con una alícuota de la disolución de H₂O₂ para preparar una disolución con una concentración final de aproximadamente 3 por ciento en volumen de H₂O₂ y 10 μg/mL de DAPI (Muestra 4). Se usó como control una disolución de 10 μg/mL de DAPI en agua (sin H₂O₂).

Se monitorizó la reacción de oxidación de DAPI midiendo el espectro de absorbancia de la Muestra 4 en función del tiempo. La Figura 3 muestra los espectros de absorbancia de la Muestra 4 en función de la longitud de onda, tras una duración de 30 minutos y de 140 minutos. El valor de absorbancia de la Muestra 4 no varió mucho incluso tras un periodo de 140 minutos y se mantuvo en el mismo rango que el control, sin exhibir efectos significativos del H₂O₂ sobre el DAPI.

EJEMPLO 2. Oxidación selectiva de colorantes de cianina usando peryodato sódico sin afectar a DAPI

Se preparó una disolución peryodato sódico (NaIO₄) mezclando una disolución 0,2 M de NaIO₄ en 0,1X salino tamponado con fosfato (PBS). Se prepararon tres disoluciones separadas de colorantes de cianina (Cy3, Cy5 y Cy7) en agua a una concentración de aproximadamente 2 μM. Se mezcló una disolución de colorante de cianina con una alícuota de la disolución de NaIO₄ para preparar una disolución con una concentración final de aproximadamente 1 μM de NaIO₄ y de colorante de cianina 1 μM (Muestras 5 (Cy3), 6 (Cy5) y 7 (Cy7)). Como control se usó una disolución de colorante de cianina 1 μM en agua (sin NaIO₄).

La reacción de oxidación del colorante de cianina se monitorizó midiendo el espectro de absorbancia del colorante en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (UV/vis) en función del tiempo. La Figura 4 muestra los espectros de absorción de la Muestra 5 en función de la longitud de onda, tras una duración de 20 minutos, 60 minutos y 210 minutos. El valor de absorbancia disminuyó en función del tiempo en comparación con el control. Se observó una pérdida completa de absorbancia tras 210 minutos para la Muestra 5. La Figura 5 muestra los espectros de absorbancia de la Muestra 6 en función de la longitud de onda, tras una duración de 12 minutos y de 16 minutos. El valor de absorbancia disminuyó en función del tiempo en comparación con el control. Se observó rápidamente una pérdida completa de absorbancia, tras 16 minutos

Se preparó una disolución de 4',6-diamidino-2-fenilindona (DAPI) en agua a una concentración de aproximadamente 57 μM. Se mezcló una alícuota de disolución DAPI con una alícuota de la disolución de NaIO₄ para preparar una disolución con una concentración final de aproximadamente 0,1 M de NaIO₄ y 10 μg/mL de DAPI (Muestra 8). Se usó como control una disolución de 10 μg/mL de DAPI en agua (sin NaIO₄).

Se monitorizó la reacción de DAPI midiendo el espectro de absorbancia de la Muestra 8 en función del tiempo. La Figura 6 muestra los espectros de absorbancia de la Muestra 8 en función de la longitud de onda, tras una duración de 22 minutos, 70 minutos y 210 minutos. El valor de absorbancia de la Muestra 8 no varió mucho incluso tras un periodo de 210 minutos y una cantidad significativa de DAPI permaneció intacta en comparación con el control.

EJEMPLO 3. Destrucción selectiva de colorantes de cianina usando una base de hidróxido sódico sin afectar al DAPI

Se preparó una disolución de NaOH a una concentración de 0,1 M y 1 M. Se prepararon tres disoluciones separadas de colorantes de cianina, Cy3, Cy5 y Cy7 en agua a una concentración de 2 μM. Se mezcló una alícuota de una disolución de colorante de cianina con una alícuota de la disolución de NaOH de dos concentraciones diferentes de NaOH: NaOH 0,1 M (Muestras 9a, 10a y 11a) y NaOH 1 M (Muestras 9b, 10b y 11b). Como control se usó una disolución de colorante de cianina 1 μM en agua (sin NaOH).

La destrucción básica del colorante fue monitorizada midiendo el espectro de absorbancia de las muestras en función del tiempo. La Figura 7 muestra los espectros de absorbancia de las Muestras 9a, 10a y 11a en función de la longitud de onda, tras una duración de menos de 5 minutos. El valor de absorbancia de la Muestra 9A no varió mucho y una cantidad significativa de Cy3 permaneció intacta en comparación con el control. La Muestra 10A mostró un 20 por ciento de descomposición del colorante Cy5, mientras que la Muestra 11A mostró un 70 por ciento de descomposición del colorante Cy7 usando NaOH 0,1 M. La Figura 8 muestra los espectros de absorbancia de las Muestras 9B y 10B en función de la longitud de onda, tras una duración inferior a 5 minutos. La Muestra 9B mostró un 50 por ciento de descomposición del colorante Cy3, mientras que la Muestra 10B mostró un 80 por ciento de descomposición del colorante Cy5 usando NaOH 1 M.

Se preparó una disolución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en agua a una concentración de aproximadamente 57 μM. Se mezcló una alícuota de disolución DAPI con una alícuota de la disolución de NaOH de dos

concentraciones diferentes, NaOH 0,1 M (Muestra 12A) y NaOH 1 M (Muestra 12B). Como control se usó una disolución de colorante DAPI de 10 µg/mL. La destrucción básica de DAPI fue monitorizada midiendo el espectro de absorbancia de las Muestras 12A y 12B en función del tiempo. La Figura 9 muestra los espectros de absorbancia de las Muestras 12A y 12B en función de la longitud de onda. El valor de absorbancia de las muestras no varió mucho y una cantidad significativa de DAPI permaneció intacta en comparación con el control.

5 EJEMPLO 4. Destrucción selectiva de colorantes Cy5 y Cy7 sin afectar a Cy3

Se preparó una disolución al 5 por ciento (p/v) de un nucleófilo mezclando hidrocloruro de tris[2-carboxietil]-fosfina (TCEP·HCl) en tampón de bicarbonato sódico 1 M (pH final 7,7). Se prepararon tres disoluciones separadas de colorantes de cianina, Cy3, Cy5 y Cy7 en agua a una concentración de aproximadamente 2 µM. Se mezcló una disolución de colorante de cianina con una alícuota de la disolución de TCEP·HCl para preparar las Muestras 13 (Cy3), 14 (Cy5) y 15 (Cy7). Como control se usó una disolución de colorante de cianina 1 µM en agua (sin TCEP·HCl).

10 La destrucción del colorante se monitorizó midiendo el espectro de absorbancia de las muestras en función del tiempo. La Figura 10 muestra los espectros de absorbancia de las Muestras 13, 14 y 15 en función de la longitud de onda. El valor de absorbancia de la Muestra 13 no varió mucho en comparación con el control tras una duración de 60 minutos. Las Muestras 14 y 15 mostraron una descomposición significativa de los colorantes Cy5 y Cy7 tras una duración de 0,5 minutos.

15 EJEMPLO 5. Destrucción selectiva de colorante Cy7 sin afectar a Cy3

20 Se preparó una disolución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclando una disolución del 6 % (v/v) de H_2O_2 en 0,8X PBS (pH final 6,6). Se prepararon dos disoluciones de colorantes de cianina, Cy3 y Cy7, en agua a una concentración de aproximadamente 2 µM. Se mezcló una alícuota de una disolución de colorante de cianina con una alícuota de la disolución de H_2O_2 para preparar las Muestras 16 (Cy3) y 17 (Cy7)). Como control se usó una disolución de colorante de cianina 1 µM en agua (sin H_2O_2).

25 La destrucción del colorante se monitorizó midiendo el espectro de absorbancia de las muestras en función del tiempo. La Figura 11 muestra los espectros de absorbancia de las Muestras 16 y 17 en función de la longitud de onda. El valor de absorbancia de la Muestra 16 no varió mucho y una cantidad significativa de Cy3 permaneció intacta en comparación con el control tras una duración de 60 minutos. La Muestra 17 mostró una descomposición significativa del colorante Cy7 tras una duración de 60 minutos.

30 Los siguientes ejemplos, 6-21, ilustran realizaciones de la invención según las cuales se lleva a cabo la obtención de múltiples imágenes de muestras de tejido. La tinción múltiple se obtiene tiñendo, obteniendo la imagen, destruyendo químicamente el fluoróforo, volviendo a teñir, obtener la imagen, y repetir las etapas.

EJEMPLO 6. Preparación de muestras de tejido para tinción

35 Se obtuvieron muestras de tejido humano adulto como portaobjetos de tejidos embebidos en parafina. Las muestras de tejido incluyeron portas de colon (Biochain, T2234090), tejido de mama normal (Biochain, T2234086), cáncer de próstata (Biochain, T2235201-1), adenocarcinoma de colon (Biochain, T2235090-1), microarray de tejido de mama (Imgenex, IMH 367, p61), TMA de mama (Imagenex IMH 367, p32) y próstata normal (Biochain, T2234201). Los portas embebidos en parafina de tejido humano adulto fueron sometidos a un protocolo de inmunohistoquímica para prepararlos para la tinción. El protocolo incluía desparafinación, rehidratación, incubación y lavado. La desparafinación se llevó a cabo lavando los portas con Histochoice (o con tolueno) durante un periodo de 10 minutos y con agitación frecuente. Tras la desparafinación, la muestra de tejido fue rehidratada lavando los portas con disolución de etanol. El lavado se llevó a cabo con tres disoluciones diferentes de etanol con concentraciones decrecientes. Las concentraciones de etanol usadas fueron 90 % en volumen, 70 % en volumen y 50 % en volumen. A continuación el porta se lavó con una disolución salina de tampón de fosfato (PBS, pH 7,4). La permeabilización de membrana del tejido se llevó a cabo lavando el porta con una disolución al 0,1 por ciento en peso de Triton TX-100. Se usó tampón de citrato pH 6,0 (Vector Unmasking Solution) para la extracción del antígeno. Los portas se expusieron al tampón en un autoclave a presión durante un periodo de 15 minutos seguido de enfriamiento a temperatura ambiente durante 20 minutos. Despues se bloqueó el porta contra unión no específica lavando con PBS y 900 µL de albúmina de suero bovino (BSA) al 3 por ciento en volumen durante 45 minutos a 37°C. Para la tinción con anticuerpos secundarios (opcional), el porta también se bloqueó con 100 µL de suero procedente de especies de hospedante de anticuerpo secundario.

40 EJEMPLO 7. Conjugación de anticuerpos con un colorante

45 Se prepararon anticuerpos conjugados a colorante según el siguiente procedimiento. Los anticuerpos usados para conjugar y teñir incluyeron antígeno nuclear de célula anti-proliferante (SmA), clon 1A4 (Sigma, A2547); anti-beta catenina de conejo (Sigma, C 2206); anti-pan citoqueratina de ratón, clon PCK-26 (Sigma, C1801), anti-estrógeno receptor alfa de ratón, clon 1D5 (DAKO, M 7047); clon 15B8 de anticuerpo de beta catenina (Sigma, C 7738); anti-vimentina de cabra (Sigma, V4630); clon AR441 de receptor de andrógeno cíclico (DAKO, M3562); Factor VII Von

Willebrand, queratina 5, queratina 8/18, e-caderina, Her2/neu, receptor de Estrógeno, p53, receptor de progesterona, beta catenina; anti-ratón de burro (Jackson ImmunoResearch, 715-166-150); y anti-conejo de burro (Jackson ImmunoResearch, 711-166-152).

- 5 Se mojó una columna de giro micrométrica YM-10 con 250 mL de PBS y la columna se giró durante 15 minutos. Se pipetearon 500 mL del anticuerpo (200 µg/mL) en la columna húmeda. La columna fue girada durante 30 minutos a 11000 rpm a 4°C. A continuación se transfirió el concentrado de anticuerpo/proteína en un nuevo tubo y se giró durante 30 segundos para eliminar la proteína concentrada. Entonces se mezcló una disolución tamponante acoplada con la disolución de anticuerpo concentrada. La disolución tamponante acoplada incluía carbonato sódico 1 M (pH entre 8 y 9) y se usaron 5 µL del tampón por cada 100 µL de la disolución de anticuerpo. La disolución de anticuerpo y tampón se añadió a 0,01-0,1 miligramos del colorante de cianina. El colorante fue reconstituido en DMSO hasta una concentración de 10-20 mg/mL antes de incubar con el anticuerpo. La disolución resultante fue mezclada intensamente pipeteando y se eliminaron las burbujas formadas haciendo girar el tubo. La disolución se cubrió con una lámina y se incubó a temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 30-45 minutos. Tras la incubación la disolución se añadió a una columna de giro YM-10 y se giró durante 30 minutos a 4°C a 11000 rpm. La disolución se lavó con PBS y se giró para eliminar cualquier colorante o anticuerpo no conjugado. La disolución de anticuerpo conjugado a colorante fue diluido entonces con un 50 por ciento de glicerol y almacenado en un congelador a -20°C.

EJEMPLO 8. Tinción y obtención de imágenes de tejido con colorantes

- 20 Un porta preparado en el Ejemplo 6 fue incubado con un anticuerpo conjugado a colorante preparado en el Ejemplo 7. La incubación fue llevada a cabo en BSA al 3 por ciento durante 45 minutos a 37°C. Tras la incubación, el porta fue sometido a una serie intensiva de lavados con PBS. Cuando se usaron los anticuerpos secundarios, el porta fue incubado con un anticuerpo secundario en BSA durante 45 minutos a 37°C. Tras la incubación, el porta fue sometido a una serie intensiva de lavados con PBS. Se contratiñó un porta teñido con anticuerpo primario o anticuerpo secundario con el tinte morfológico, DAPI, y se cubrió con un cubreobjetos.
- 25 Se obtuvieron imágenes de un porta con cubreobjetos usando una cámara. La cámara usada fue una cámara de alta resolución monocromática Leica DFC 350FX montada en un microscopio fluorescente Leica DMRA2. Los aumentos usados fueron 20x a menos que se indique lo contrario. Tras la adquisición de imágenes, se retiró el cubreobjetos y el porta fue lavado con PBS para prepararlo para la destrucción de señal.

EJEMPLO 9. Destrucción de colorante, tinción y obtención de imágenes

- 30 Se usó una disolución de NaOH y una disolución de H₂O₂ para la destrucción de señal. Se preparó una disolución de NaOH usando 500 µL de NaOH al 50 por ciento en volumen y 49,5 mL de PBS. El pH final de la disolución de NaOH fue de aproximadamente 11,9-12,5. Se preparó una disolución de H₂O₂ mezclando 10 mL de carbonato sódico 0,5 M (pH 10), 5 mL de H₂O₂ al 30 por ciento en volumen y 35 mL de agua. Se colocó una porta en la disolución de NaOH o de H₂O₂ durante 15 minutos con agitación suave. Tras 15 minutos, el porta fue lavado de nuevo con PBS, se cubrió con un cubreobjetos y se obtuvieron imágenes de nuevo (opcional) para comprobar la eficacia de la destrucción de colorante o se retiñó y se obtuvieron imágenes. Las etapas de volver a teñir y de volver a obtener imágenes se llevaron a cabo usando el proceso descrito en el Ejemplo 8. Tras obtener las imágenes, se sometió un porta a ciclos de destrucción de señal, tinción y obtención de imágenes, y el proceso se repitió un número múltiple de veces. Se obtuvieron muestras de tejido usando 1-9 anticuerpos diferentes. Tras obtener las imágenes con la serie de cianina, el porta fue opcionalmente teñido y se obtuvieron imágenes con los tintes morfológicos H&E.

EJEMPLO 10. Tinción de canal sencillo y obtención de imágenes de un tejido de colon normal seguido de destrucción de señal usando NaOH

- 45 Se tiñó un porta de colon normal con un clon pc 10 de anticuerpo primario de ratón anti-antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA), y se detectó con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3 para formar la Muestra 18A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 18A y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 18B, de la cual se volvió a obtener imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Figura 12 muestra micrografías (con un aumento 10x) de la Muestra 18A (antes de la destrucción del colorante) y de la Muestra 18B (después de la destrucción del colorante). Tras el tratamiento con NaOH quedó poca o ninguna señal de Cy3.

EJEMPLO 11. Tinción de canal sencillo y obtención de imágenes de un tejido de colon normal seguido de destrucción de señal usando NaOH

- 55 Se tiñó un porta de colon normal con un clon 1A4 de anticuerpo primario de ratón anti-actina alfa de músculo liso (SmA), y se detectó con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3 para formar la Muestra 19A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 19A y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 19B, de la cual se volvió a tomar imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Figura 13

muestra micrografías (con un aumento 10x) de la Muestra 19A (antes de la destrucción de colorante) y de la Muestra 19B (después de la destrucción de colorante). Tras el tratamiento con NaOH quedó una pequeña cantidad de señal de Cy3.

EJEMPLO 12: Tinción de dos canales y obtención de imágenes de un tejido de mama normal usando NaOH

- 5 Se tiñó un tejido de mama normal con un anticuerpo SmA primario, se detectó con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3, y se contra-tiñó con DAPI para formar la Muestra 20A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 20A y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 20B, de la cual se volvieron a tomar imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Muestra 20B se volvió a teñir con un anticuerpo primario de conejo anti-beta catenina, y se detectó con un anti-conejo conjugado a Cy3 para formar la Muestra 20C. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 20C y a continuación se contra-tiñó con H&E para formar la Muestra 20D y se volvieron a obtener imágenes.

10 La Figura 14 muestra micrografías de la Muestra 20A (antes de la destrucción de colorante) y de la Muestra 20B (después de la destrucción de colorante). Tras el tratamiento con NaOH quedó poca o ninguna señal de Cy3 y sólo 15 se observó DAPI. La micrografía de la Muestra 20C mostró que la obtención de imágenes en el mismo canal de Cy3 era posible tiñendo con un anticuerpo diferente. La información morfológica sobre el tejido se obtuvo mediante tinciones adicionales con H&E (Muestra 20D).

EJEMPLO 13. Tinción de dos canales y obtención de imágenes de un tejido de cáncer de próstata usando NaOH

- 20 Se tiñó un tejido de cáncer de próstata con un clon PCK-26 de anticuerpo primario de ratón anti-pan citoqueratina, y se detectó con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3, para formar la Muestra 21A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 21A y a continuación se contra-tiñó con DAPI para formar la Muestra 21B. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 21B y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 21C, de la cual se volvieron a obtener imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Muestra 21C se volvió a teñir con un anticuerpo primario SmA, y se detectó con un anti-conejo conjugado a Cy3 para formar la Muestra 21D y 25 obtener imágenes de nuevo.

La Figura 15 muestra micrografías de la Muestra 21A (canal Cye) y de la Muestra 21B (canal DAPI) antes de la destrucción de colorante y de la Muestra 21C (canal Cye) después de la destrucción de colorante. Tras el tratamiento con NaOH quedó poca o ninguna señal de Cy3 (21C) y solo se observó DAPI (no mostrado). La 30 micrografía de la Muestra 21D mostró que la obtención de imágenes en el mismo canal Cy3 era posible tiñendo con un anticuerpo diferente.

EJEMPLO 14. Tinción de dos canales y obtención de imágenes de un adenocarcinoma de colon usando NaOH

- 35 Se tiñó un porta de adenocarcinoma de colon con un clon PCK-26 de anticuerpo primario de ratón anti-pan citoqueratina, y se detectó con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3, para formar la Muestra 22A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 22A y a continuación se contra-tiñó con DAPI para formar la Muestra 22B. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 22B y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 22C, de la cual se volvieron a obtener imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevan a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Muestra 22C se volvió a teñir con un anticuerpo primario SmA, y se detectó con un anti-conejo conjugado a Cy3 para formar la 40 Muestra 22D y obtener imágenes de nuevo.

La Figura 16 muestra micrografías de la Muestra 22A (canal Cye) y de la Muestra 22B (canal DAPI) antes de la destrucción de colorante y de la Muestra 22C después de la destrucción de colorante. Tras el tratamiento con NaOH quedó poca o ninguna señal de Cy3 (22D) y solo se observó DAPI (no mostrado). La micrografía de la Muestra 22D 45 mostró que la obtención de imágenes en el mismo canal Cy3 era posible tiñendo con un anticuerpo diferente. La información nuclear sobre el tejido se obtuvo mediante tinción con DAPI (Muestra 22B).

EJEMPLO 15. Tinción de dos canales y obtención de un microarray de tejido de mama con medición de línea base usando NaOH

- 50 Se obtuvieron imágenes de un microarray de tejido de mama (Muestra 23A) en el canal DAPI y Cy3 para medir la autofluorescencia del tejido. A continuación la Muestra 23A se tiñó con DAPI para formar la Muestra 23B, se obtuvieron imágenes y a continuación se trató con NaOH para formar la Muestra 23C, y se volvieron a obtener imágenes. La Muestra 23A también fue teñida con un clon 1D5 de anticuerpo primario de ratón anti-receptor alfa de estrógeno, y se detectó con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3, para formar la Muestra 23D. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 23D y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 23E, de la cual se volvieron a tomar imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevan a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9.

La Figura 17 muestra micrografías de las Muestras 23A-E. Las micrografías de las Muestras 23C y 23E se compararon con la autofluorescencia (línea base) observada para la Muestra 23A. Ambas muestras presentaron reducción de señal. La muestra teñida con DAPI mostró una reducción de señal posiblemente debida a la destrucción de ácidos nucleicos a los que se une DAPI.

5 EJEMPLO 16. Tinción de tres canales y obtención de imágenes de TMA de mama usando NaOH

Se tiñó una muestra de mama con un clon PCK-26 de anticuerpo primario de ratón anti-pan citoqueratina, se detectó visualizada con un anti-ratón de burro conjugado a Cy3 para formar la Muestra 24A, y se contratiñó con DAPI (no mostrado) y se obtuvieron imágenes. La Muestra 24A fue tratada entonces con una disolución de NaOH para eliminar la señal de Cy3 (no mostrado), mientras que se mantenía la señal de DAPI para formar la Muestra 24B y se obtuvieron imágenes como se muestra en la Figura 18 en la Muestra 24B. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Muestra 24B se retinó con un anticuerpo de beta catenina conjugado directamente a Cy3 para formar la Muestra 24C y se obtuvieron imágenes de nuevo. Se volvió a tratar la muestra con NaOH y se marcó con anticuerpo SmA conjugado directamente a Cy3 para formar la Muestra 24D y se obtuvieron imágenes de nuevo. Las imágenes obtenidas se registraron, se seudocolorearon y se superpusieron (Muestra 24E) para proporcionar información para la expresión de antígeno. La Muestra 24D se tiñó adicionalmente con H&E para formar la Muestra 24F.

20 La Figura 18 muestra micrografías de la Muestra 24A (canal Cy3 antes de la destrucción de colorante) y de la Muestra 24B (canal DAPI después de la destrucción de colorante). Tras el tratamiento con NaOH quedó poca o ninguna señal de Cy3 y solo se observó DAPI. Las micrografías de las Muestras 24C y 24D mostraron que la obtención de imágenes en el mismo canal de Cy3 era posible tiñendo con anticuerpos diferentes. La información morfológica sobre el tejido se obtuvo tiñendo con H&E (Muestra 24F).

25 EJEMPLO 17. Tinción de doce canales y obtención de imágenes de próstata normal usando NaOH

Se tomaron imágenes antes de la tinción para tener la línea base de la autofluorescencia procedente de cada canal. 30 Se tiñó un porta de próstata normal con un cóctel de dos anticuerpos primarios: anti-vimentina de cabra y anti-pan citoqueratina de ratón. Los dos anticuerpos primarios fueron detectados con un segundo cóctel de anticuerpos secundarios: anti-cabra de burro conjugado a Cy3 y anti-ratón de burro conjugado a Cy5 para formar la Muestra 25A Cy3 y Cy5, respectivamente. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 25A y a continuación se trató con una disolución de NaOH. A continuación el tejido fue teñido secuencialmente con dos anticuerpos primarios: anti-alfa catenina de conejo, que fue detectado posteriormente con anticuerpo secundario conjugado a Cy3, y a continuación con anti-receptor de andrógeno conjugado a Cy5, para formar las Muestras 25B (25B-Cy3 y 25B-Cy5, respectivamente). Tras la obtención de imágenes, la muestra fue tratada con una disolución de NaOH seguido de las etapas de tinción-obtención de imágenes-tratamiento con NaOH usando siete anticuerpos conjugados directamente a Cy (Muestras 25C-25I). Los anticuerpos usados fueron: actina alfa de músculo liso, beta catenina, pan caderina, Factor VII de Von Willebrand, queratina 5, queratina 8/18 y e-caderina. Cada etapa de tinción incluyó la contra-tinción con DAPI (Muestra 25J).

40 La Figura 19 muestra micrografías de la Muestra 25A (canales de Cy3 y de Cy5), la Muestra 25B (canales de Cy3 y de Cy5) y las Muestras 25C-25J. La Figura 19 muestra que la obtención de imágenes múltiples en el mismo canal de Cy3 era posible tiñendo con diferentes anticuerpos. La obtención de imágenes múltiples de 12 canales fue posible siendo 9 de los canales de Cy3.

45 EJEMPLO 18. Tinción de cuatro canales y obtención de imágenes de próstata normal usando H₂O₂

Se tomaron imágenes antes de la tinción para establecer la línea base de la autofluorescencia procedente de cada canal. Se tiñó un porta de próstata normal con un anti-pan caderina conjugado directamente a Cy3 para formar la Muestra 26A. Se obtuvieron imágenes del porta y se trató con H₂O₂ (Muestra 26B), se retinó con anti-vimentina conjugada a Cy3 (Muestra 26C), se trató con H₂O₂ (Muestra 26D), se retinó con anti-pan citoqueratina conjugada con Cy3 (Muestra 26E), se trató con H₂O₂ (Muestra 26F), se retinó con anti-SmA conjugado a Cy3 (Muestra 26G) y se trató con H₂O₂ (Muestra 26H).

50 La Figura 20 muestra micrografías de las Muestras 26A-G. La Figura 20 muestra que la obtención de imágenes múltiples en el mismo canal de Cy3 era posible tiñendo con diferentes anticuerpos y destruyendo la señal usando H₂O₂.

55 EJEMPLO 19. Tinte residual tras tinción para proteínas abundantes usando NaOH

Se obtuvieron imágenes de próstata normal (Muestra 27A) en el canal Cy3 para medir la autofluorescencia del tejido. A continuación la Muestra 27A fue teñida con anti-SmA conjugado a Cy3 para formar la Muestra 27B, se obtuvieron imágenes y a continuación se trató con NaOH para formar la Muestra 27C, y se volvieron a tomar imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y de destrucción de colorantes se llevaron a cabo según

los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. La Figura 21 muestra las micrografías de las Muestras 27A-C. El tinte residual se observó después del tratamiento con NaOH, mostrado en la Muestra 27C.

Los valores de tinte residual también fueron monitorizados durante la obtención de imágenes múltiples de doce canales descrita en el Ejemplo 17. Usando Gimp 2.2, se recogieron las intensidades de pixel promedio para cada fondo y cada imagen tratada con NaOH y se tabularon. La Figura 22 muestra una representación de intensidad de pixel promedio del fondo para cada ciclo de la obtención de imágenes, así como una pequeña imagen de la apariencia del fondo antes de la tinción. Se observó un gran pico de intensidad de tinte residual en el ciclo 4, ya que el SmA, una proteína expresada abundantemente, fue teñido en el ciclo 3.

EJEMPLO 20. Tinte residual tras tinción para proteínas abundantes usando tratamiento con NaOH y con H₂O₂

Se tiñeron dos portas de próstata con SmA conjugado directamente a Cy3 (Muestras 28A y 28B, paneles de la izquierda). Ambos portas recibieron etapas de pretratamiento, concentración y recuperación de antígeno idénticas, y la única diferencia fue el método de destrucción de señal: siendo el método uno con NaOH (Muestra 28C), y el otro con H₂O₂ (Muestra 28D). Se tiñeron otros dos portas de próstata con pan caderina conjugada directamente a Cy3 (Muestras 29A y 29B, paneles de la derecha). Ambos portas recibieron etapas de pretratamiento, concentración y recuperación de antígenos idénticas, y la única diferencia fue el método de destrucción de señal, siendo el método uno con NaOH (Muestra 29C) y el otro con H₂O₂ (Muestra 29D).

La Figura 23 muestra micrografías cabeza-a-cabeza de tinción y eliminación de señal de SmA y pan caderina. El H₂O₂ mostró una eliminación de colorante más eficiente para SmA y para pan caderina en comparación con el NaOH.

EJEMPLO 21. Tinte residual tras tinción de múltiples ciclos para proteínas abundantes usando tratamiento con NaOH y H₂O₂

Se tiñeron dos portas de próstata con pan caderina conjugada directamente a Cy3 (Muestras 30A y 30B). Ambos portas recibieron etapas de pretratamiento idénticas, que incluyen la eliminación de antígeno, y la única diferencia fue el método de destrucción de señal; siendo un método con NaOH y el otro con H₂O₂. Los portas fueron sometidos a 9 ciclos repetidos de tinción-destrucción de señal antes de ser teñidos con pan citoqueratina conjugada a Cy3 para producir la Muestra 30C y la Muestra 30D de la Figura 24.

La Figura 24 compara la tinción del primer ciclo de tinción con pan caderina con el 9º ciclo de pan citoqueratina usando NaOH o H₂O₂ para destruir la señal tras cada tinción. La Figura 25 compara el fondo de después de la eliminación de colorante (Muestras 30E y 30F) del primer ciclo y después de 9 ciclos de tratamiento con NaOH o H₂O₂ (Muestras 30C y 30D). El H₂O₂ (Muestra D, Figura 25) mostró una eliminación de colorante más eficiente para pan queratina en comparación con el NaOH (Muestra 30C, Figura 25) tras la 9ª etapa. La Figura 26 es una representación de las intensidades de pixel promedio para el fondo de cada ciclo para los portas de NaOH y H₂O₂. Tal como muestra la representación de la Figura 26, el fondo para el porta de H₂O₂ fue significativamente menor para cada ciclo tras la línea base inicial.

EJEMPLO 22. Estabilidad de anticuerpo frente a agentes químicos

Se tiñó un porta de tejido de colon con un anticuerpo primario de conejo anti-beta catenina y se detectó con un anticuerpo secundario anti-conejo de burro para formar la Muestra 31A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 31A y a continuación se trató con una disolución de NaOH para producir la Muestra 31B, de la cual se volvieron a obtener imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la presente memoria en los Ejemplos 8 y 9. Se volvió a teñir la Muestra 31B con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Cy3 para formar la Muestra 31C, y se volvieron a obtener imágenes. La Figura 27 muestra micrografías de las Muestras 31A-C. La Figura 27 muestra que el anticuerpo primario permanece unido a la muestra tras el tratamiento con NaOH.

Se tiñó un porta de tejido de colon con un anticuerpo primario de ratón anti-PCNA y se detectó con un anticuerpo secundario anti-ratón de burro conjugado a Cy3 para formar la Muestra 32A. Se obtuvieron imágenes de la Muestra 32A y a continuación se trató con una disolución de NaOH para formar la Muestra 32C, de la cual se volvieron a obtener imágenes. Las etapas de tinción, obtención de imágenes y destrucción de colorante se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en los Ejemplos 8 y 9. La Muestra 32B se volvió a teñir con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Cy3 para formar la Muestra 32C, y se volvieron a obtener imágenes. La Figura 28 muestra que el anticuerpo primario todavía sigue unido a la muestra tras el tratamiento con NaOH.

Los siguientes ejemplos, 23-26, ilustran realizaciones de la invención según las cuales se lleva a cabo la obtención de imágenes múltiples de muestras de tejido usando conjugados enzima-sustrato-fluoróforo. La tinción múltiple se obtiene tiñendo, obteniendo imágenes, destruyendo químicamente el fluoróforo, volviendo a teñir, obteniendo imágenes y repitiendo las etapas.

EJEMPLO 23. Conjugación de anticuerpos con una enzima

Los anticuerpos usados fueron anti-β-catenina de conejo directamente conjugados a enzima de peroxidasa de rábano (HRP), anti-queratina 5 de ratón y anti-ratón de burro conjugado a anticuerpo HRP. El sustrato para la enzima HRP fue sustrato de tiramida conjugado a Cy5.

EJEMPLO 24. Tinción y obtención de imágenes de tejido con HRP

- 5 Un porta preparado como en el Ejemplo 26 fue incubado con anticuerpo anti-β-catenina conjugado a HRP preparado en el Ejemplo 23. La incubación de anticuerpo primario se llevó a cabo en BSA al 3 por ciento durante 45 minutos a 37°C. Tras la incubación, el porta fue sometido a una serie extensiva de lavados de PBS. El porta teñido con HRP se incubó con sustrato de tiramida conjugado a Cy5 en PBS/0,1% de Triton X-100 durante 10 minutos. Tras la incubación, el porta fue sometido a una serie extensiva de lavados con PBS. A continuación se obtuvieron imágenes de sustrato de tiramida de Cy5 con un Zeiss Axio Imager. El aumento usado fue 20x a menos que se indique lo contrario. La Figura 29 muestra una micrografía de la Muestra 33 tras tinción para β-catenina. Tras la adquisición de imágenes, el porta se lavó con PBS para prepararla para la destrucción de señal.
- 10

EJEMPLO 25. Modificación de señal, tinción y obtención de imágenes

- 15 Para la destrucción de señal se usó la disolución de H₂O₂. Se preparó una disolución de H₂O₂ mezclando 10 mL de carbonato sódico 0,5 M (pH 10), 5 mL de H₂O₂ al 30 por ciento en volumen y 35 mL de agua. Se colocó un porta en la disolución de H₂O₂ durante 15 minutos con agitación suave. Tras 15 minutos, el porta se lavó de nuevo con PBS (Muestra 34), se cubrió con un cubreobjetos y se volvieron a obtener imágenes para comprobar la eficacia de la destrucción de colorante. La etapa de re-obtención de imágenes se llevó a cabo usando el proceso descrito anteriormente en el Ejemplo 24. La Figura 29 muestra una micrografía de la Muestra 34 tras la modificación de señal, que muestra una eliminación sustancial de señal tras la destrucción de señal. A continuación se re-incubó la Muestra 34 con tiramida-Cy5 para determinar la actividad residual de la enzima HRP y se obtuvieron imágenes como se ha indicado antes. La Figura 29 muestra una micrografía de la Muestra 35 y sin nada de Cy5, y la enzima HRP se desactiva químicamente mediante disolución de H₂O₂, de tal modo que no se produzca más reacción enzima-sustrato.
- 20

25 EJEMPLO 26. Re-tinción y re-obtención de imágenes de tejido con colorante

- El porta (Muestra 35) procedente del Ejemplo 25 fue incubado con anticuerpo de ratón anti-queratina 5. La incubación se llevó a cabo en BSA al 3 por ciento durante 45 minutos a 37°C. Tras la incubación, el porta se sometió a una serie extensiva de lavados con PBS. A continuación se detectó el anticuerpo de queratina 5 con un anticuerpo anti-ratón de burro conjugado a HRP en BSA durante 45 minutos a 37°C. El porta teñido con HRP se incubó con sustrato de tiramida conjugado a Cy5 como en el Ejemplo 25. Tras la incubación, el porta fue sometido a una serie extensiva de lavados de PBS. El porta re-teñido con Cy5 (Muestra 36) fue contrateñido con el tinte morfológico, DAPI, y se cubrió con un cubreobjetos. El porta cubierto con el cubreobjetos se volvió a someter a obtención de imágenes usando el proceso descrito anteriormente en el Ejemplo 24. La Figura 29 muestra una micrografía de la Muestra 36 tras tinción para proteína k5.
- 30

- 35 Los siguientes Ejemplos, 27-31, ilustran realizaciones de la invención según las cuales se lleva a cabo una obtención de imágenes múltiples de dot blots. La tinción múltiple se obtiene mediante tinción, obtención de imágenes, destrucción química del fluoróforo, re-tinción, obtención de imágenes, y repitiendo las etapas.

EJEMPLO 27. Inmovilización de dianas en un blot

- 40 Las proteínas diana, péptido β-catenina (Sigma 26561-1 lote R1078-005) y antígeno CEA, fueron punteadas en una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a tres concentraciones diferentes: 1 microgramo, 100 nanogramos y 100 nanogramos. El blot fue bloqueado usando un 5% de leche, en 1xTBS-T (tampón de salino tamponado con Tris y Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente.

EJEMPLO 28. Tinción de β-catenina y obtención de imágenes de blots

- 45 Un blot preparado en el Ejemplo 27 fue incubado con un anticuerpo primario, anticuerpo de conejo anti-β-catenina (Sigma, C7738). La incubación se llevó a cabo con una dilución de 1:200 de anticuerpo usando leche al 1 por ciento en 1xTBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Tras la incubación, el blot fue sometido a una serie extensiva de lavados. A continuación el blot fue incubado con un anticuerpo secundario conjugado a colorante anti-conejo de burro Cy5 (preparado como en el Ejemplo 6) a una dilución 1:500 usando un 1 por ciento de leche en 1xTBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Tras la incubación, el blot (Muestra 37) fue lavado con 1xTBS-T. Las imágenes del blot (Muestra 37) fueron capturadas en un Typhoon Imager (GE Healthcare) usando el canal de Cy5 y un voltaje fijado a 450 V. La Figura 30 muestra una imagen de la Muestra 37. Tal como se muestra en la Figura 30, se observaron puntos de intensidades de señal variables para las tres concentraciones diferentes de proteína diana de β-catenina.
- 50

EJEMPLO 29. Destrucción de colorante, y obtención de imágenes

Se usó disolución de H₂O₂ para la destrucción de señal. Se preparó una disolución de H₂O₂ mezclando 10 mL de carbonato sódico 0,5 M (pH 10), 5 mL de H₂O₂ al 30 por ciento en volumen y 35 mL de agua. El blot preparado en el Ejemplo 28 fue colocado en la disolución de H₂O₂ durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Tras 15 minutos, el blot fue lavado tres veces usando 1 x TBS-T durante 5 minutos para formar la Muestra 38. El blot (Muestra 38) fue sometido de nuevo a obtención de imágenes y las imágenes del blot fueron capturadas en un Typhoon Imager (GE Healthcare) usando el canal de Cy5 y un voltaje fijado a 450 V. La Figura 30 muestra una imagen de la Muestra 38. Tal como se muestra en la Figura 30, no se observaron puntos tras la etapa de destrucción de colorante que indicando una destrucción sustancialmente completa de Cy5.

EJEMPLO 30. Tinción de antígeno CEA y obtención de imágenes del blot

10 El blot del Ejemplo 29 se incubó con un anticuerpo primario anti-CEA de ratón. La incubación se llevó a cabo a una dilución de 1:200 usando leche al 1 por ciento en 1xTBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Tras la incubación, el blot fue sometido a una serie extensiva de lavados. Después el blot fue incubado con un anticuerpo secundario conjugado a colorante de anti-ratón Cy5 de burro (preparado en el Ejemplo 6) a una dilución de 1:500 usando leche al 1 por ciento en 1xTBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Tras la incubación, el blot (Muestra 39) fue sometido a una serie extensiva de lavados. Se capturaron imágenes del blot (Muestra 39) en un Typhoon usando el canal de Cy5 y un voltaje fijado a 450 V. La Figura 30 muestra una imagen de la Muestra 39. Tal como se muestra en la Figura 30, se observaron puntos de intensidades de señal variable para las tres concentraciones diferentes de antígeno de CEA. El Ejemplo ilustra que se pueden detectar dos dianas diferentes usando un generador de señal individual.

20 EJEMPLO 31. Cuantificación de la señal tras cada etapa

Las Muestras 37, 38, 39 y 40 se analizaron adicionalmente para cuantificar las señales en los tres puntos detectados para cada péptido (un ejemplo representativo de las regiones elegidas para el análisis se muestra en la Figura 30 con regiones destacadas con un cuadrado numerado 4-9 en la Figura 30). Las señales de cada muestra de los puntos de péptido fueron normalizadas respecto a la media de los fondos de tres puntos 1, 2 y 3, tal como se muestra en la Figura 30. La Figura 31 es una representación de las intensidades de señal relativas de los puntos correspondientes a las Muestras 37, 38, 39 y 40, que muestran que las intensidades de señal se reducen 10 veces tras la etapa de destrucción de colorante (Muestra 38).

Los siguientes ejemplos, 32-34, ilustran realizaciones de la invención según las cuales el fluoróforo es destruido por un agente oxidante sin extraer significativamente la sonda (anticuerpo primario) del soporte sólido.

30 EJEMPLO 32. Preparación de cultivos celulares

Se obtuvo Alexa 488, BODIPY FL C5 (D6184), hidroxicumarina (H1193) de Invitrogen (Carlsbad, CA); ATTO 635 y ATTO 655 fueron obtenidos de ATTO-TEC (Siegen, Alemania); DY-734-NHS fue obtenido de Dyomics (Jena, Alemania); Fluoresceína cadaverina fue obtenida de Biotium Inc. (Hayward, CA). IgG-Cy3 anti-ratón de cabra e IgG-Cy5 anti-ratón de cabra fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA). DPBS y PBS fueron obtenidos de Invitrogen; PFA al 16% fue obtenido de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA). El suero de cabra fue obtenido de Vector Laboratories (Burlingame, CA). Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO).

40 Las células LS174T (ATCC, CL-188) que expresan antígeno carcinoembriónico (CEA) fueron cultivadas en EMEM (ATCC, nº cat. 30-2003) suplementado con un 10% de FBS. Las células fueron incubadas a 37°C y con un 5% de CO₂. Al obtener un 90% de confluencia, fueron subcultivadas o sembradas en placas de 96 pocillos y se continuó con su crecimiento durante otros dos días adicionales.

45 Las células confluentes en placas de 96 pocillos fueron enjuagadas con DPBS (con calcio) dos veces, y a continuación se añadió un 2% de PFA (concentración final) para fijar las células durante 10 minutos, seguido de una permeabilización usando Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos. A continuación, las células fueron incubadas en un tampón de bloqueo (suero de cabra al 10% + BSA al 3%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Inmediatamente tras la etapa de bloqueo se añadió anti-CEA de ratón (concentración final de 10 µg/mL en BSA al 3%) y se incubó durante una noche.

EJEMPLO 33. Puesta en contacto del anticuerpo primario con agentes oxidantes

50 Para investigar el efecto de los agentes oxidantes sobre el anticuerpo primario, se añadieron varias disoluciones de agente oxidante (tal como se describe en la Tabla 1) a la mitad de la placa durante 30 minutos, y a continuación se enjuagó intensamente con PBS. Los reactivos oxidantes empleados fueron peróxido de hidrógeno, bromo acuoso, permanganato potásico, dicromato potásico, disolución de I₂/KI, peróxido de t-butilo e hidrogenoperóxido de t-butilo. La otra mitad de la placa se usó como control con incubaciones paralelas y lavados en PBS y sin aplicar disoluciones de agentes oxidantes. Para evaluar el efecto de una base sobre la sonda, también se pusieron en contacto con la placa diferentes bases tales como NaOH, DBU (diazobicílico-undeceno) acuoso y butilamina acuosa. Se aplicó PBS como agente de control.

5 Todos los pocillos fueron incubados con 50 µL/pocillo de IgG-Cy3 anti-ratón de cabra o IgG-Cy5 anti-ratón de cabra (dilución 1:200). Se escaneó la placa completa usando un espectrofotómetro Gemini M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se escanearon un total de cinco puntos de cada pocillo y a continuación se promediaron para conseguir una lectura para cada pocillo. Para el colorante Cy3, se leyó la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 544 nm, de emisión de 580 nm y un corte a 570 nm. Para el Cy5, excitación de 640 nm, emisión de 675 nm y corte de 665 nm.

10 La Tabla 1 muestra los valores de fluorescencia medidos tras la aplicación del agente oxidante al anticuerpo primario tal como se muestra en las columnas 2 (Cy3) y 4 (Cy5). Los valores de la Tabla son de intensidad de fluorescencia normalizada, es decir, una relación de la intensidad de fluorescencia medida para los pocillos que entran en contacto con el agente oxidante con respecto a la intensidad de fluorescencia medida en los pocillos de control (sin aplicación de disolución oxidante) multiplicado por 100. Por lo tanto, un valor próximo a 100% significa que la disolución oxidante no tiene efecto sobre el anticuerpo primario en comparación con su control (sin aplicación de disolución oxidante).

15 La Tabla 1 muestra que algún agente oxidante (p.ej., H₂O₂) casi no presenta efecto sobre el anticuerpo primario ($P>0,1$), mientras que en otros casos, la concentración del agente oxidante puede variar (p.ej., para I₂/KI) de tal modo que el anticuerpo primario no se ve afectado sustancialmente. Las bases empleadas (NaOH y butil amina) exhibieron una destrucción sustancial de los anticuerpos primarios a lo largo de una variedad de concentraciones empleadas. El PBS no mostró efecto sobre el anticuerpo primario.

EJEMPLO 34. Puesta en contacto de fluoróforos con agentes oxidantes

20 Para evaluar el efecto del agente oxidante sobre las células marcadas con fluoróforo, se añadieron varias disoluciones de agente oxidante (tal como se describe en la Tabla 1) a diferentes filas (parte de control de la placa) durante 30 minutos. Se volvió a leer la placa tras un lavado intenso, como se ha descrito en el Ejemplo 33.

25 La Tabla 1 muestra que algún agente oxidante (p.ej., H₂O₂) no presentó casi efecto sobre el anticuerpo primario pero dio como resultado una pérdida sustancial de propiedades de fluorescencia para el colorante de cianina. Los datos presentados en la Tabla 1 muestran adicionalmente que la destrucción de señal fluorescente funcionó mejor a pH elevado para las disoluciones de H₂O₂. Tal como se describe en la presente memoria, en otros casos, la concentración del agente oxidante puede variarse (p.ej., para I₂/KI) de tal modo que el anticuerpo primario no se ve afectado sustancialmente pero el colorante de cianina sí. Las bases empleadas (NaOH y butil amina) exhibieron una pérdida sustancial de señal para el colorante de cianina pero esto puede deberse a la destrucción (o lixiviación) de los anticuerpos primarios por acción de la base. El PBS no mostró efecto sobre el anticuerpo primario y el colorante de cianina.

30 Tabla 1. Intensidad de fluorescencia normalizada medida tras poner en contacto la placa con diferentes agentes oxidantes.

Disolución oxidante	Sobre Cy3 primario (hasta 6 conjuntos)	Oxidación de Cy3 (hasta 4 conjuntos)	Sobre Cy primario (2 conjuntos)	Oxidación de Cy (1 conjunto)
Reactivos oxidantes				
3% H ₂ O ₂ , pH10	105%	11%	124%	0%
3% H ₂ O ₂ , pH5	99%	73%		
Bromo acuoso	100%	14%		
4% permanganato potásico	0%	0%	1%	0%
1% permanganato potásico	80%	4%		
4% dicromato sódico·2H ₂ O	111%	69%	88%	25%
4% dicromato sódico·2H ₂ O en ácido acético	213%	10%		
5% I ₂ , 10% KI	9%	0%	7%	4%
0,5% I ₂ , 1% KI	82%	10%		
0,05% I ₂ , 0,1% KI	101%	72%		
3,5% peróxido de <i>t</i> -butilo en acetonitrilo	45%	103%	49%	84%
3,5% de hidroperóxido de <i>t</i> -butilo	166%	65%	107%	44%
Bases				
NaOH 0,35 N	17%	11%	14%	

Disolución oxidante	Sobre Cy3 primario (hasta 6 conjuntos)	Oxidación de Cy3 (hasta 4 conjuntos)	Sobre Cy primario (2 conjuntos)	Oxidación de Cy (1 conjunto)
NaOH 0,1 N	37%	13%	34%	
5% DBU	40%	12%	40%	
1% DBU	38%		41%	
5% Butilamina	20%	13%	38%	
Control				
PBS	108%	79%	91%	96%

EJEMPLO 35. Medida del espectro de oxidación de colorante

Se usó la densidad óptica (D.O.) para monitorizar la destrucción de colorante. Se mezclaron 10 µL de colorante con un volumen igual de disolución de oxidante y a continuación se cargaron 2 µL de la disolución mixta en un Espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE). Se leyó la densidad óptica (D.O.) en un espectro completo en el intervalo de 200 nm a 750 nm. Para el estudio cinético, se tomaron medidas a tiempo 0, 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.

EJEMPLO 36. Estudio cinético de la destrucción de Cy3 y Cy5 con H₂O₂

Para estudiar la cinética de la destrucción de colorante, se usó peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 1,5% a pH 10) como agente oxidante y Cy3 y Cy5 como colorantes representativos usando el método descrito en el Ejemplo 36. El espectro de fluorescencia de la mezcla de colorante-disolución oxidante se monitorizó durante un periodo de 30 minutos. La Figura 32 muestra el perfil temporal de los espectros de Cy3 y Cy5. Se observó un descenso rápido en la D.O., que indica destrucción de colorante. En ambos casos, una incubación de 15 minutos en H₂O₂ al 1,5% podía destruir prácticamente los colorantes. Los valores de D.O. en el pico de excitación disminuyeron en un 2% para Cy3 y Cy5 tras 15 minutos.

EJEMPLO 37. Efecto de las concentraciones de H₂O₂ sobre la oxidación de Cy3

Se evaluó un intervalo de concentraciones de H₂O₂ entre 0% y 1,5% y se monitorizó el espectro de absorbancia durante 30 minutos usando el método descrito en el Ejemplo 35. El pH de la disolución de H₂O₂ se mantuvo en 10. Se usó Cy3 como colorante y se registró la absorbancia en su longitud de onda máxima a 550 nm. Excepto para 0,1% de H₂O₂, todas las demás concentraciones de H₂O₂ mostraron resultados similares, y redujeron la absorbancia de colorante a 5% en 15 minutos como se muestra en la Figura 33. No existe una diferencia estadística entre los tratamientos con concentraciones de 0,5%, 1% y 1,5% ($P>0,1$).

EJEMPLO 38. Efecto de H₂O₂ sobre varios fluoróforos

Se evaluó un panel de colorantes fluorescentes para determinar el efecto de H₂O₂ (3% de H₂O₂ a pH 10) sobre diferentes fluoróforos usando el método descrito en el Ejemplo 35. Se registró el espectro de absorbancia durante 30 minutos y los valores de absorbancia se muestran en la Figura 34. Los datos mostrados aquí son valores de D.O. en la longitud de onda de absorbancia máxima del colorante normalizados a la D.O. a tiempo 0. La fluoresceína, que es muy sensible a la fotooxidación, fue relativamente estable frente a este método de oxidación. El ATTO 496 y el Alexa 488 también fueron menos sensibles al agente oxidante en comparación con los otros colorantes. La Figura 34 muestra que los colorantes podían ser destruidos usando H₂O₂.

EJEMPLO 39. Efecto de H₂O₂ sobre Quantum Dots (QD 655)

Se evaluó un intervalo de concentraciones de H₂O₂ (dilución desde 20x a 2000x) y se monitorizó el espectro de absorbancia durante 30 minutos usando el método descrito en el Ejemplo 36. El pH de la disolución de H₂O₂ se mantuvo en 10. Los valores de absorbancia se compararon con una muestra de control de una disolución de QD 655 a diferentes concentraciones (dilución entre 20x y 2000x).

Se diluyó 10x, 100x ó 1000x una disolución (1 µM) de conjugado de IgG anti-ratón de F(ab')2 de cabra Qdto 655 con disolución de bicarbonato sódico 0,775 M (ajustada a pH 10). A cada disolución se añadió un volumen igual de peróxido de hidrógeno al 6%. Se colocaron alícuotas de 100 µL de cada una por triplicado en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las muestras sin peróxido pero diluidas hasta la misma concentración final con agua se usaron como controles. Se usó una disolución de bicarbonato diluido 2x como control de ruido de fondo. Se midió la fluorescencia con el tiempo en un lector de placa spectromax M2 usando los siguientes parámetros: Excitación 350 nm, Emisión 655 nm y auto-corte 630 nm. Para la menor concentración, se logró una reducción de fluorescencia del 99% tras 5 minutos. En 30 minutos la fluorescencia de todas las muestras de peróxido se redujo en >99,5%. La

fluorescencia de las muestras de control quedó mayormente intacta (>93% para la muestra de menor concentración y ~99% para la muestra de mayor concentración).

Para destruir la señal se usó peróxido de hidrógeno al tres por ciento en tampón de bicarbonato (pH 10). Los valores de absorbancia se compararon con una muestra de control de una disolución de QD 655 a concentraciones diferentes (dilución de 20x a 2000x). Para todas las concentraciones de Qdot, la fluorescencia se redujo a menos del 6% del valor de control en 5 minutos, tal como se muestra en la Figura 35.

EJEMPLO 40. Efecto de radicales hidroxi sobre fluoresceína.

Los espectros de absorbancia del colorante de fluoresceína FAM cadaverina ("FAM-CAD") se midieron usando diferentes condiciones de agente oxidante para las Muestras 41 (FAM-CAD, H₂O₂ y H₂O (1:1:1)), 42 (FAM-CAD, H₂O₂ y FeCl₃ (1:1:1)), 43 (FAM-CAD, H₂O₂ y FeCl₃ (1:1:1)), 44 (FAM-CAD y H₂O (1:2)). Se mezcló una disolución de fluoresceína-cadaverina con peróxido de hidrógeno al 9% y una disolución al 2% de FeCl₃ en agua en una relación en volumen de 1:1:1. Se dejó reposar la mezcla durante 5 minutos. Como la adición de FeCl₃ cambia el pH a altamente ácido y se sabe que el espectro de fluoresceína es diferente en condiciones ácidas, antes de la medida del espectro UV/VIS, la disolución se alcalinizó mediante la adición de NaOH 1N, se filtró y se registró su espectro.

Las disoluciones fueron tratadas de forma similar salvo cuando se reemplazó el peróxido de hidrógeno con agua o la disolución de FeCl₃ se reemplazó con agua, y se usaron como controles. También se usó como control una disolución en la que el FeCl₃ y el peróxido de hidrógeno fueron reemplazados con agua. Aunque en presencia de peróxido, los espectros presentan algo de ruido y la línea base se eleva debido a la formación de burbujas, los espectros mostraron claramente que mientras las muestras de control no se vieron afectadas, prácticamente toda la fluoresceína fue destruida en la muestra de ensayo. La absorbancia se redujo considerablemente tras 5 minutos para la Muestra 42, como se muestra en la Figura 36, lo que indica que la fluoresceína puede ser destruida empleando un agente oxidante para crear radicales hidroxilo.

La invención puede realizarse en otras formas específicas sin alejarse de su espíritu o sus características esenciales. Por tanto, las anteriores realizaciones deben considerarse a todos los efectos como ilustrativas más que como limitantes de la invención aquí descrita. El alcance de la invención está indicado, por tanto, por las reivindicaciones anexas más que por la anterior descripción, y por lo tanto todos los cambios que entran dentro del significado y del rango de equivalencia de las reivindicaciones quedan aquí abarcados. La invención puede realizarse en otras formas específicas sin alejarse de su espíritu o sus características esenciales. Por tanto, las anteriores realizaciones deben considerarse a todos los efectos como ilustrativas más que como limitantes de la invención aquí descrita. El alcance de la invención está indicado, por tanto, por las reivindicaciones anexas más que por la anterior descripción, y por lo tanto todos los cambios que entran dentro del significado y del rango de equivalencia de las reivindicaciones quedan aquí abarcados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para sondear dianas múltiples en una muestra biológica que comprende una sección de tejido, método que comprende:

- (a) proporcionar una sección de tejido que contiene múltiples dianas;
- (b) unir al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo a una o más dianas presentes en la sección de tejido;
- (c) unir al menos una sonda de control a una o más dianas presentes en la sección de tejido;
- (d) detectar al menos una señal procedente de al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo unida en la etapa (b) y detectar al menos una señal de control procedente de al menos una sonda de control unida en la etapa (c);
- (e) aplicar a la muestra de la etapa (d) una disolución que comprende un agente oxidante que desactiva selectivamente la(s) marca(s) de fluoróforo(s) de al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo y no la(s) sonda(s) de control;
- (f) unir al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo a una o más dianas presentes en la muestra tras la etapa (e); y
- (g) detectar al menos una señal procedente de al menos una sonda de anticuerpo marcada con fluoróforo unida en la etapa (f).

2. El método de la reivindicación 1, en el que la disolución es una disolución alcalina.

3. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la disolución de la etapa (e) es una disolución básica que no contiene un agente reductor o un tensioactivo.

4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que se selecciona el agente oxidante entre peróxido de hidrógeno, permanganato potásico, dicromato sódico, bromo acuoso, yodo-yoduro potásico e hidroperóxido de *t*-butilo.

5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.

6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que una o ambas etapas (b) y (f) comprenden la unión de la sección de tejido a una pluralidad de sondas de anticuerpo marcadas con fluoróforo, que comprende cada una un anticuerpo diferente y una marca de fluoróforo diferente.

7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las marcas de fluoróforo comprenden un colorante de cianina.

8. El método de cualquier reivindicación precedente, que usa 4',6-diaminidino-2-fenilindol como sonda de control.

9. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las etapas (e)-(g) se repiten una o más veces, preferiblemente al menos 5, al menos 10 ó al menos 20 veces.

10. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de oxidación (e) se lleva a cabo durante menos de aproximadamente 30 minutos, preferiblemente entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 15 minutos.

11. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una marca de fluoróforo de la etapa (b) es la misma que la al menos una marca de fluoróforo de la etapa (f).

12. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que un anticuerpo de la etapa (f) une una diana diferente a al menos un anticuerpo de la etapa (b).

13. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de oxidación se lleva a cabo sin desactivar más del 20% de la sonda de control.

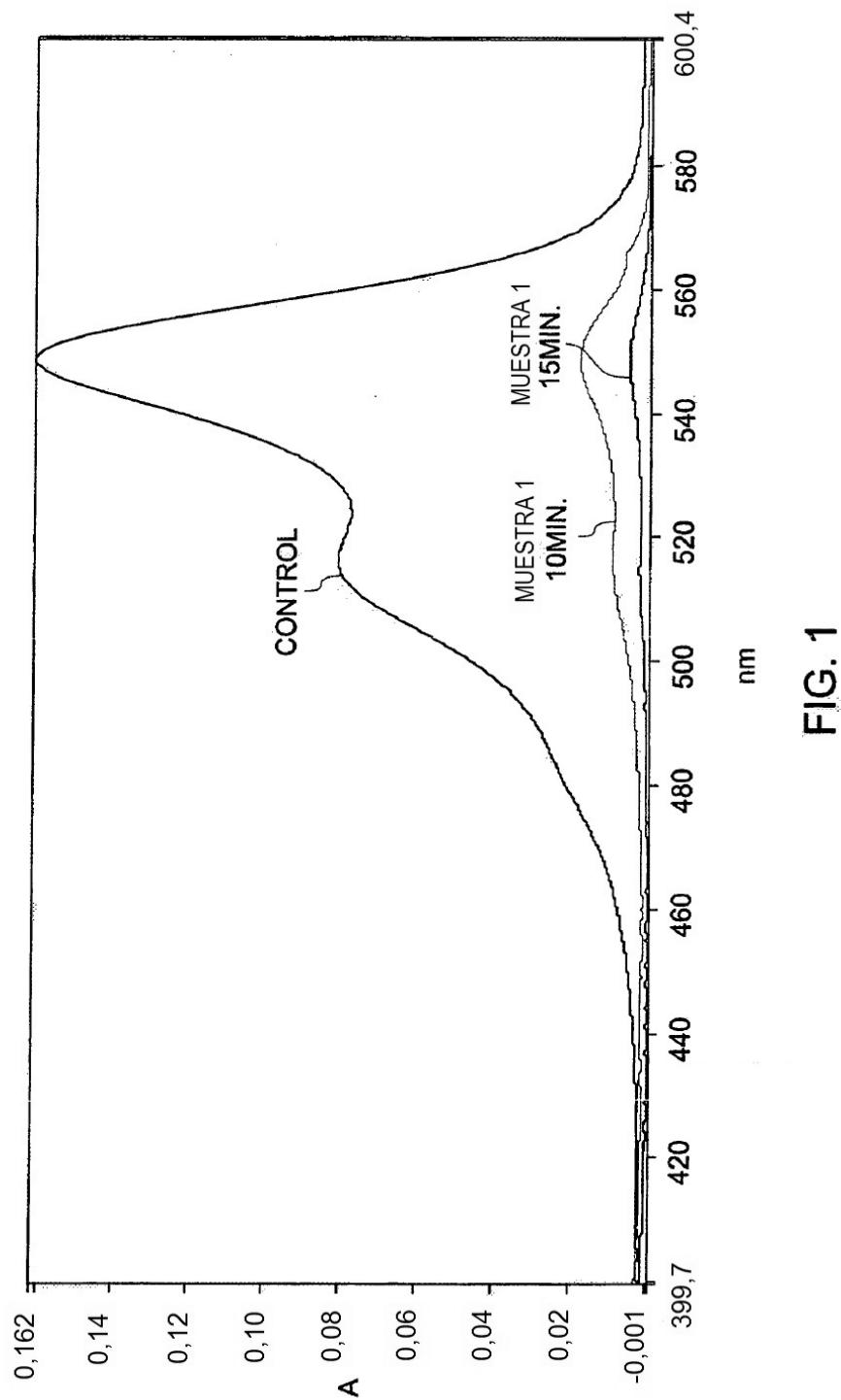


FIG. 1

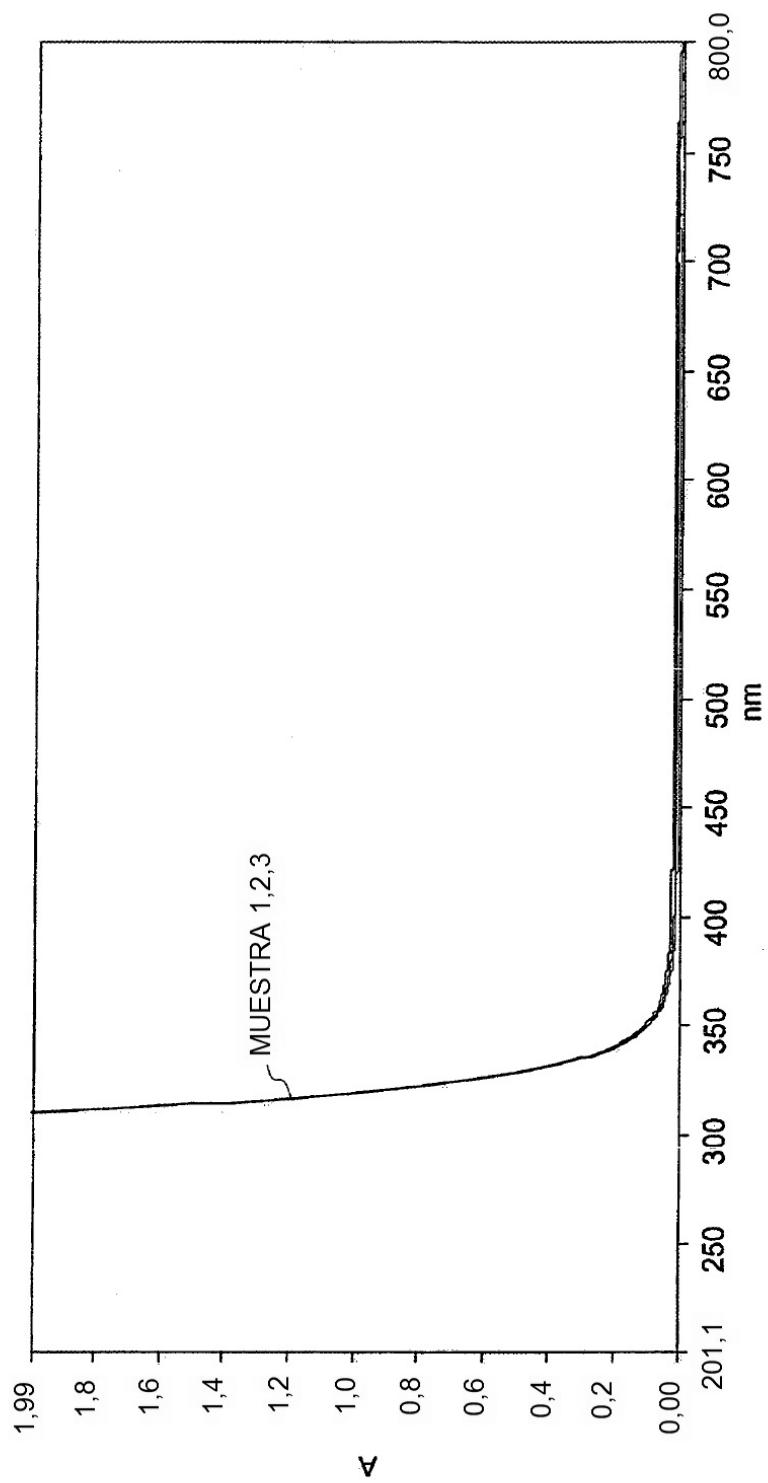


FIG. 2

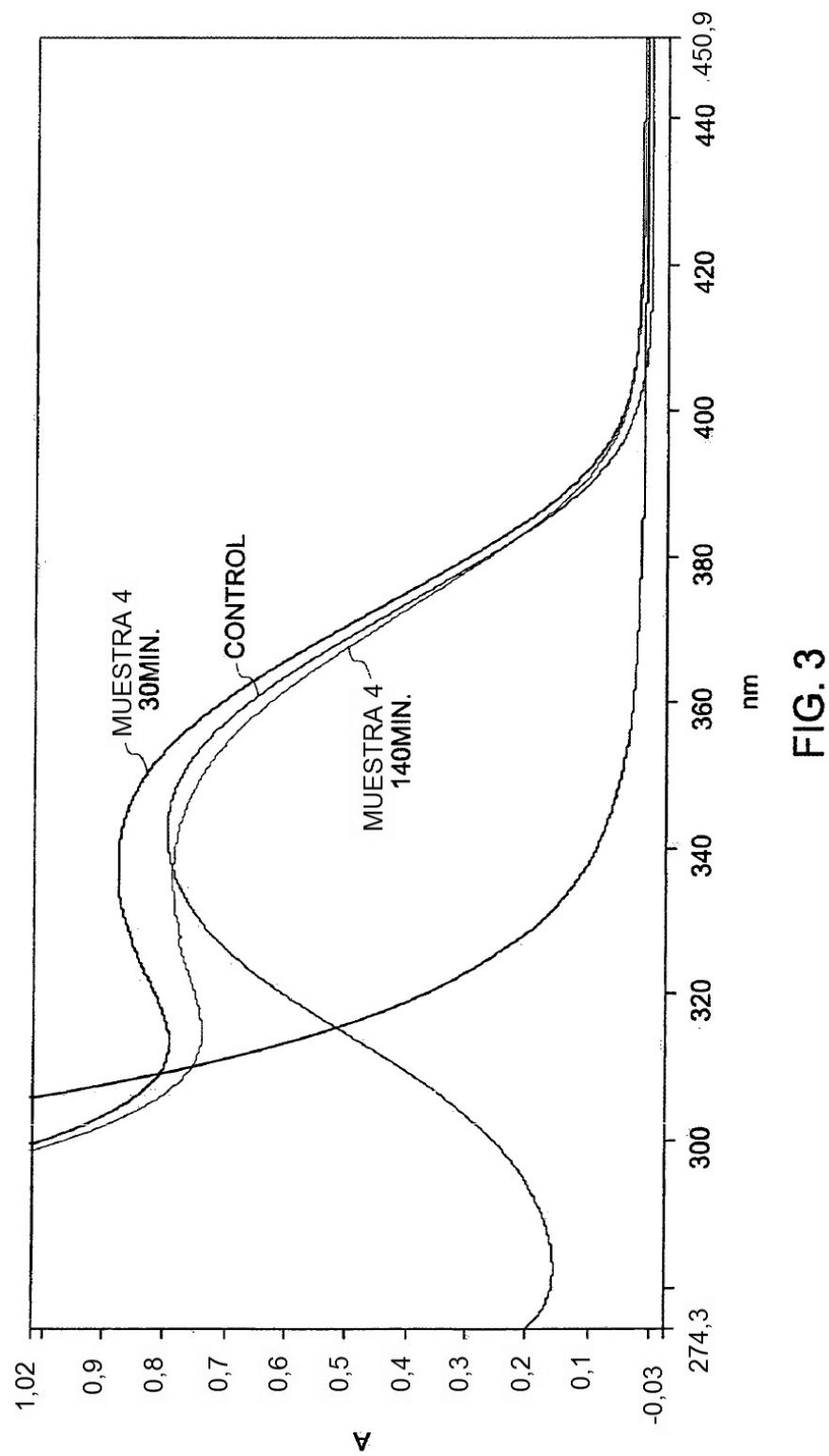


FIG. 3

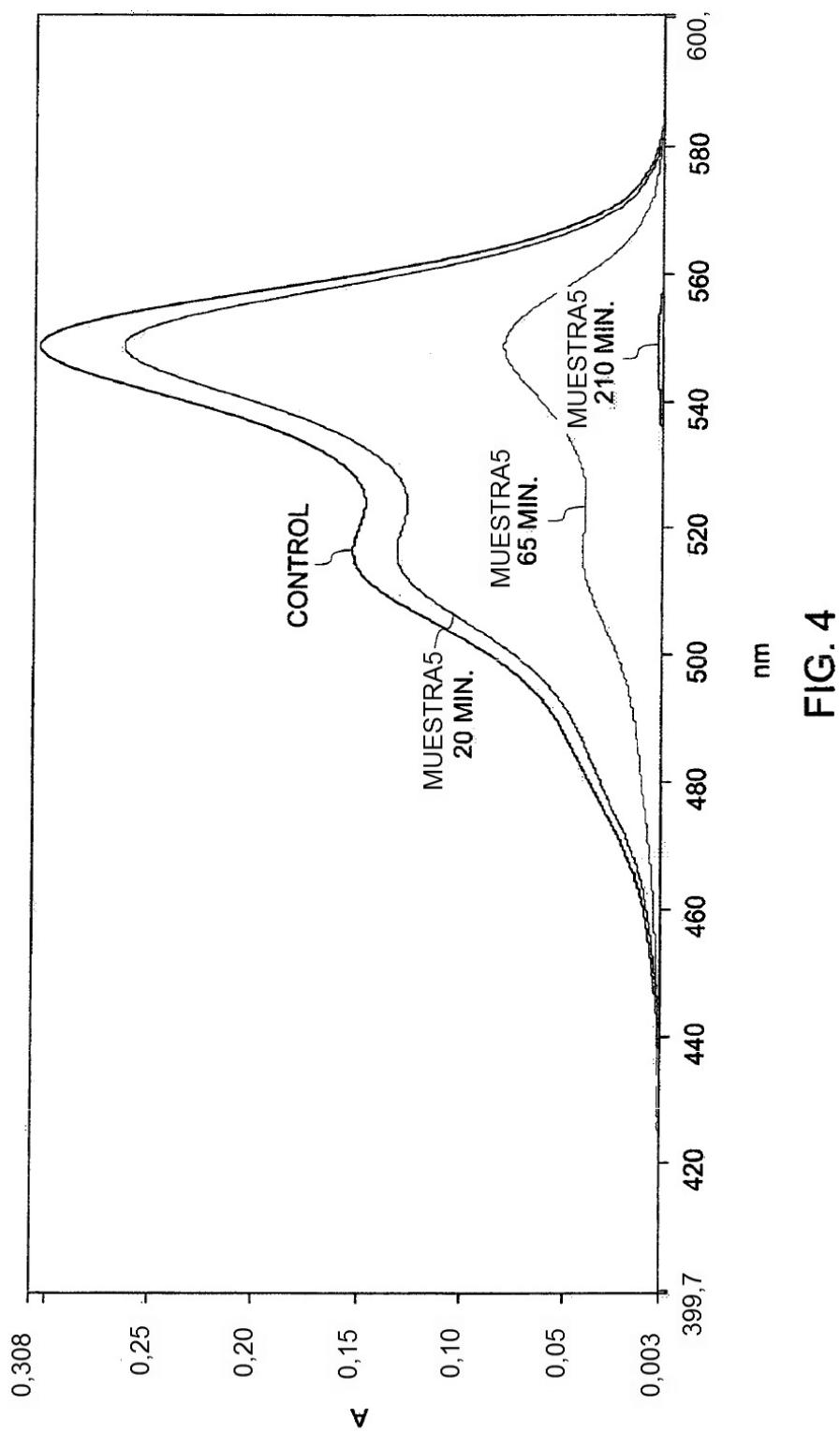


FIG. 4

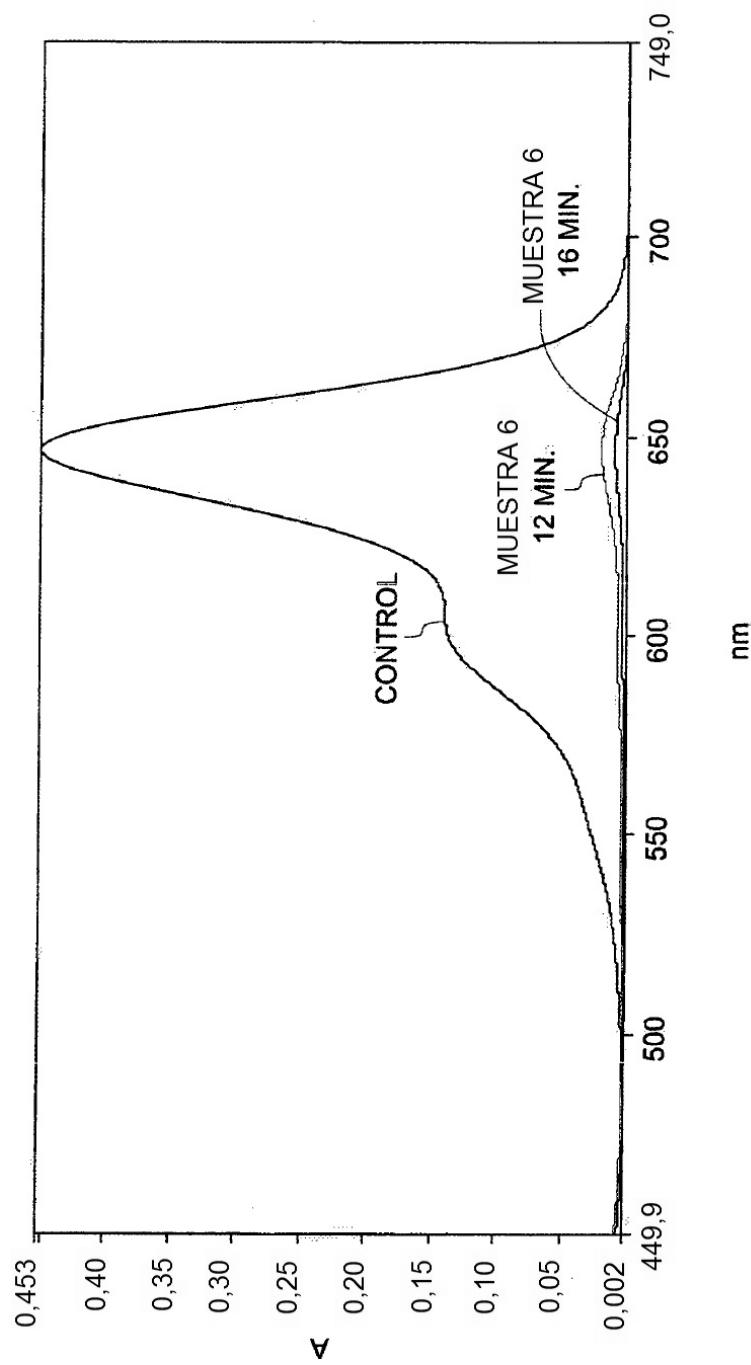


FIG. 5

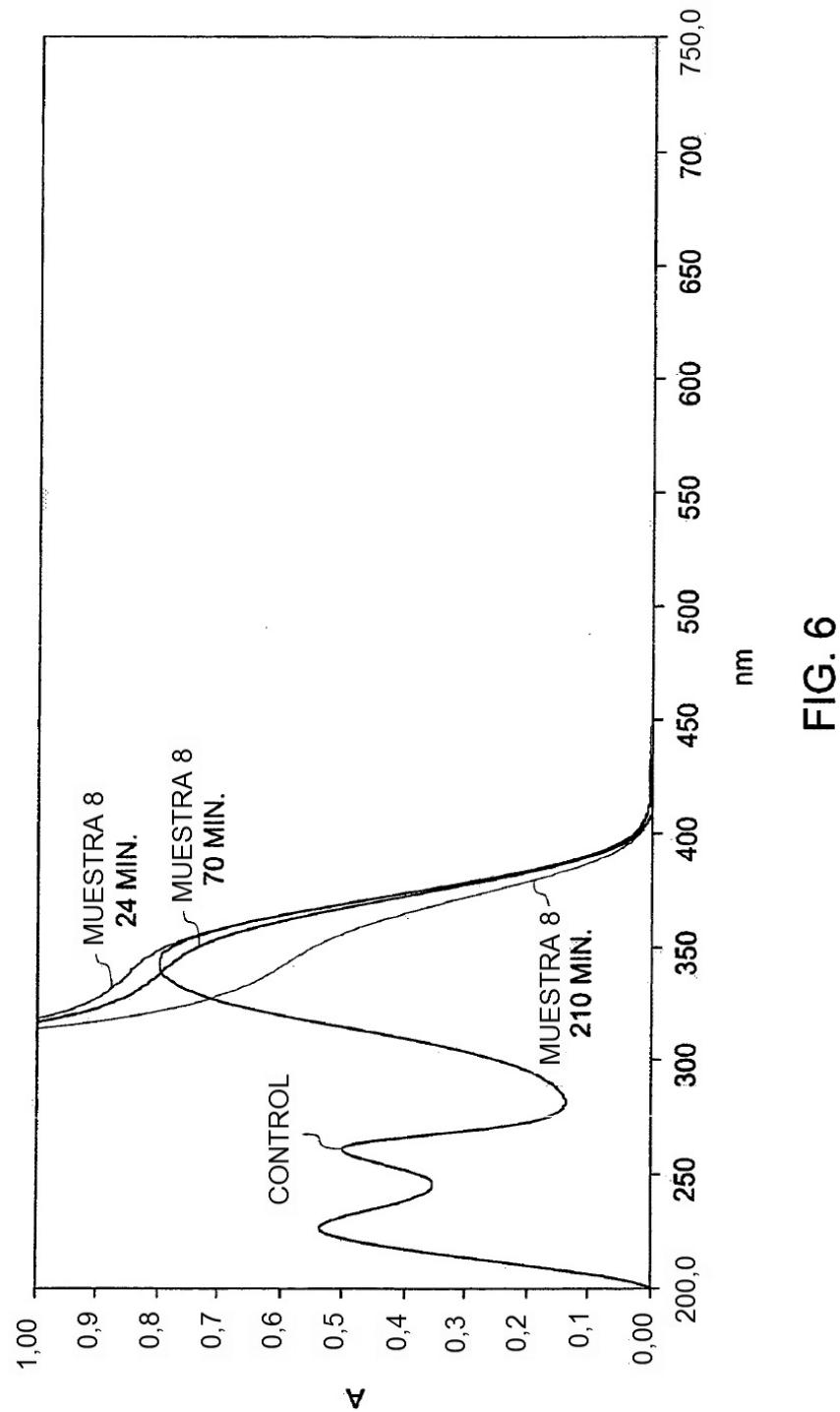


FIG. 6

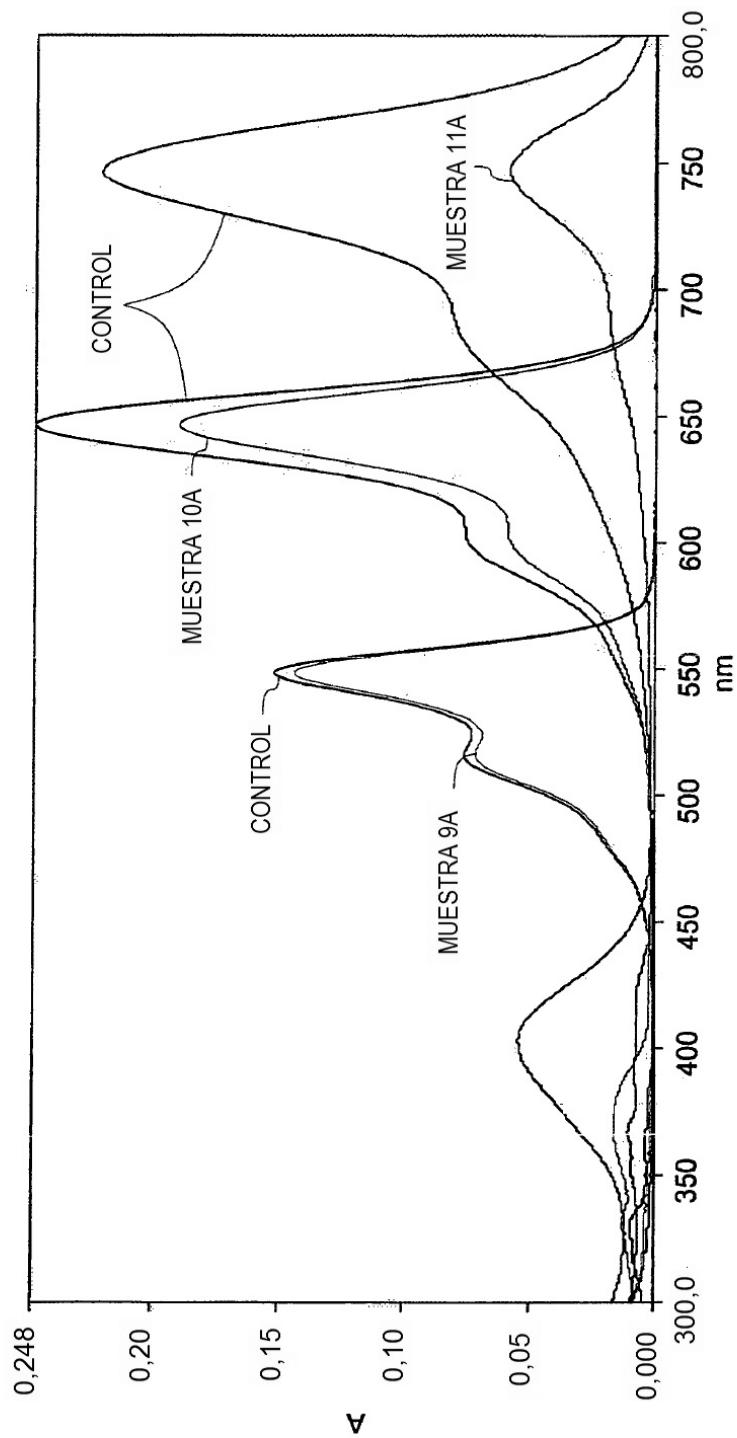


FIG. 7

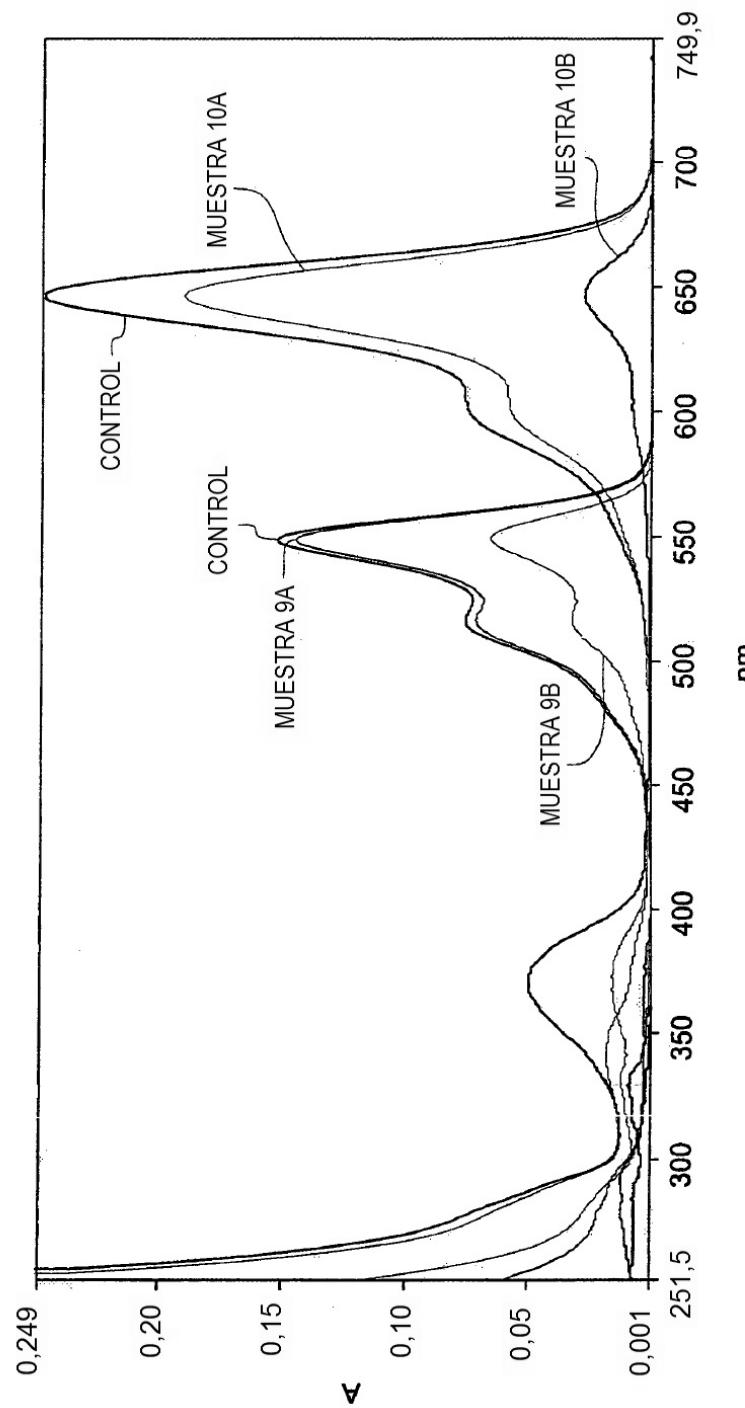


FIG. 8

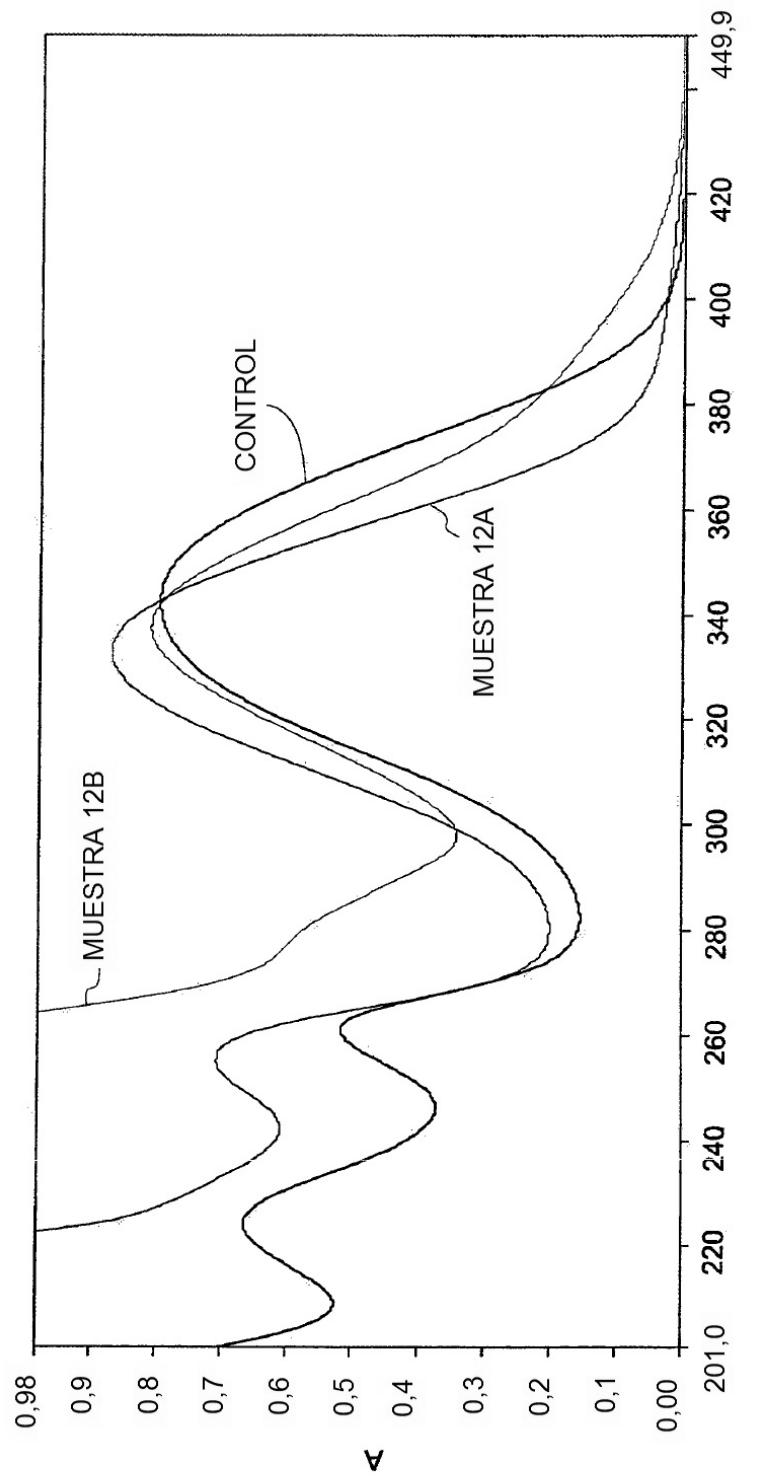


FIG. 9

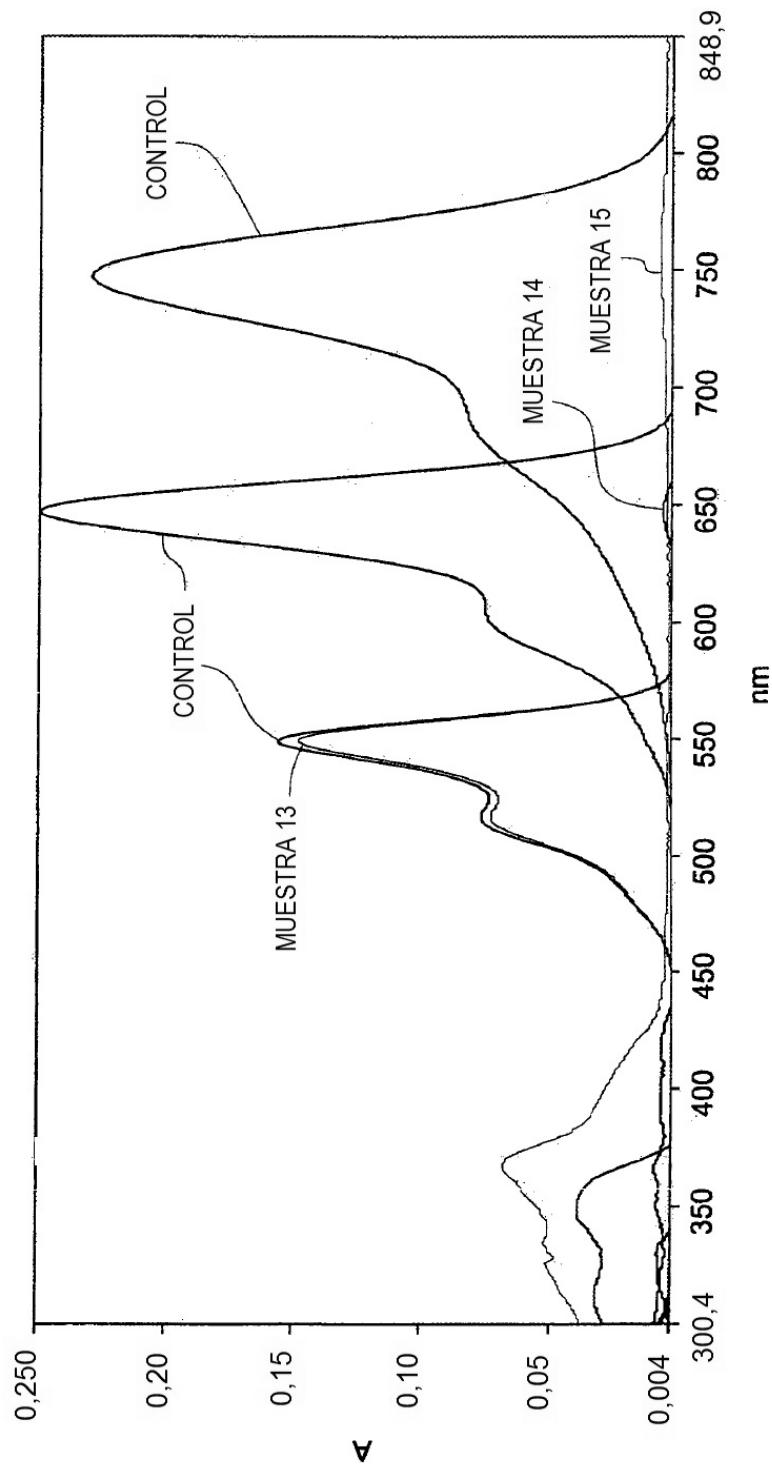


FIG. 10

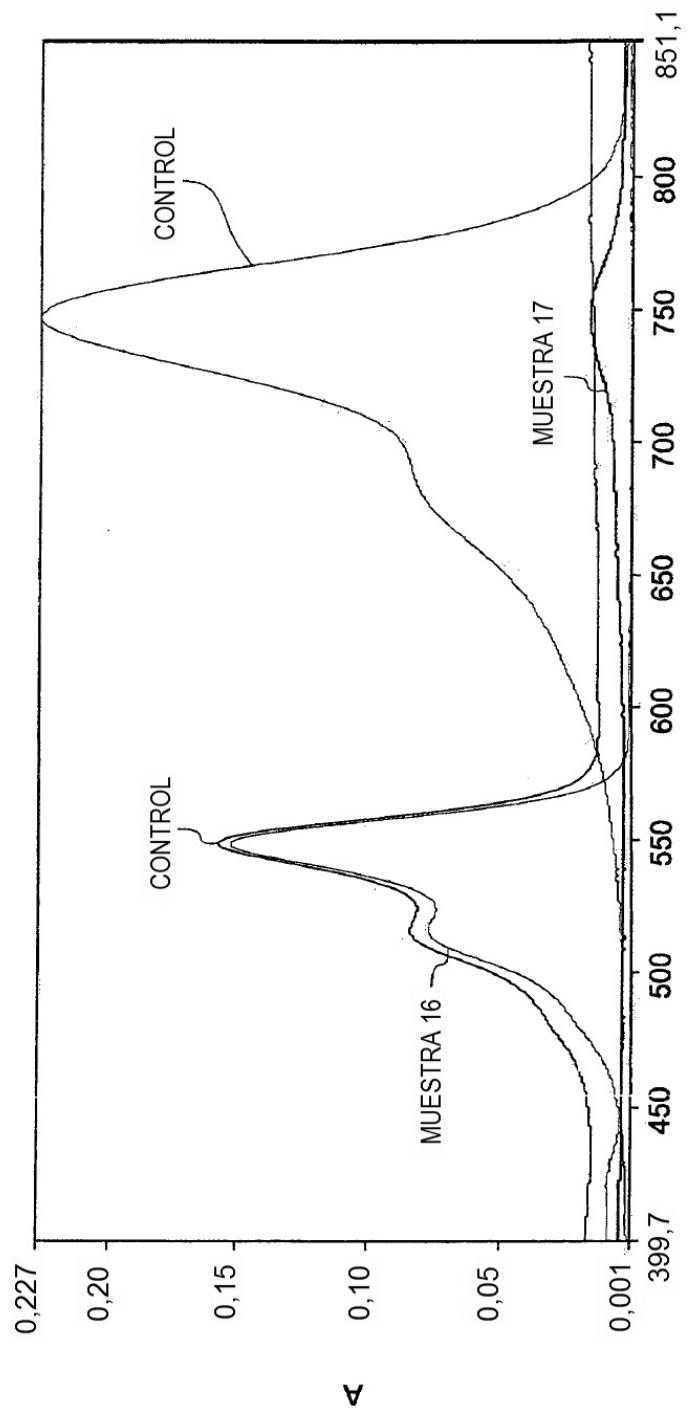
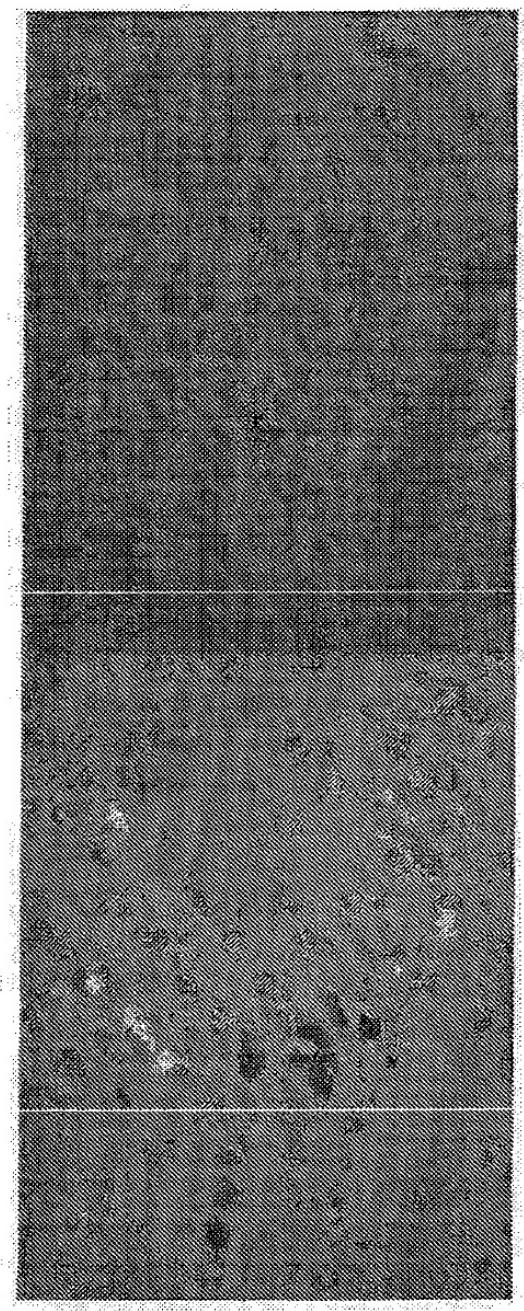


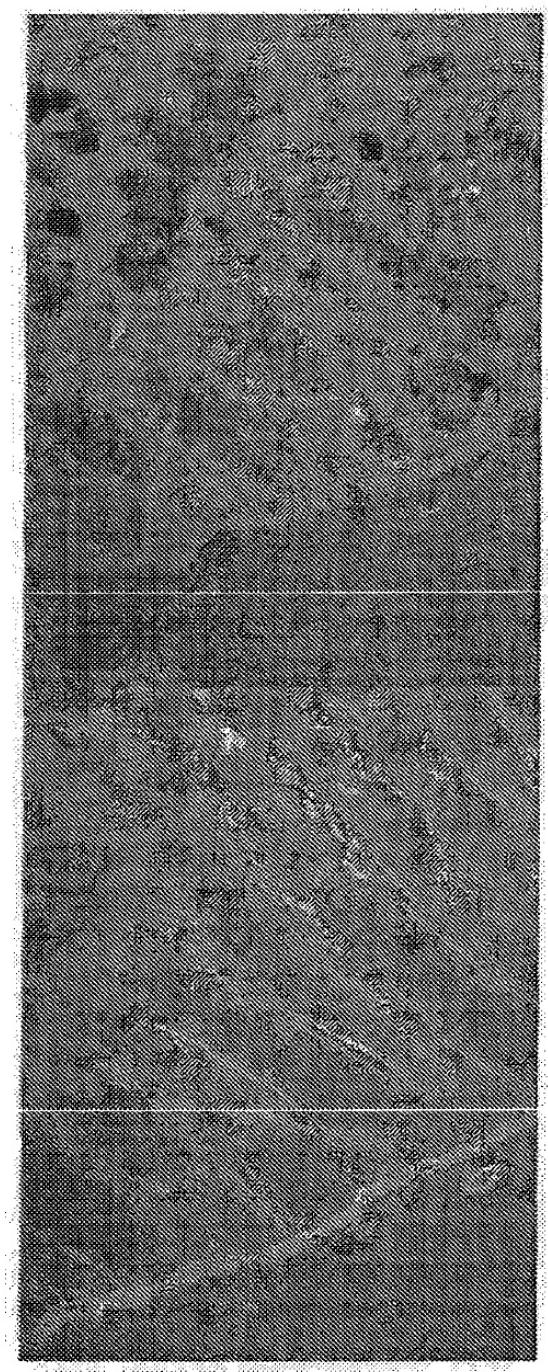
FIG. 11

MUESTRA 18B

MUESTRA 18A

FIG. 12





MUESTRA 19A

MUESTRA 19B

FIG. 13

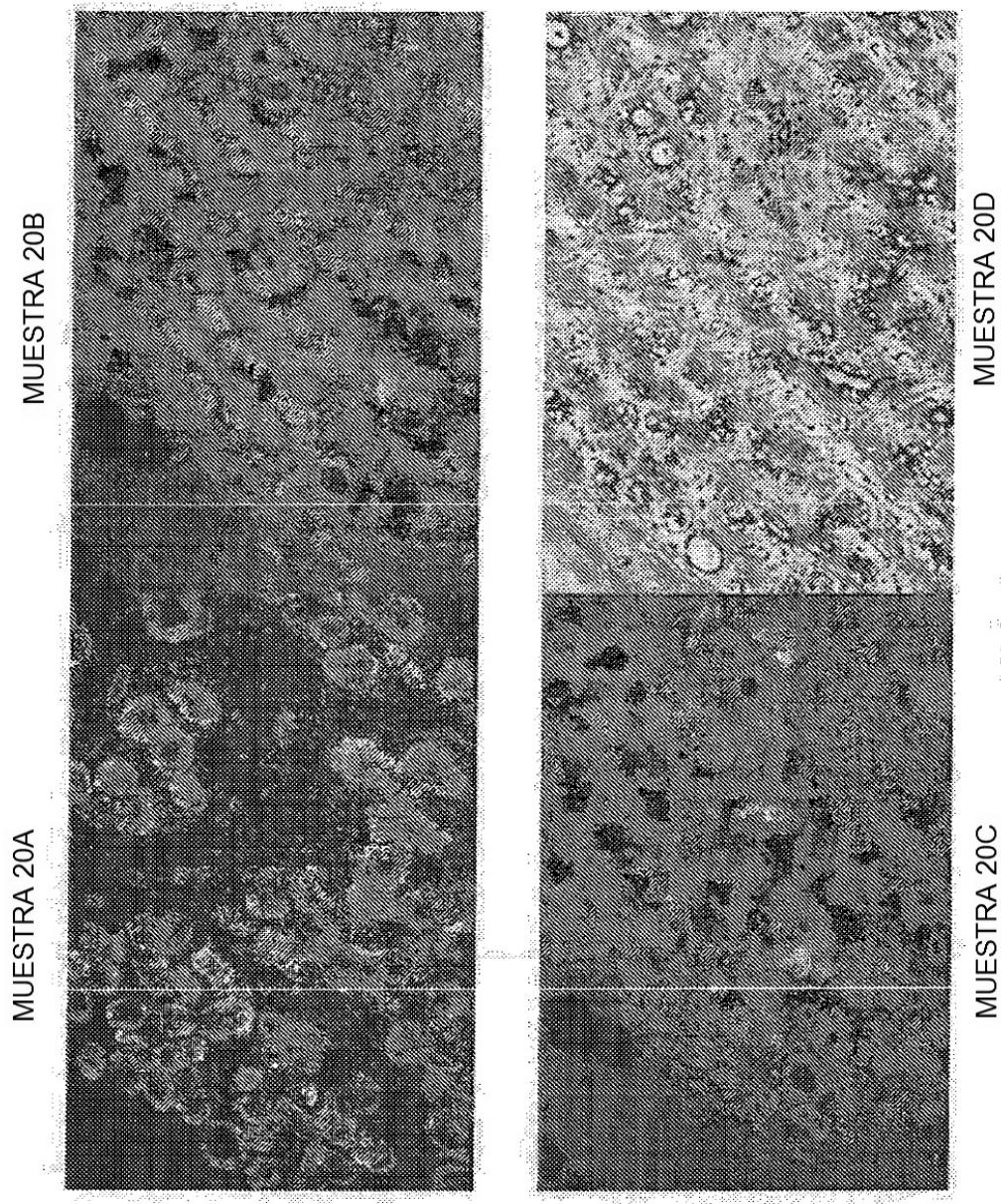


FIG. 14

MUESTRA 20C

MUESTRA 20D

MUESTRA 20A
MUESTRA 20B

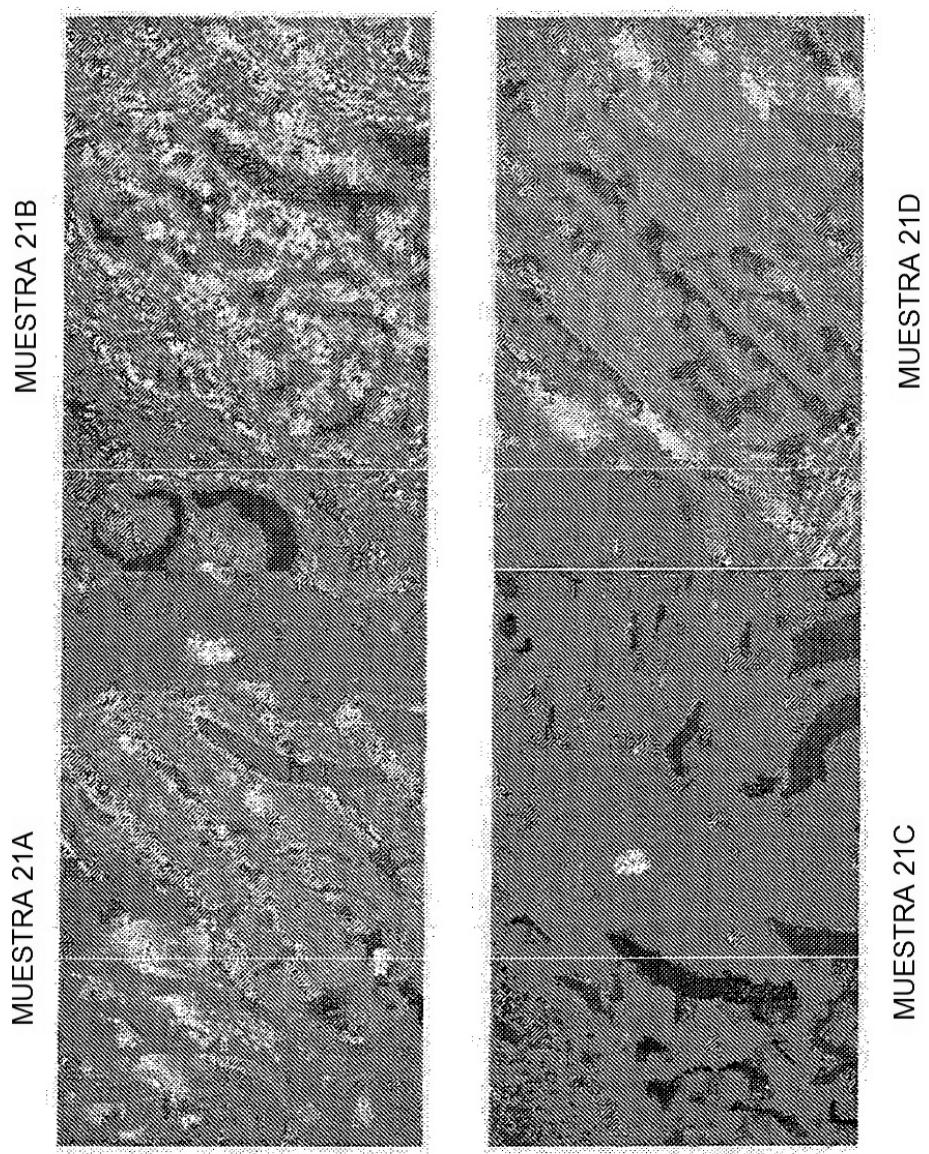


FIG. 15

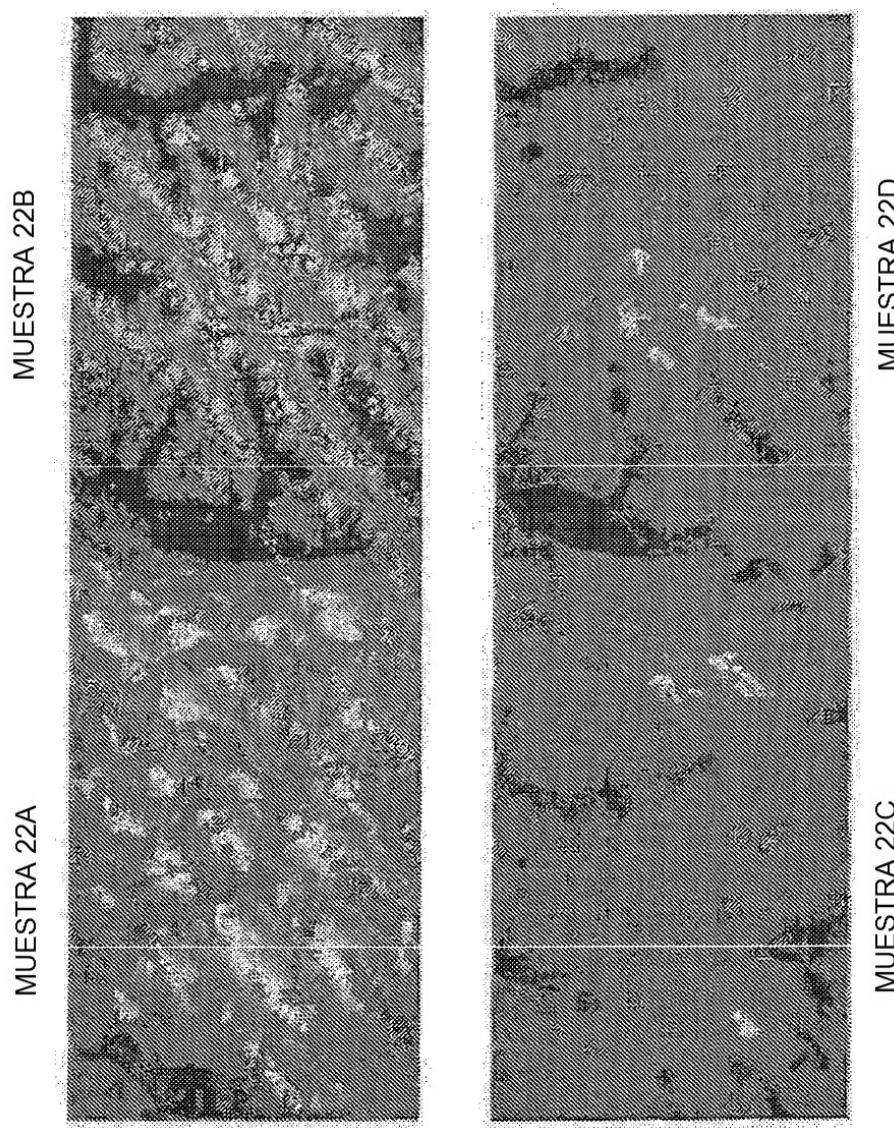


FIG. 16

ES 2 459 725 T3

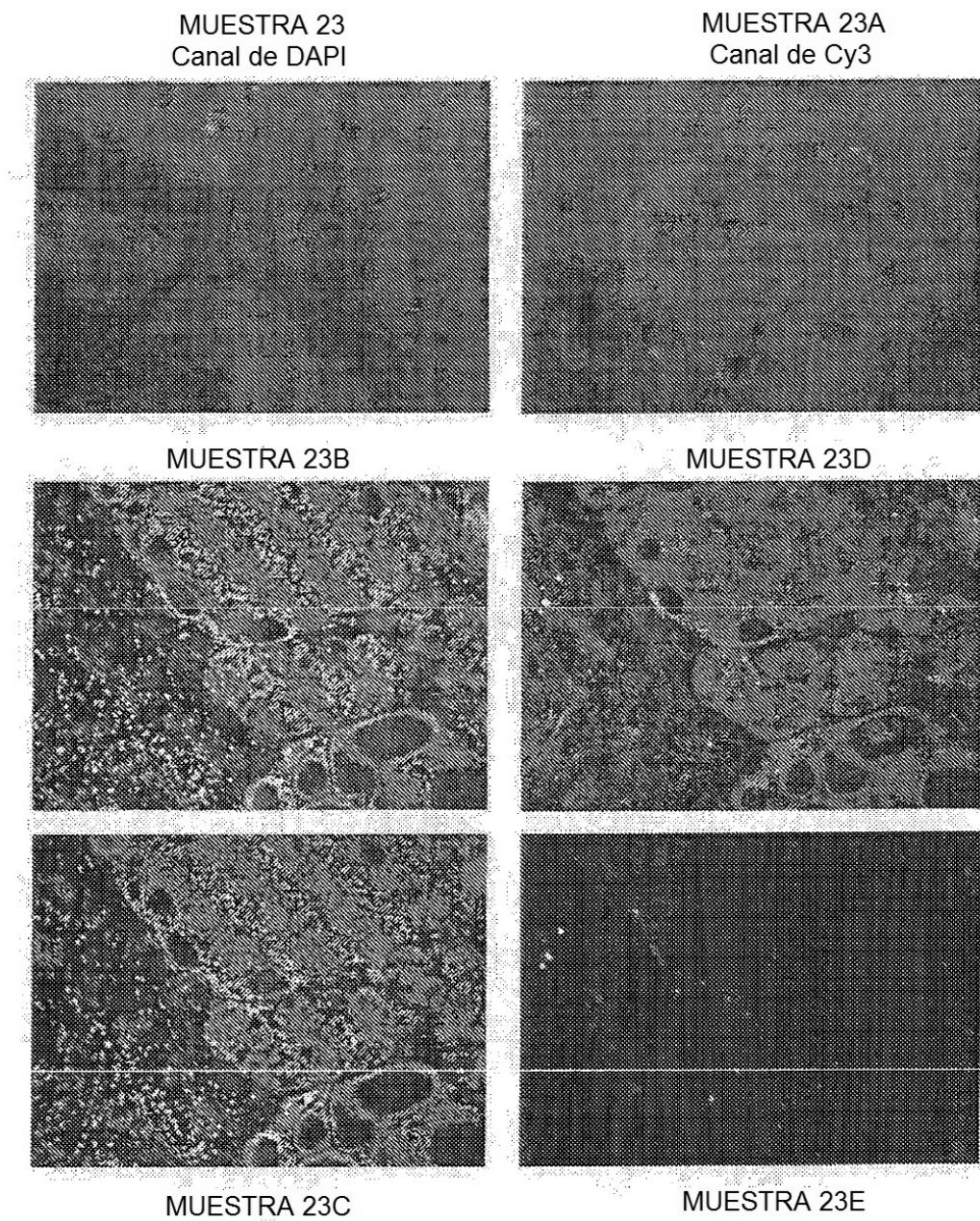


FIG. 17

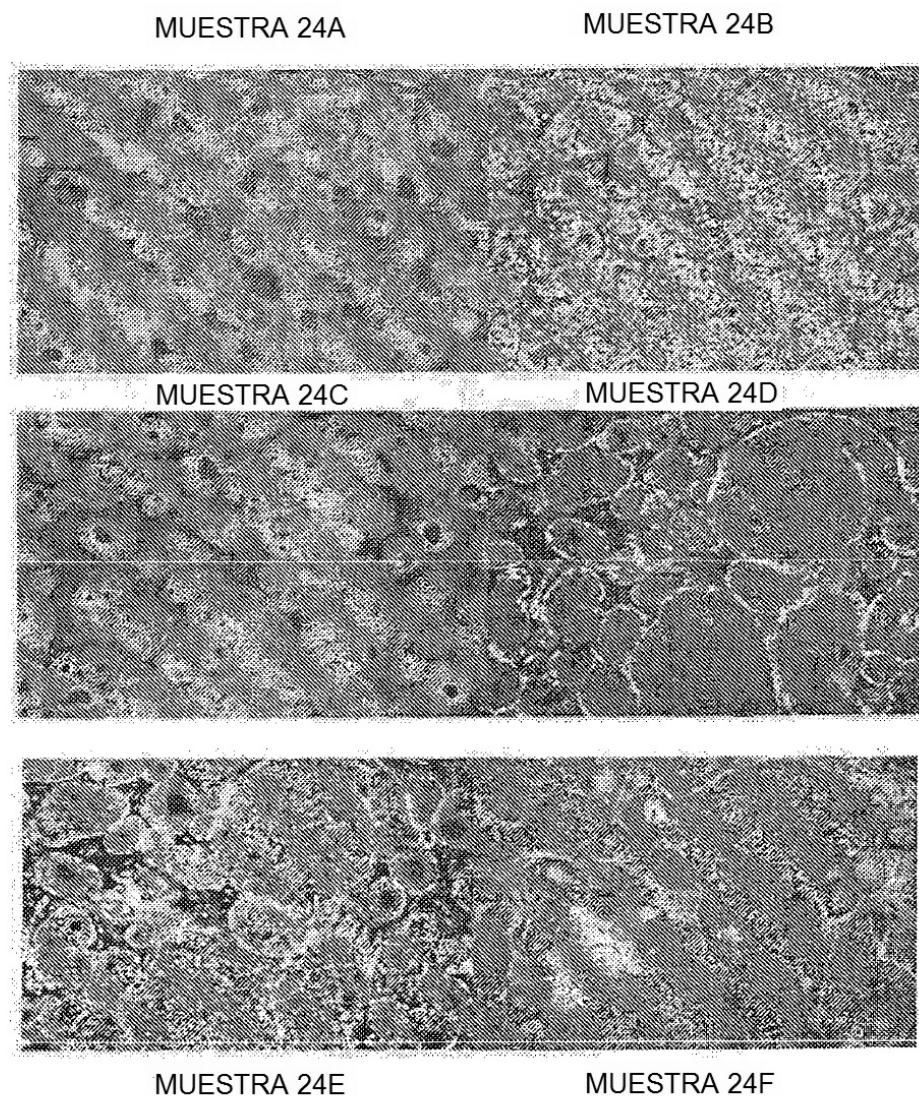


FIG. 18

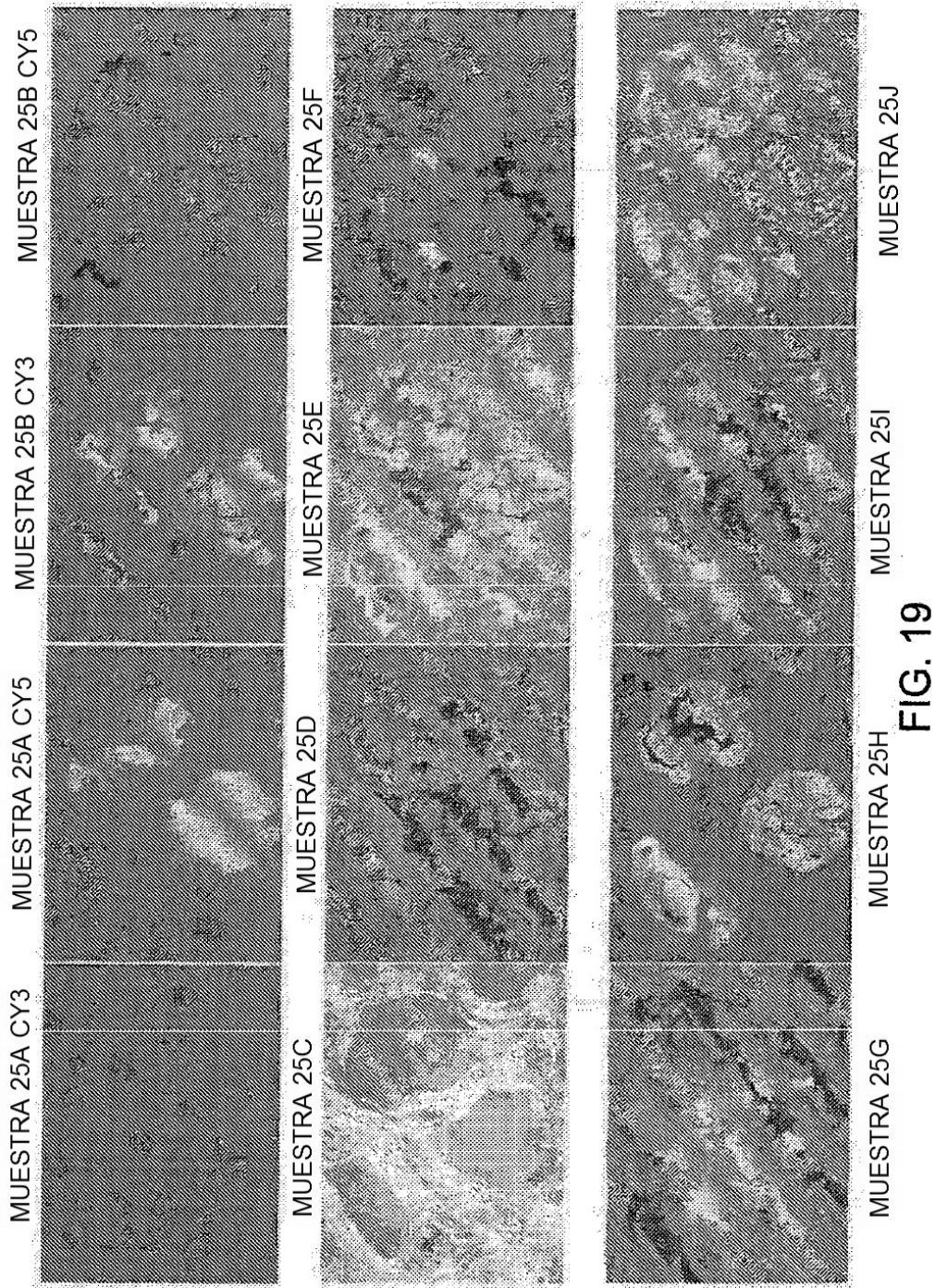


FIG. 19

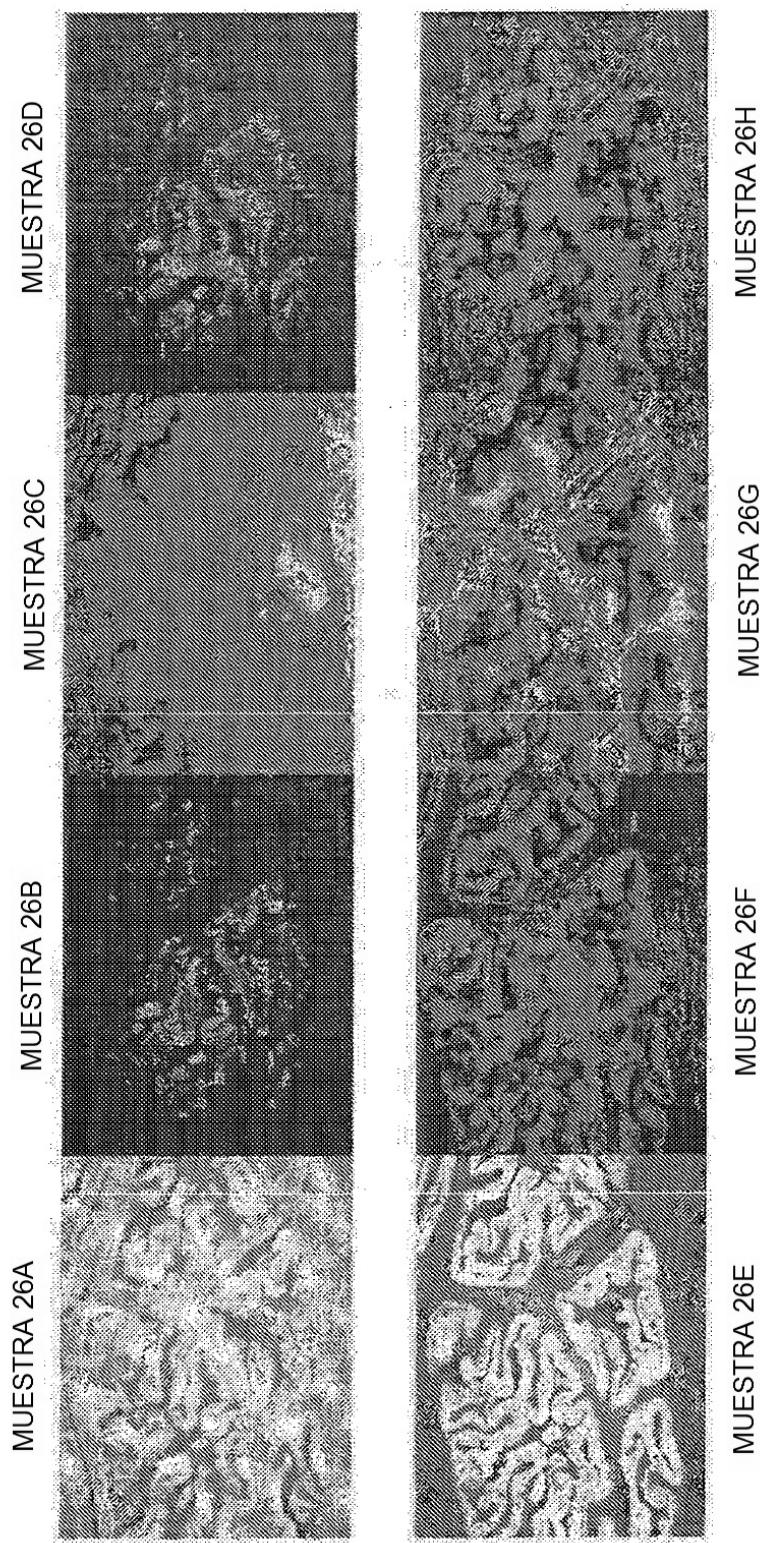


FIG. 20

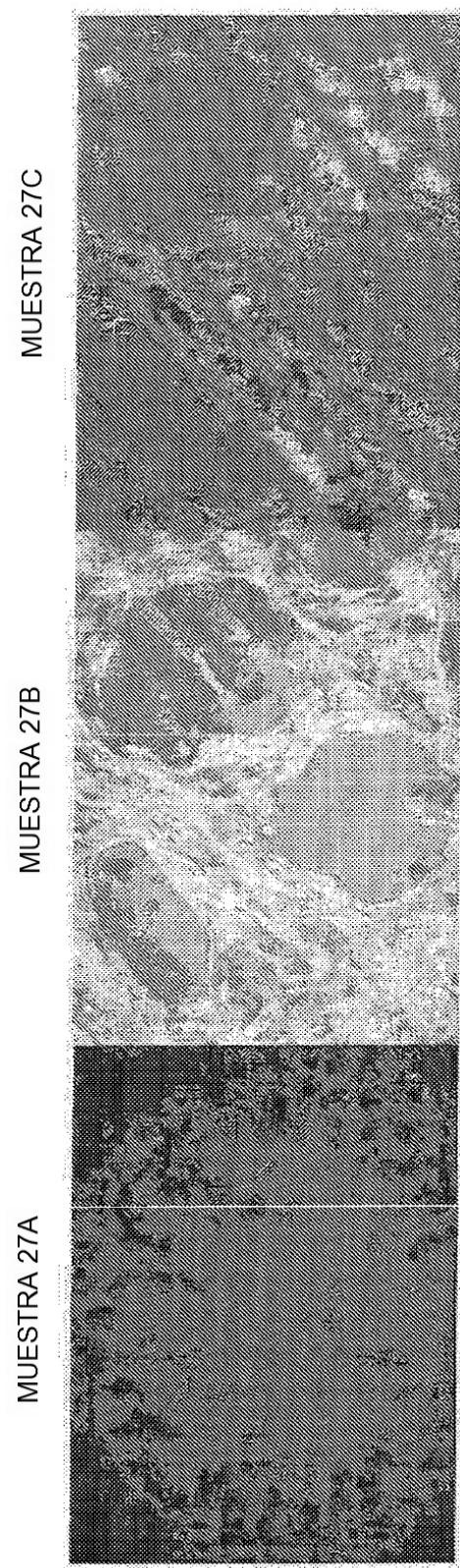


FIG. 21

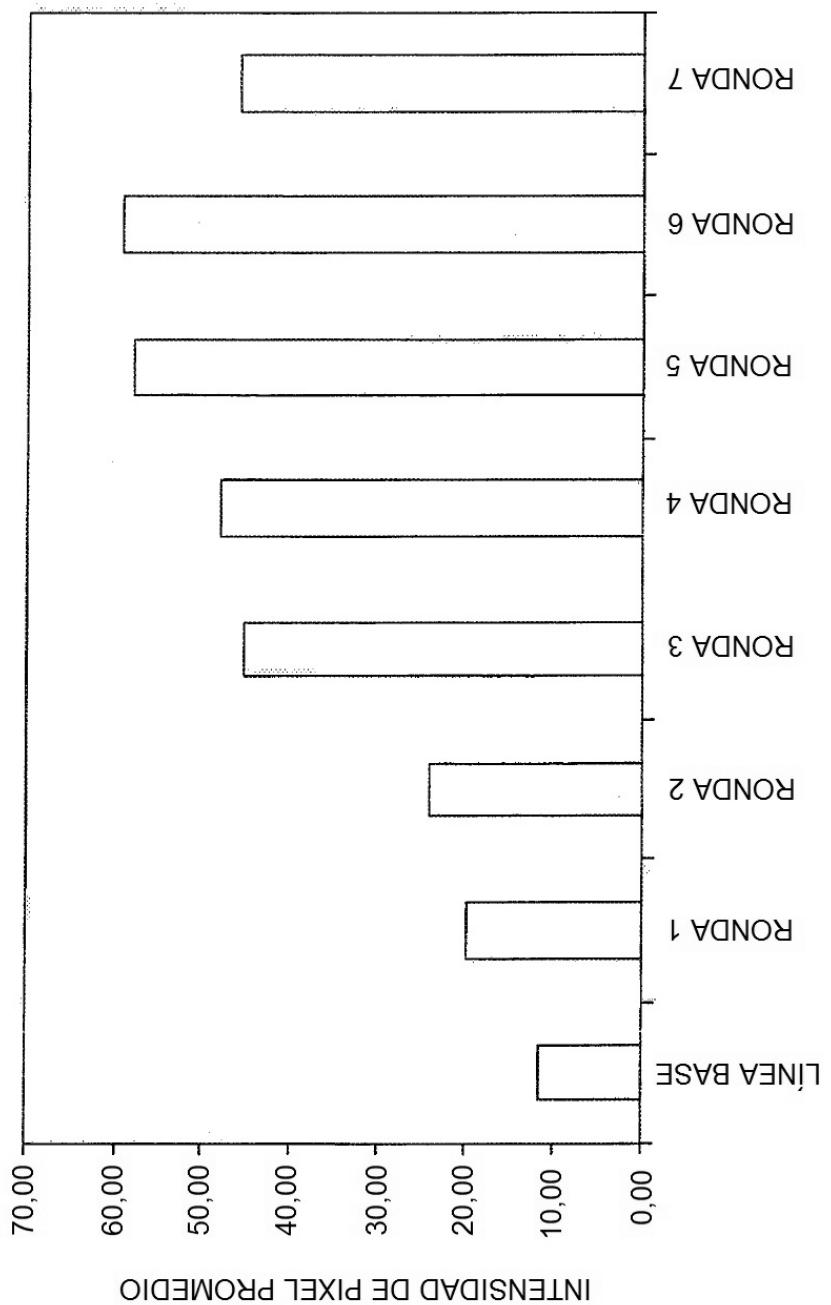


FIG. 22

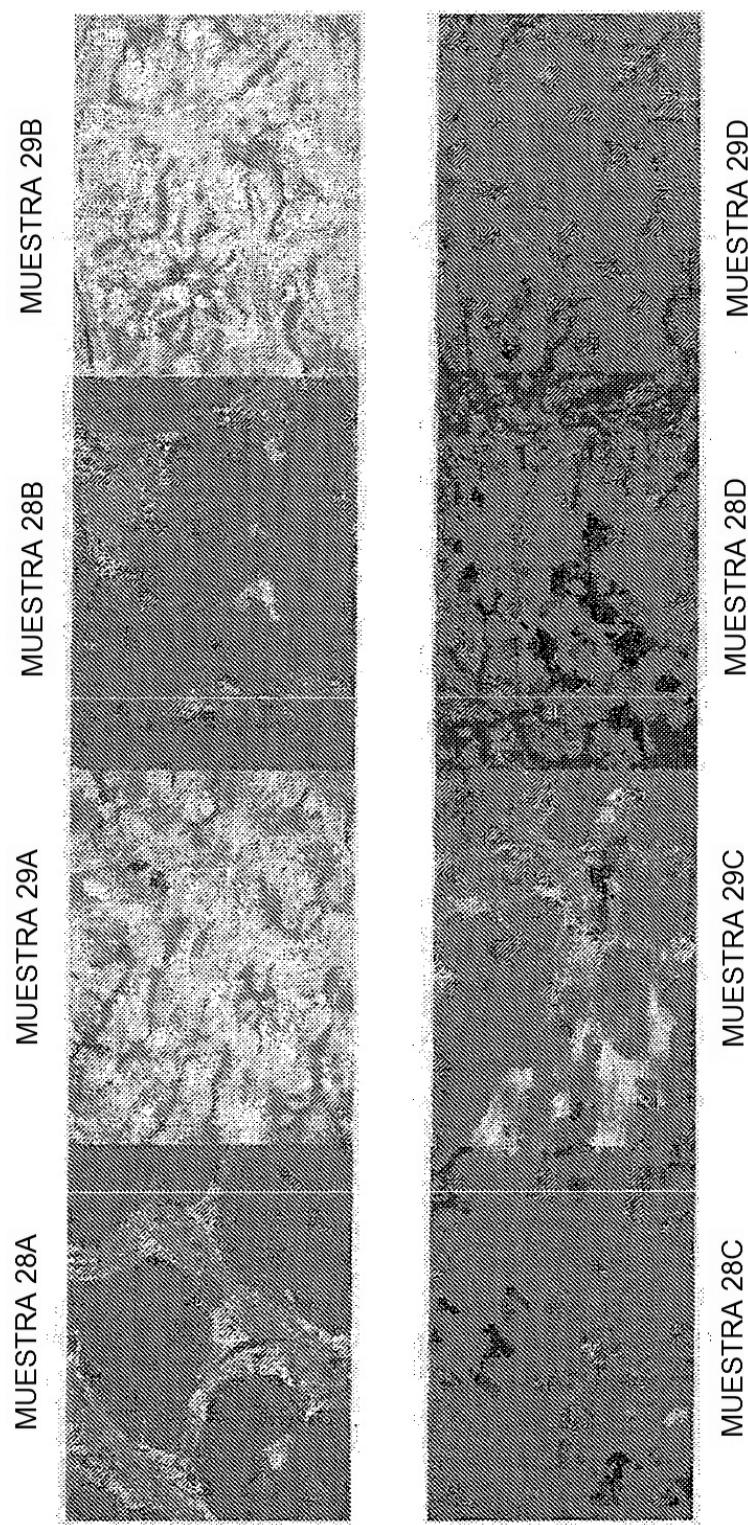
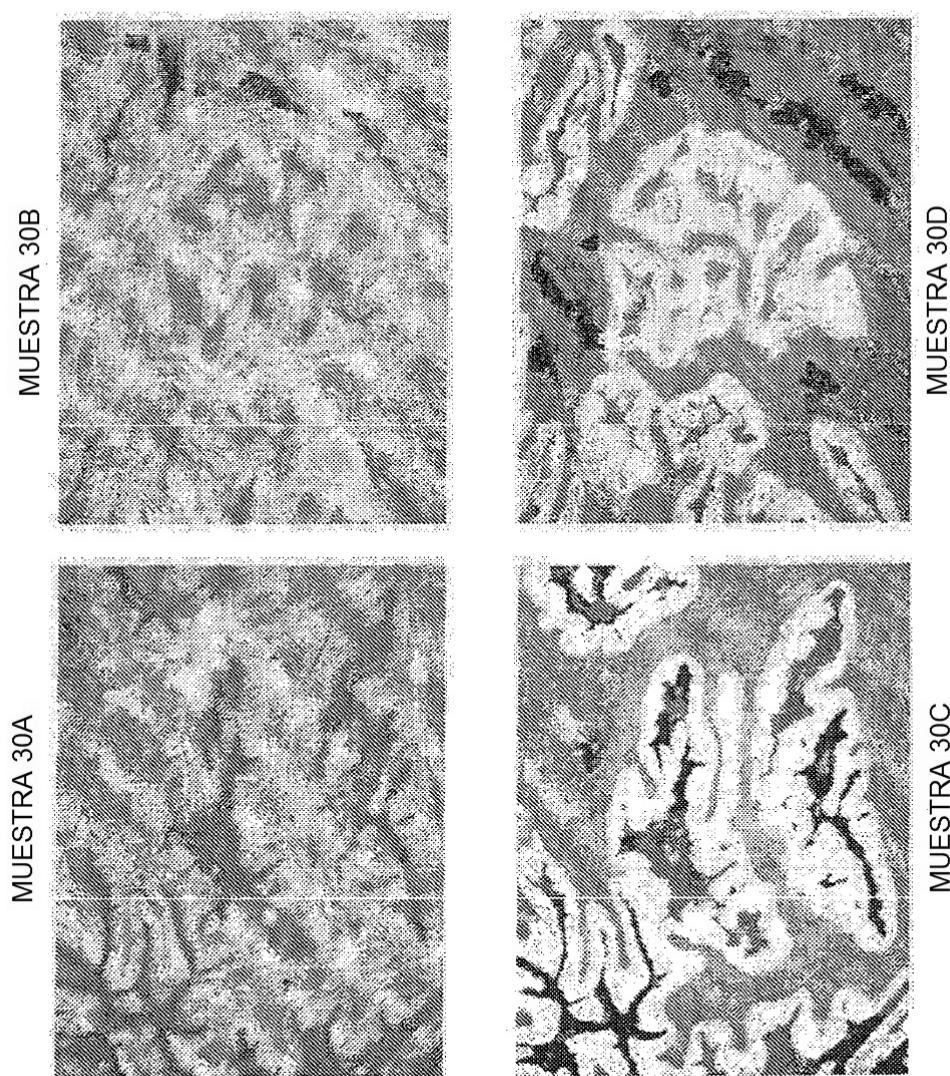


FIG. 23

FIG. 24



ES 2 459 725 T3

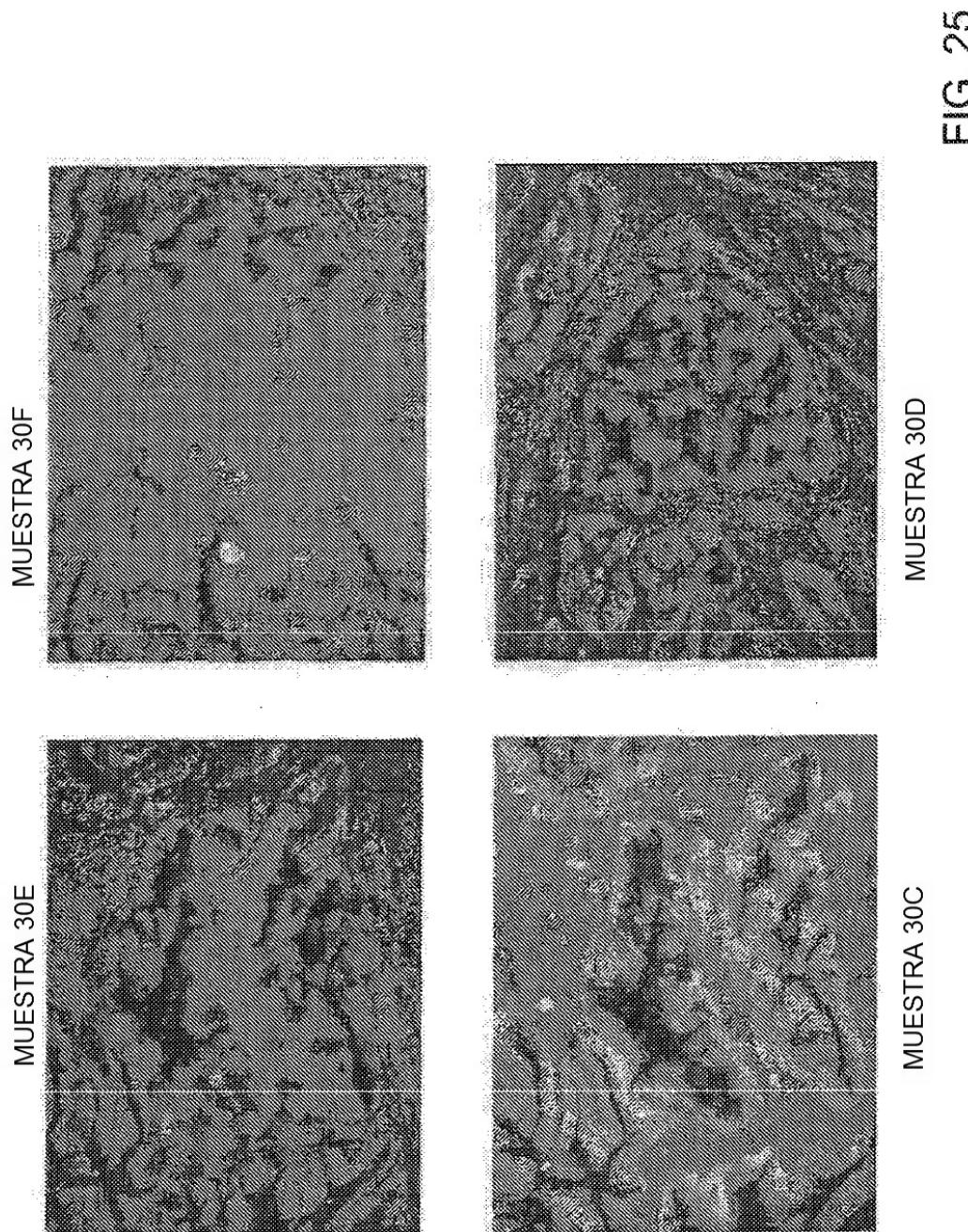


FIG. 25

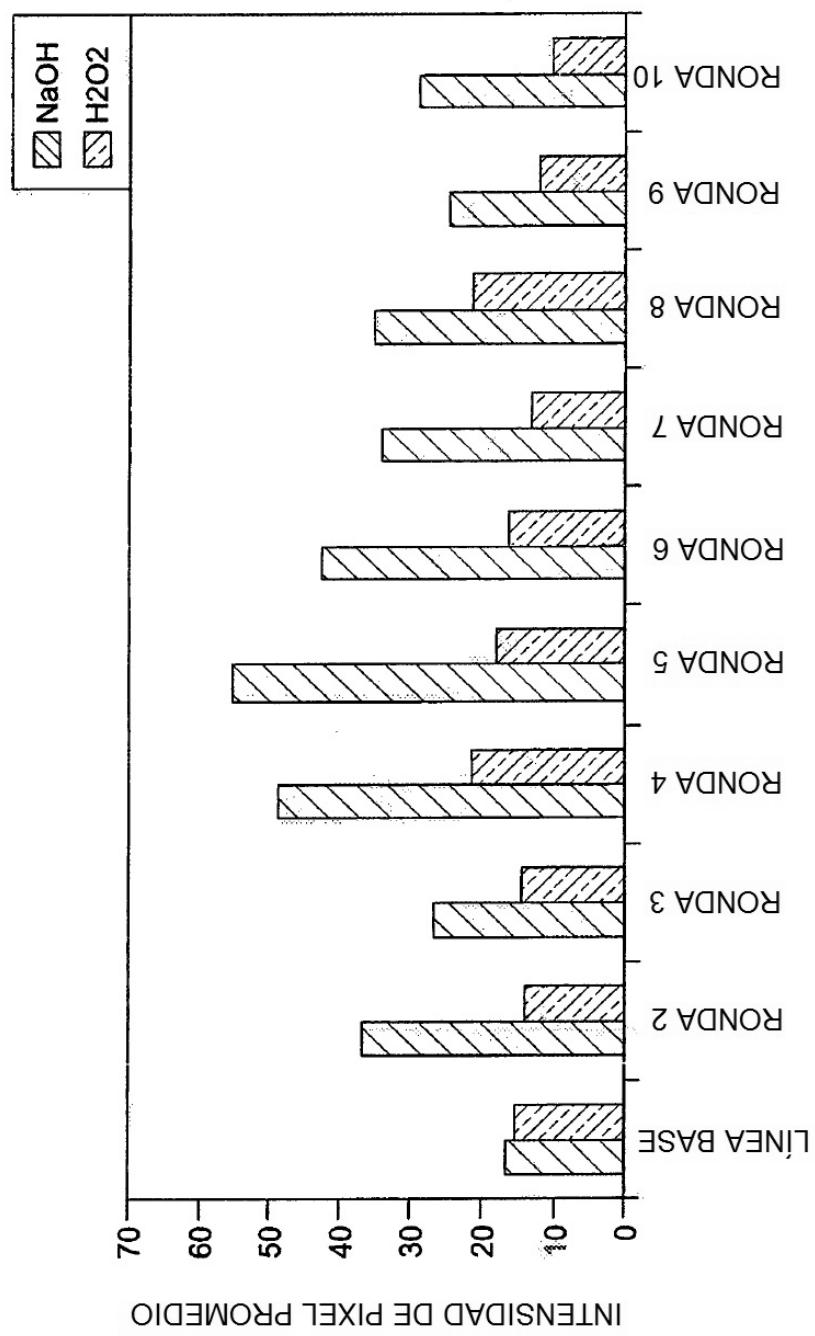
MUESTRA 30D

MUESTRA 30C

MUESTRA 30F

MUESTRA 30E

FIG. 26



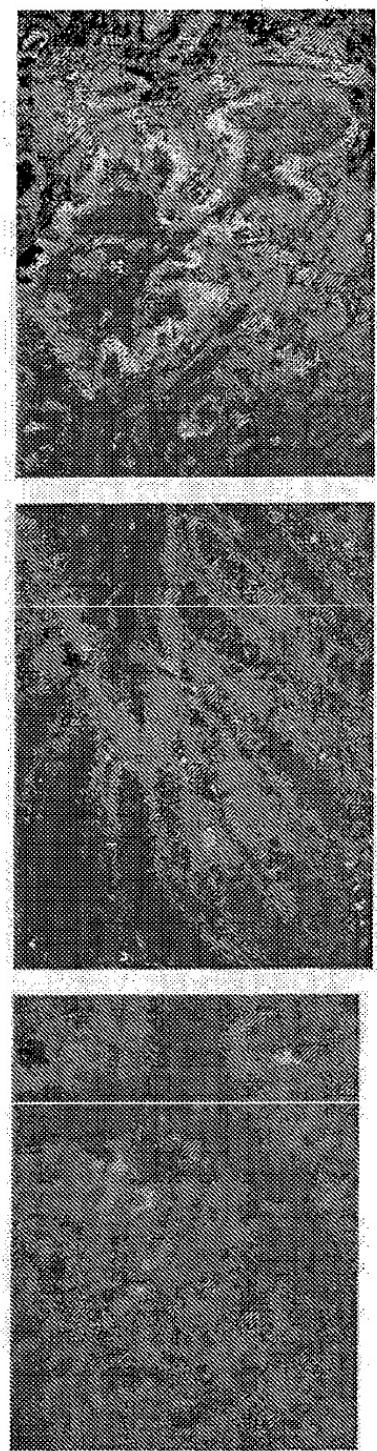


FIG. 27



FIG. 28

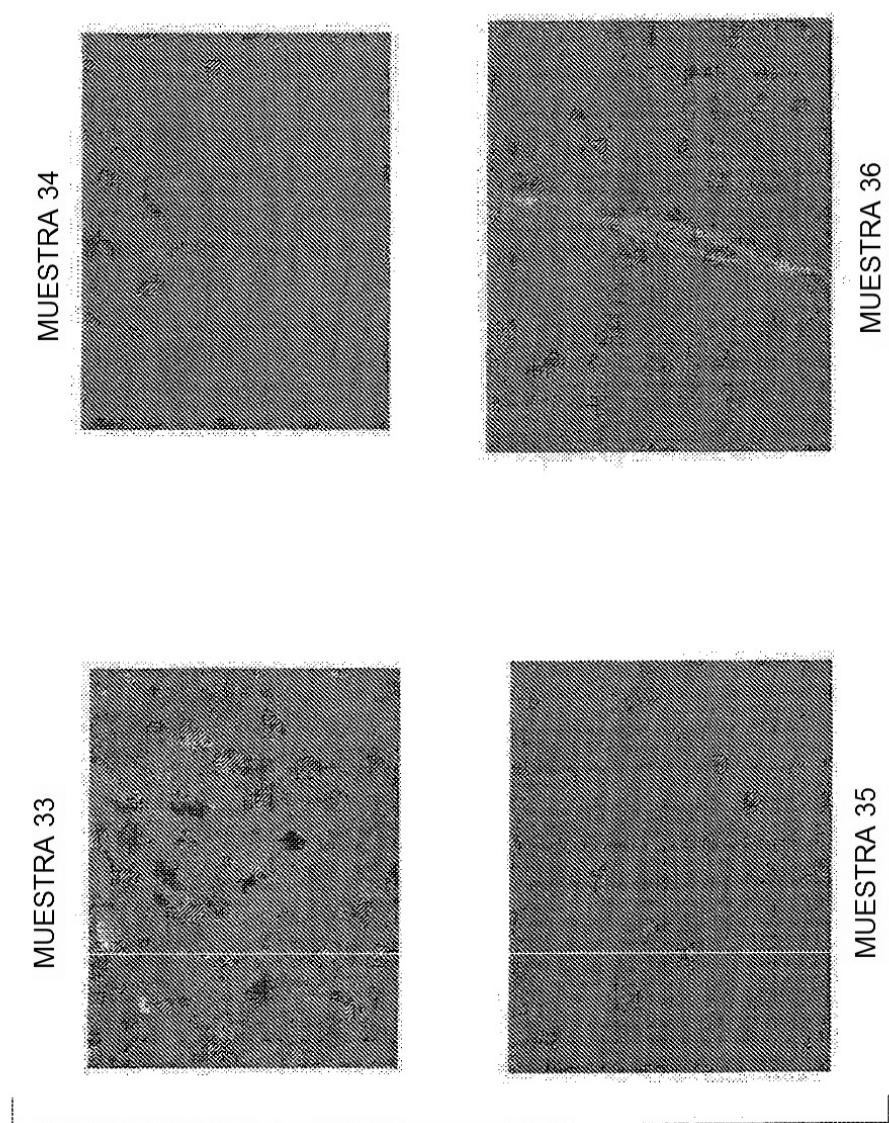
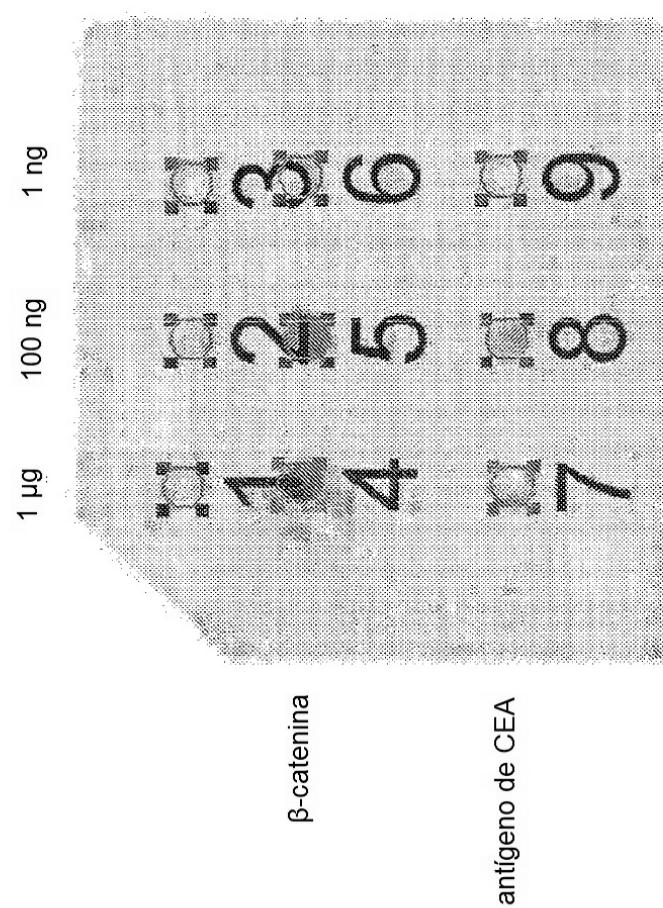


FIG. 29



MUESTRA 40

FIG. 30

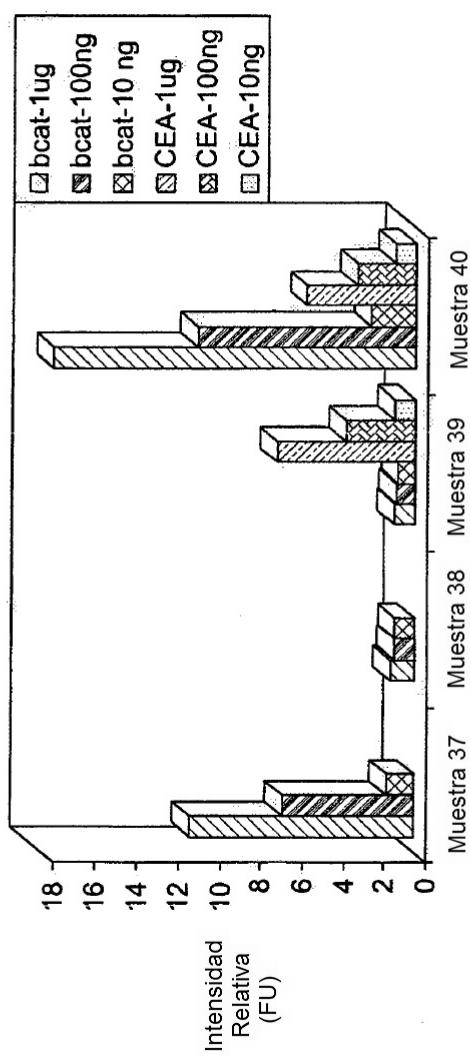


FIG. 31

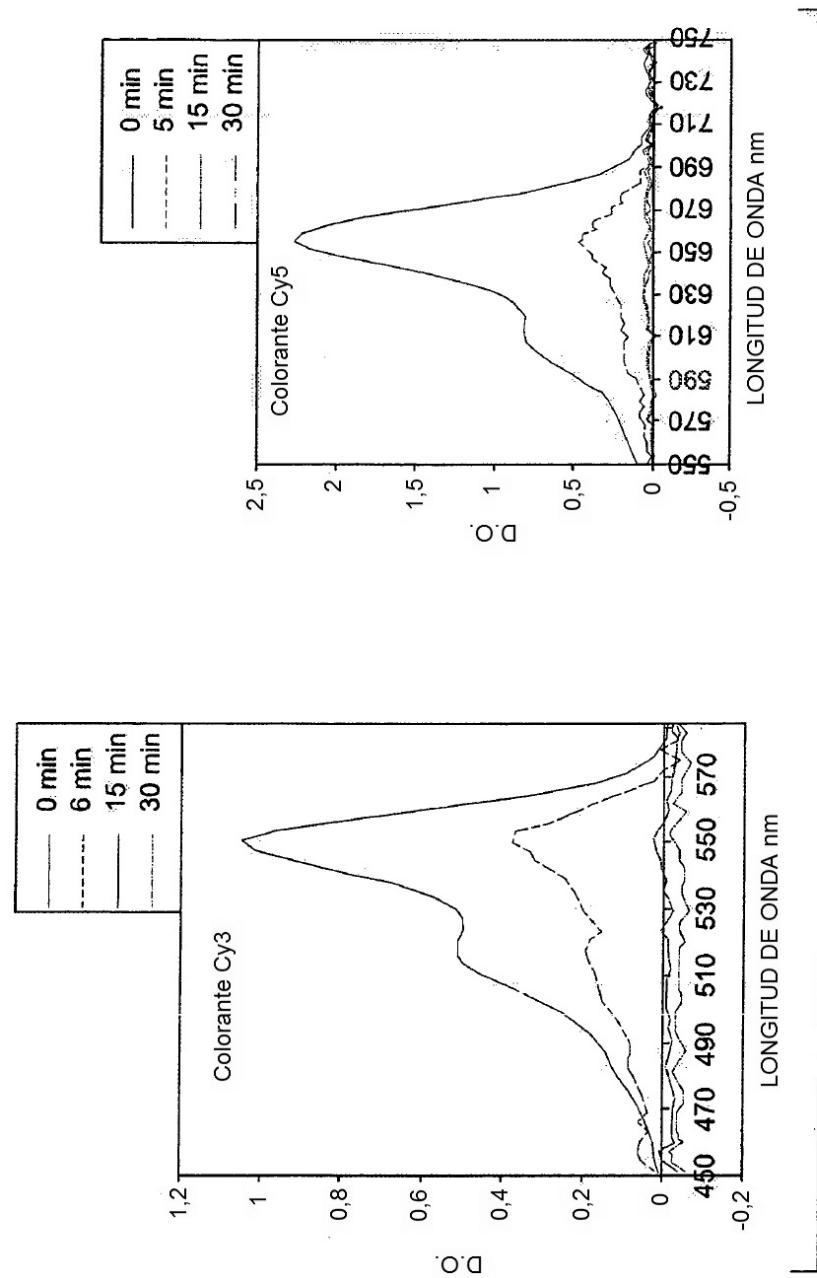


FIG. 32

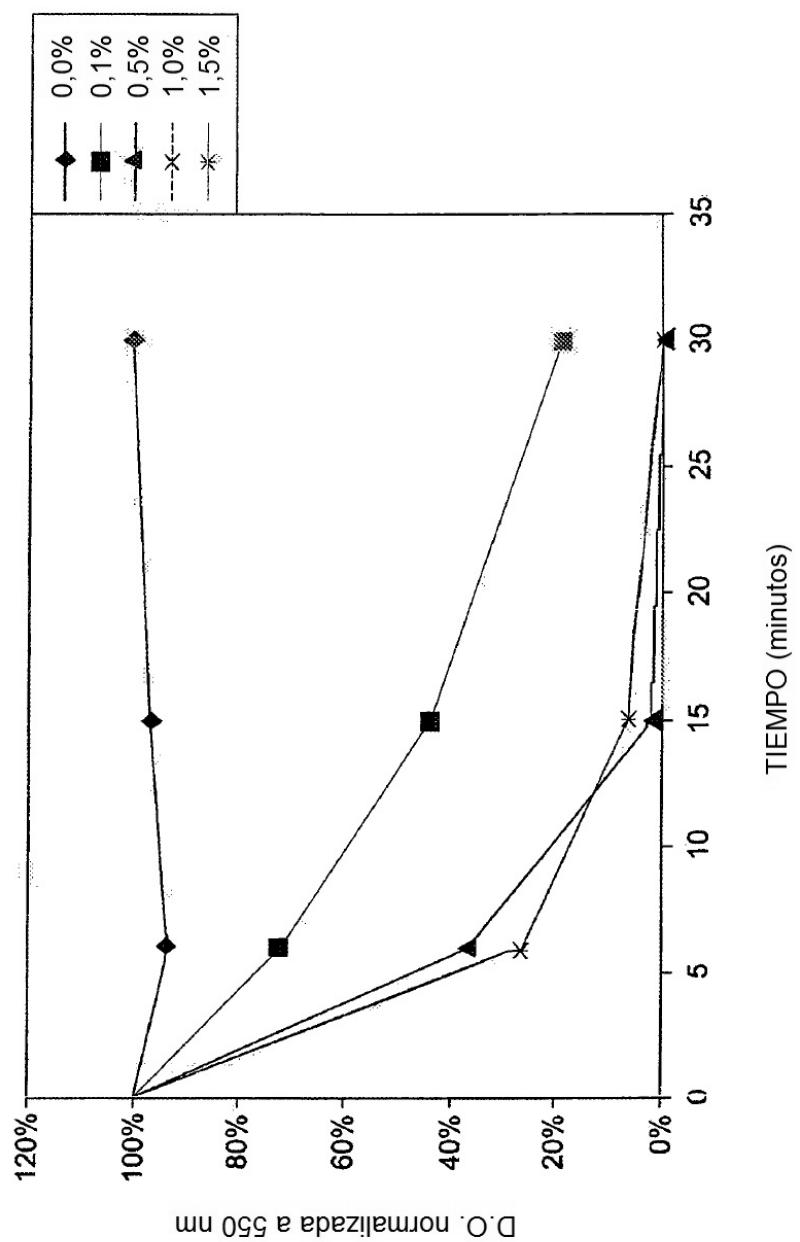


FIG. 33

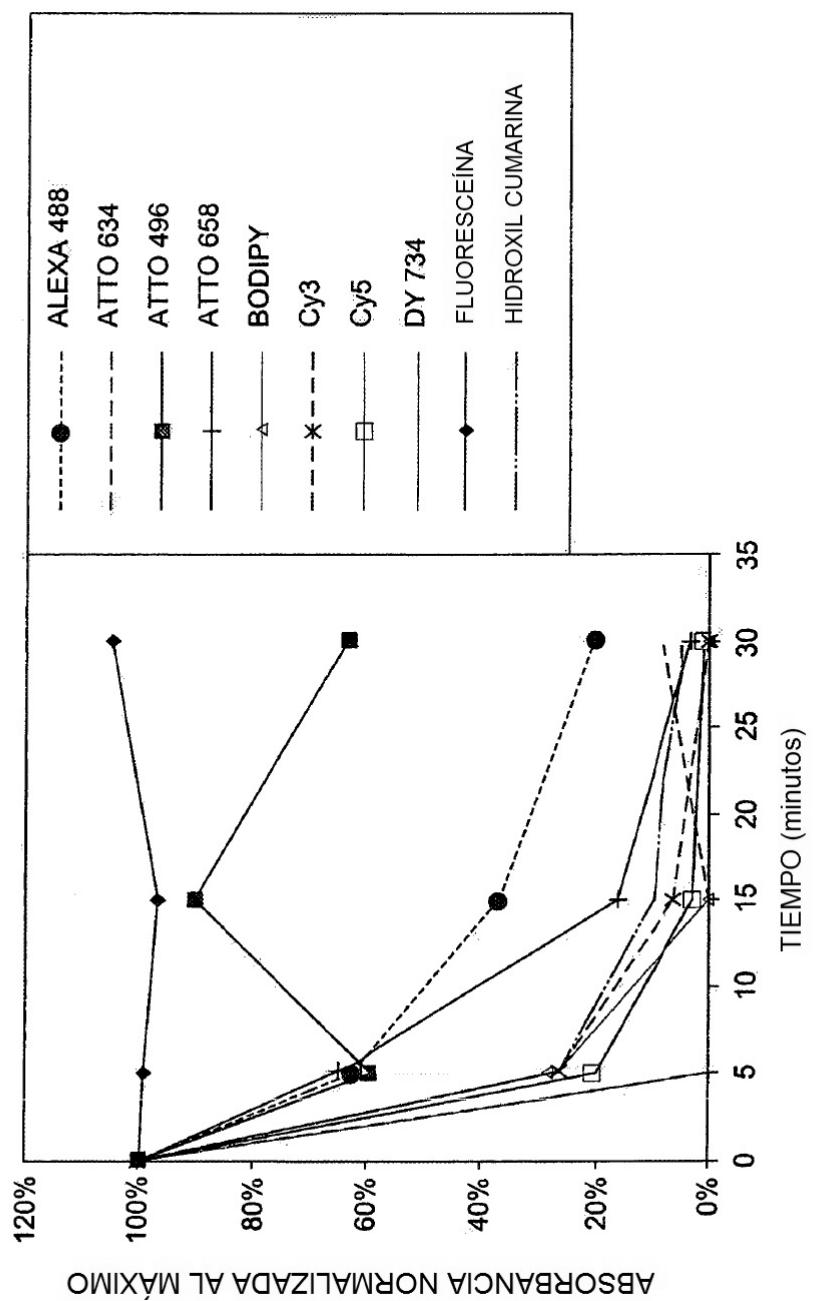


FIG. 34

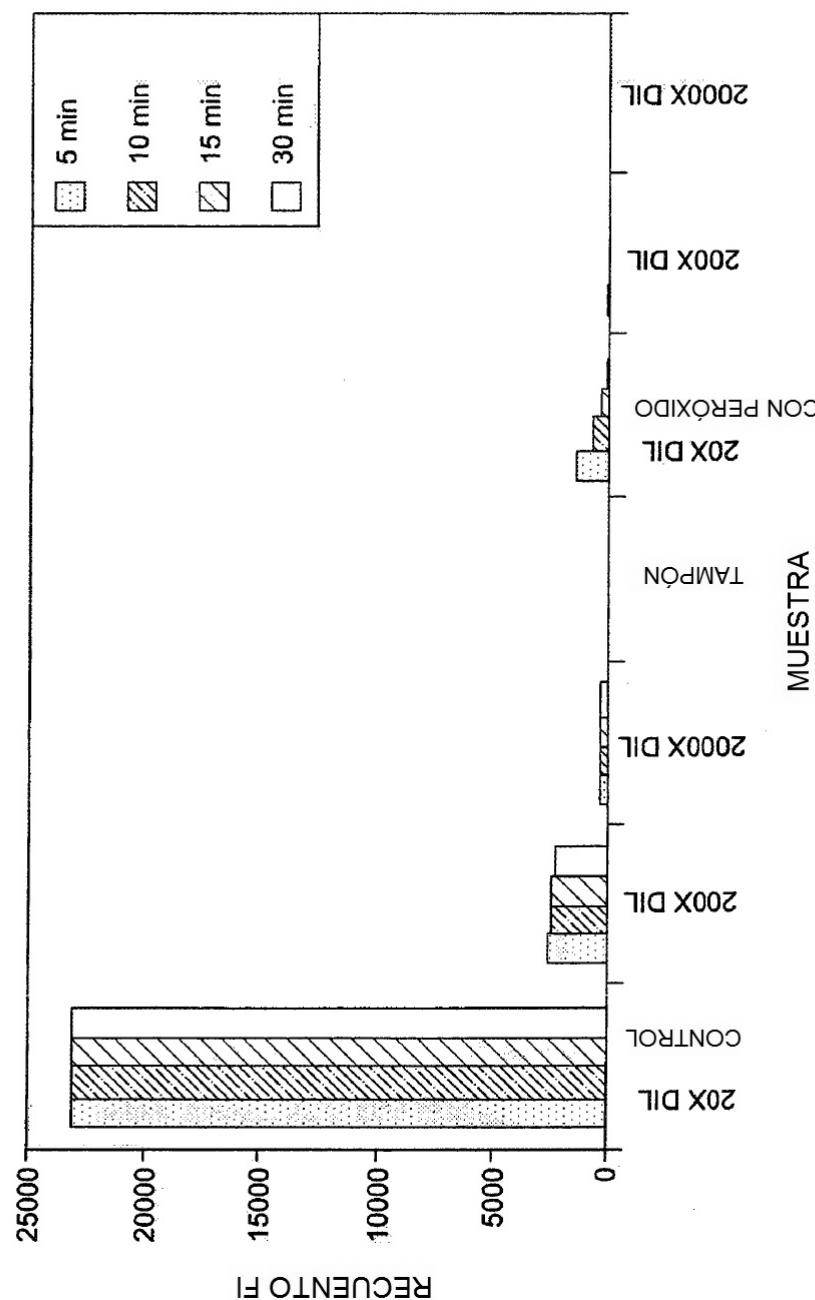


FIG. 35

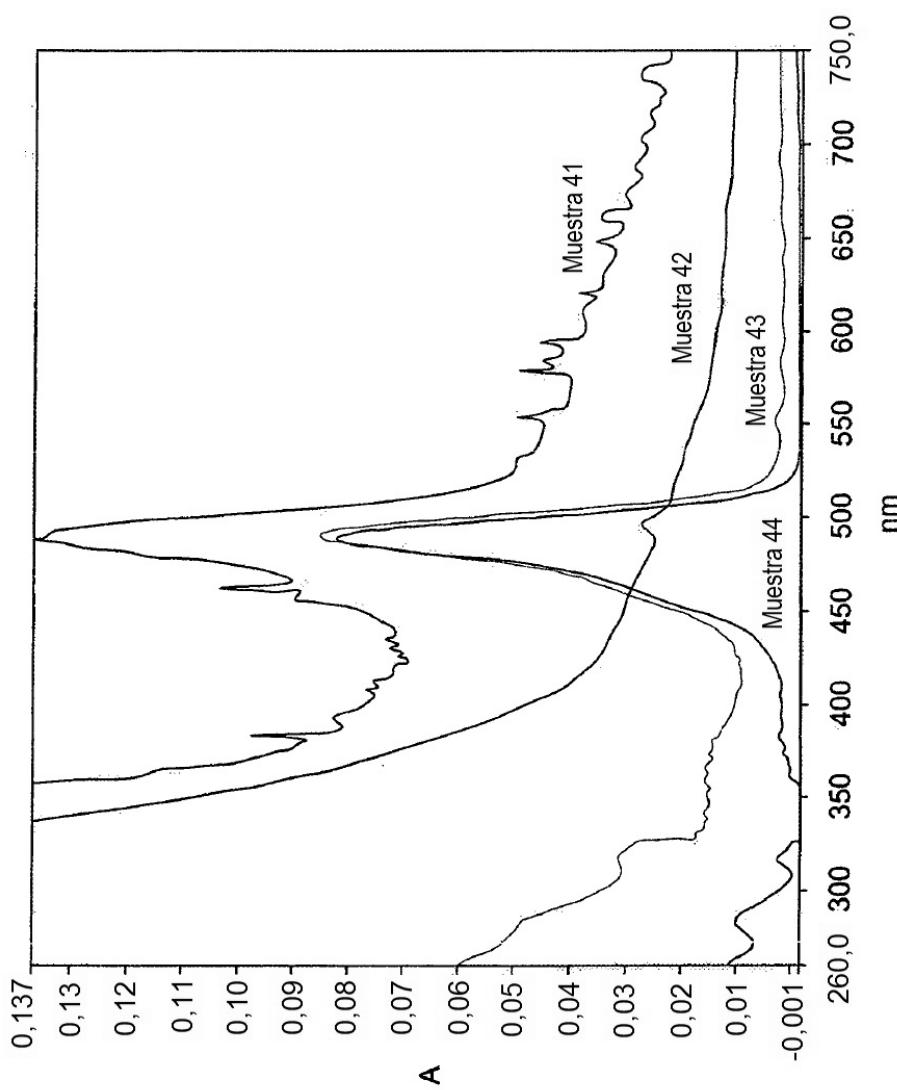


FIG. 36