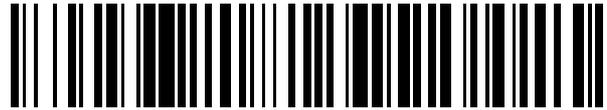


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 300**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2013 PCT/US2013/059829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013 E 13789633 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2972227**

54 Título: **Microscopía mejorada digitalmente para histología multiplexada**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361778093 P

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

05.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MORRISON, LARRY y
DIETZ, LOU**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 804 300 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

Microscopía mejorada digitalmente para histología multiplexada

5 CAMPO DE TECNOLOGÍA

La presente divulgación se refiere a microscopía con contraste mejorado para histología. En particular, la presente tecnología se refiere a la microscopía y la mejora digital, la reclasificación del color y/o el procesamiento digital de imágenes/vídeo de especímenes.

10

ANTECEDENTES

La inmunohistoquímica (IHQ) se refiere, en general, al procedimiento de detección, localización y cuantificación de antígenos, tales como una proteína, en una muestra biológica, y al uso de restos de unión específicos, tales como anticuerpos específicos a los antígenos particulares. La hibridación *in situ* (ISH) se refiere, en general, al proceso de detección, localización y cuantificación de ácidos nucleicos. Tanto la IHC como la ISH se pueden realizar en diversas muestras biológicas, tales como tejido (por ejemplo, congelado en fresco, incluido en parafina y fijado con formol) y muestras citológicas. Tras el reconocimiento de dianas, independientemente de si las dianas son ácidos nucleicos o antígenos, el evento de reconocimiento se puede detectar mediante el uso de diversos marcadores (por ejemplo, cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, radiométricos, etc.). Por ejemplo, la ISH en tejido puede incluir la detección de un ácido nucleico mediante la aplicación de una cadena complementaria de ácido nucleico a la que está acoplada una molécula indicadora. La visualización de la molécula indicadora permite a un observador localizar secuencias específicas de ADN o ARN en una población de células heterogéneas, tal como una muestra histológica, citológica o ambiental. Las técnicas de ISH pueden incluir, por ejemplo, hibridación *in situ* con plata (SISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Puede ser difícil identificar muestras teñidas muy pequeñas. En algunas lecturas clínicas, los marcadores pueden estar cerca del límite de resolución óptica del microscopio, limitando de este modo la capacidad del usuario para resolver pequeñas diferencias de color y/o superposición de múltiples señales de hibridación. En una lectura clínica usando un microscopio, los anatomopatólogos a menudo notifican una puntuación para la muestra biológica al inspeccionar visualmente las células o los componentes celulares (por ejemplo, proteínas, lípidos, etc.) que se tiñen de diferentes colores. Desafortunadamente, puede ser difícil percibir algunos tintes y/o diferenciar entre los rasgos teñidos. Además, la percepción del color puede variar entre los anatomopatólogos. Un anatomopatólogo con una visión menos aguda puede tener dificultades para diferenciar colores, lo que puede dar como resultado una puntuación incoherente entre los anatomopatólogos.

Se pueden usar técnicas histológicas de multiplexación para evaluar una pluralidad de biomarcadores en IHC e ISH. Sin embargo, la percepción del color de un observador a menudo limita el número de cromógenos o fluoróforos que se pueden usar simultáneamente, lo que limita la multiplexación de ensayo. En la multiplexación cromogénica que usa microscopios de campo claro, puede ser difícil detectar visualmente cromógenos de diferentes colores porque los cromógenos pueden tener espectros relativamente amplios. Incluso con absorbentes de banda más estrecha, la superposición de espectros entre diferentes cromógenos puede dar como resultado manchas oscuras que proporcionan una percepción limitada del color. Las variaciones en la tinción entre especímenes pueden aumentar aún más la dificultad de diferenciar con precisión cromógenos de diferentes colores. Además, algunos colores son más difíciles de distinguir que otros. Los amarillos y los cian generalmente proporcionan menos contraste porque absorben la luz en el borde azul o rojo del espectro visual, de modo que el porcentaje de luz detectable total absorbida es relativamente pequeño en relación con, por ejemplo, un absorbente de luz verde, lo que da como resultado cromógenos amarillos y cian que exhiben un menor contraste visual en relación con los cromógenos magenta. Los absorbentes cromogénicos fuera del espectro visual se pueden usar para aumentar la multiplexación, pero no se pueden ver con un microscopio tradicional de campo claro. En la detección de fluorescencia, los marcadores fluorescentes pueden no ser igualmente detectados por diferentes observadores debido a que las emisiones de los marcadores fluorescentes están en los márgenes o fuera del espectro visual. Por lo tanto, el nivel de multiplexación de ensayo a menudo es limitado, y la multiplexación de ensayo tiene inconvenientes significativos.

El documento EP 2037255 A1 describe un procedimiento y sistema de observación de espectro. El procedimiento comprende irradiar luz al espécimen que contiene varios tipos de sustancias cuyas longitudes de onda existentes son diferentes; detectar espectros de luz emitidos desde el espécimen, donde el procedimiento de observación espectral adquiere secuencialmente datos de espectros de sustancias de las cuales la longitud de onda de excitación es larga mientras cambia una longitud de onda de la luz irradiada entre respectivas longitudes de onda de excitación de los diversos tipos de sustancias; y excluir la longitud de onda de excitación de la sustancia correspondiente a los datos de espectro a adquirir a partir de la longitud de onda de detección de cada espectro al adquirir los datos de espectro de los datos de espectro de las sustancias respectivas.

El documento WO 2009/046544 A1 describe sistemas y procedimientos para el análisis cuantitativo automatizado de muestras de patología que identifican grupos de células similares asociadas espacialmente. Las células pueden identificarse como pertenecientes a un grupo sobre la base de la ubicación espacial y los biomarcadores. Los biomarcadores pueden ser señales de hibridación *in situ* de fluorescencia multicolor. Las características de las células

en un grupo pueden combinarse para proporcionar un resultado de FISH cuantitativa que pueda compensar variaciones y artefactos tales como un corte fino que puede dar como resultado la pérdida de información debido a daños.

- 5 El documento WO 96/05693 A1 describe un sistema de formación de imágenes de vídeo multiespectral de iluminación por LED o diodo láser de color o combinación de colores de acceso aleatorio conmutable en tiempo real. El sistema comprende un sensor de matriz de imágenes fotográficas en blanco y negro, medios para adquirir una imagen de un objeto, medios de procesamiento de señales para crear una imagen de vídeo en color o con colores falsos del objeto, medios de control para controlar las formas de combinación de imágenes espectrales, intensidad, superposición de
10 imágenes y otros medios de procesamiento de imágenes y un procedimiento para crear una imagen de vídeo de acceso aleatorio en tiempo real.

SUMARIO

- 15 La presente invención se refiere a un sistema de formación de imágenes multiespectrales y a un procedimiento correspondiente para formar imágenes con contraste mejorado de un espécimen teñido con diferentes fluoróforos o cromógenos como se define en las reivindicaciones independientes 1 y 13, respectivamente. Los modos de realización preferentes de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes. Al menos algunos modos de realización son sistemas de formación de imágenes para ver directamente especímenes biológicos teñidos y proporcionar
20 imágenes y/o vídeo digitalmente mejorados de los especímenes. Los sistemas de formación de imágenes pueden incluir microscopios para ver directamente el espécimen y aparatos de formación de imágenes multiespectrales. Un usuario puede ver a través del o de los oculares del microscopio para localizar rápidamente regiones a inspeccionar y/o para localizar rasgos específicos de interés, tales como rasgos teñidos con cromógeno, rasgos teñidos con fluoróforo u otros rasgos para IHC, ISH u otras técnicas de inspección. Las imágenes y/o vídeos del espécimen se
25 pueden proporcionar en tiempo real en un dispositivo de visualización del aparato de formación de imágenes ubicado al lado del microscopio. Las imágenes y/o vídeos pueden ser mejorados digitalmente para facilitar la identificación de rasgos teñidos. Al alternar entre la visualización de campo claro (por ejemplo, visualización a través del microscopio) y visualización de imágenes/vídeo digitalmente mejorados, un usuario puede puntuar el espécimen de forma rápida y precisa. Los sistemas de formación de imágenes pueden proporcionar mejora digital, reclasificación de color,
30 imágenes/vídeo espectrales desconvolucionados y/o procesamiento digital de imagen/vídeo.

- En algunos modos de realización, una platina del microscopio se puede mover en las direcciones X, Y y Z (foco) y el aparato de formación de imágenes puede proporcionar vídeo (o imágenes a una velocidad cercana al vídeo) para
35 minimizar, limitar o eliminar sustancialmente los retardos asociados a la visualización de las imágenes y/o el vídeo. En un modo de realización, un dispositivo de captura de imágenes del sistema de formación de imágenes se puede acoplar a un microscopio compuesto. En otros modos de realización, el aparato de formación de imágenes puede incorporarse en o ser parte de un microscopio digital. El microscopio digital puede tener o no oculares para un visionado directo del espécimen biológico y un dispositivo de visualización para mostrar imágenes/vídeo digitalmente
40 mejorados.

- El sistema de formación de imágenes puede incluir uno o más dispositivos de captura de imágenes y emisores de energía, tales como fuentes de luz, fuentes infrarrojas, fuentes ultravioletas o similares. Las fuentes de luz pueden ser
45 diodos emisores de luz (LED) que se activan y desactivan por pulsos para que se correspondan con los fotogramas de formación de imágenes de modo que fotogramas sucesivos se graben con una iluminación LED diferente. Los LED pueden producir luz que corresponde a la absorbancia de cada cromógeno usado para teñir el espécimen y, en algunos modos de realización, pueden limitar la contribución de los cromógenos espectralmente vecinos. El procesamiento digital se puede usar para redefinir las características espectrales de las imágenes capturadas de modo que el observador perciba de manera óptima los rasgos de interés. Por ejemplo, la redefinición del color y/o la mejora del contraste de la iluminación de cada LED se pueden realizar para distinguir mejor visualmente cada
50 cromógeno y adaptarse a la agudeza del observador. En algunos modos de realización, el procesamiento digital oscurece áreas correspondientes a rasgos de interés y puede aclarar otras áreas. Además, los colores se pueden redefinir para mejorar aún más la identificación visual y/o automatizada de rasgos de interés. En algunos modos de realización, el aparato de formación de imágenes es un aparato de formación de imágenes sin filtro con un dispositivo de captura de imágenes que proporciona imágenes basándose en una o más longitudes de onda y/o una o más
55 bandas de onda específicas de un iluminador.

- En algunos modos de realización, el dispositivo de captura de imágenes proporciona imágenes multiespectrales. La separación espectral se puede realizar en las imágenes. Los colores de las imágenes separadas se pueden redefinir para proporcionar una separación de colores óptima. En un modo de realización, las imágenes redefinidas se pueden
60 combinar para producir imágenes compuestas en color (por ejemplo, imágenes compuestas con colores falsos). Para aumentar la capacidad de multiplexación, el dispositivo de captura de imágenes puede proporcionar sensibilidad fuera del rango del espectro visual para formar imágenes de cromógenos y/o señales de fluorescencia fuera del espectro visual. El dispositivo de captura de imágenes se puede configurar para proporcionar capacidad de reenfoque debido a, por ejemplo, aberraciones cromáticas asociadas a fuentes de energía UV y de IR cercano. En un modo de realización, se puede usar un dispositivo de foco automatizado o una platina de foco automatizado para ajustar el foco en sincronía con el iluminador. Por ejemplo, el dispositivo de foco automatizado puede incorporarse en el dispositivo
65

de captura de imágenes. De forma alternativa o adicional, una platina de foco automatizado puede ajustar el foco para emisores de luz visible, emisores de energía UV y emisores de energía IR. Los tintes fluorescentes que son lo suficientemente brillantes como para formar imágenes a velocidad de vídeo o velocidad cercana a vídeo pueden excitarse de manera selectiva y secuencial con diferentes LED pulsados, sincronizados con la grabación de imágenes.

5 Se pueden usar procedimientos de amplificación, tales como depósito de tiramida de fluoróforos, para hacer que la fluorescencia del espécimen sea lo suficientemente intensa para la formación de imágenes a velocidad de vídeo o a velocidad cercana a vídeo.

10 En algunos modos de realización, un sistema de formación de imágenes puede incluir un dispositivo de captura de imágenes acoplado a o cerca del ocular de un microscopio compuesto. En otros modos de realización, el microscopio puede ser un microscopio digital con un dispositivo de captura de imágenes integrado. Aún en otros modos de realización, el sistema de formación de imágenes se puede usar con un microscopio estereoscópico u otro tipo de microscopio usado para ver objetos muy pequeños con, por ejemplo, varios cientos de aumentos. La posición de un iluminador y del dispositivo de captura de imágenes del sistema de formación de imágenes se puede seleccionar en función de la configuración del microscopio. Los sistemas de formación de imágenes pueden incluir además un dispositivo de procesamiento en forma de un ordenador de escritorio, un ordenador portátil, una tableta electrónica o similar y puede incluir circuitos electrónicos digitales, *firmware*, *hardware*, memoria, un medio de almacenamiento informático, un programa informático, un procesador (incluido un procesador programado) o similar.

20 En algunos modos de realización adicionales, un sistema de formación de imágenes está configurado para formar imágenes de un espécimen ubicado en un portaobjetos de microscopio y comprende un aparato de formación de imágenes, una o más lentes y un dispositivo de visualización en comunicación con el aparato de formación de imágenes. El aparato de formación de imágenes incluye un emisor de energía en forma de un iluminador que tiene una pluralidad de fuentes de luz de diferentes colores que producen luz secuencialmente para iluminar secuencialmente al menos una parte del espécimen. El aparato de formación de imágenes también incluye un dispositivo de captura de imágenes situado para capturar una pluralidad de imágenes de espécimen, cada una correspondiente al espécimen expuesto a la luz de una fuente de luz respectiva de las fuentes de luz. Un dispositivo de procesamiento está configurado para producir datos de imagen en color con contraste mejorado basándose en las imágenes de espécimen. El dispositivo de visualización se puede configurar para mostrar el espécimen basándose en los datos de imagen en color con contraste mejorado. El dispositivo de visualización puede mostrar imágenes con colores falsos o vídeo con colores falsos del espécimen. También se pueden mostrar otros tipos de salida de datos (por ejemplo, información del paciente, información de tinción, informes, etc.). En algunos modos de realización, el dispositivo de visualización muestra una salida en color con contraste mejorado (por ejemplo, imagen/vídeo compuesto con colores falsos) y/o salida espectral separada que proporciona un mayor contraste de color entre estructuras celulares diana que el contraste de color natural proporcionado por la visualización en campo claro. El dispositivo de procesamiento puede proporcionar los datos de color con contraste mejorado de modo que la salida de color con contraste mejorado sea vídeo del espécimen mostrado a una velocidad de fotogramas igual a o mayor que una velocidad de fotogramas deseada (por ejemplo, 2 fotogramas/segundo).

40 El emisor de energía, en algunos modos de realización, está configurado para producir emisiones de energía con longitudes de onda medias que son diferentes entre sí. En un modo de realización, el número total de diferentes emisiones de energía (es decir, emisiones de energía con diferentes longitudes de onda medias) está en un intervalo de aproximadamente 4 a 8, por ejemplo. El emisor de energía puede incluir, sin limitación, cuatro fuentes de luz de diferentes longitudes de onda medias, cinco fuentes de luz de diferentes longitudes de onda medias, o diez o más fuentes de luz de diferentes longitudes de onda medias. El número de emisiones de energía, las características de las emisiones (por ejemplo, longitudes de onda medias) y/o el número de fuentes de luz se pueden seleccionar en base al número de rasgos de interés, tipos de marcadores, etc.

50 El sistema de formación de imágenes, en algunos modos de realización, incluye además un microscopio que comprende un dispositivo de soporte que porta el portaobjetos de microscopio y uno o más oculares a través de los cuales un usuario es capaz de ver el espécimen mientras el dispositivo de visualización muestra la salida de color con contraste mejorado del espécimen. El iluminador puede iluminar la parte del espécimen dentro del campo del microscopio. Cuando se usa(n) el/los ocular(es), el iluminador puede generar luz blanca para la apariencia normal del espécimen. Mientras que el iluminador emite luz blanca, la salida de color con contraste mejorado puede no actualizarse en tiempo real.

60 En algunos modos de realización adicionales, un sistema comprende un aparato de formación de imágenes, una o más lentes y medios de visualización en comunicación con el aparato de formación de imágenes. El aparato de formación de imágenes incluye medios para emitir energía secuencialmente y medios para capturar una imagen/vídeo. En algunos modos de realización, los medios de captura están situados para capturar imágenes de espécimen, cada una correspondiente al espécimen que está siendo expuesto a energía. En algunos modos de realización, los medios de captura pueden incluir una o más cámaras situadas en un lado frontal y/o en un lado posterior del portaobjetos de microscopio que porta el espécimen biológico. Los medios de visualización, en algunos modos de realización, incluyen un monitor o una pantalla. En algunos modos de realización, los medios para emitir energía secuencialmente incluyen múltiples emisores de energía. Cada emisor de energía puede incluir uno o más emisores de energía IR, emisores de energía UV, emisores de luz LED, combinaciones de los mismos u otros tipos de dispositivos emisores de energía. El

sistema de formación de imágenes puede incluir además medios para producir datos de imagen en color con contraste mejorado en base a las imágenes de espécimen capturadas por los medios de captura. Los medios de visualización muestran el espécimen basándose en los datos de imagen en color con contraste mejorado.

5 Aún en otros modos de realización, un sistema de formación de imágenes basado en ordenador para formar imágenes de un espécimen ubicado sobre un portaobjetos de microscopio comprende memoria y un procesador programable. La memoria puede almacenar una secuencia de instrucciones de programa. En algunos modos de realización, el procesador tiene circuitos configurados para ejecutar las instrucciones para hacer que el procesador programable reciba una primera imagen del espécimen expuesto a luz con una primera longitud de onda/banda de onda para interactuar con al menos un primer rasgo de interés y reciba una segunda imagen del espécimen expuesto a luz con una segunda longitud de onda/banda de onda para interactuar con al menos un segundo rasgo de interés. La segunda longitud de onda/banda de onda puede ser diferente de la primera longitud de onda/banda de onda, respectivamente. Las instrucciones también pueden hacer que el procesador genere una imagen en color del espécimen basándose en la primera y la segunda imágenes.

15 La memoria, en algunos modos de realización, almacena instrucciones de conversión ejecutables por los circuitos. Por ejemplo, las instrucciones de conversión se pueden ejecutar para convertir la primera imagen en una primera imagen con colores falsos y para convertir la segunda imagen en una segunda imagen con colores falsos. La primera y la segunda imágenes con colores falsos se pueden combinar para producir una imagen en color compuesta. Se pueden usar procedimientos de mezcla lineal, procedimientos de mezcla no lineal y/u otras técnicas de mezcla para combinar imágenes. Los rasgos de interés en la imagen compuesta pueden ser dianas (por ejemplo, ácidos nucleicos, antígenos, etc.), marcadores (por ejemplo, marcadores cromogénicos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores radiométricos, etc.) o diversos componentes o estructuras celulares. Se pueden generar imágenes con colores falsos adicionales. En algunos protocolos, se puede generar un total de 4-8 imágenes con colores falsos para producir cada imagen en color compuesta.

20 En algunos modos de realización, un procedimiento para formar imágenes de un espécimen portado por un portaobjetos de microscopio incluye capturar una primera imagen del espécimen mientras el espécimen se expone a luz con una primera longitud de onda máxima o una primera banda de onda. La primera longitud de onda máxima o la primera banda de onda corresponde a una primera longitud de onda de absorción o una primera banda de onda de absorción de primeros rasgos de interés del espécimen. Se puede capturar una segunda imagen mientras el espécimen se expone a luz con una segunda longitud de onda máxima o una segunda banda de onda. La segunda longitud de onda máxima o segunda banda de onda puede corresponder a una segunda longitud de onda de absorción o una segunda banda de onda de absorción de segundos rasgos de interés del espécimen. Se puede generar una imagen en base a la primera y la segunda imágenes. En algunos modos de realización, la imagen generada es una imagen con colores falsos (por ejemplo, una imagen compuesta) u otros tipos de imagen mejorada. El procedimiento, en algunos modos de realización, incluye convertir la primera imagen en una primera imagen con colores falsos, convertir la segunda imagen en una segunda imagen con colores falsos y combinar la primera y la segunda imágenes con colores falsos. La primera y la segunda imágenes pueden ser imágenes espectralmente discretas, tales como imágenes monocromas.

30 Aún en otro modo de realización, un procedimiento para la formación de imágenes con contraste mejorado comprende exponer secuencialmente al menos una parte de un espécimen (por ejemplo, una parte del espécimen dentro del campo de visión de un microscopio, el espécimen completo, etc.) a luz procedente de fuentes de luz. Cada fuente de luz puede proporcionar una longitud de onda media capaz de ser absorbida por rasgos de interés respectivos del espécimen. Se pueden capturar imágenes del espécimen en cada etapa de iluminación. Pueden generarse datos de imagen con colores falsos en base a las imágenes capturadas de modo que los datos con colores falsos representen una imagen con colores falsos con un contraste de color mejorado entre diferentes rasgos de interés del espécimen.

45 En algunos modos de realización, un sistema de formación de imágenes puede capturar imágenes de un espécimen portado por un portaobjetos de microscopio. Durante el procesamiento de captura de imágenes, el espécimen puede exponerse a energía de modo que las características de los rasgos de interés del espécimen varían entre las imágenes. Las imágenes pueden procesarse digitalmente y combinarse para producir una imagen para su visionado. En un modo de realización, las imágenes capturadas pueden convertirse en imágenes con colores falsos y combinarse para proporcionar una imagen compuesta con colores falsos. En un modo de realización, se puede usar un clasificador para determinar el número y los tipos de tintes aplicados al espécimen. Las imágenes se pueden procesar en base a la información del clasificador.

50 Los anteriores y otros objetivos, rasgos y ventajas de modos de realización de la materia objeto divulgada en el presente documento serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 La FIG. 1 es una vista frontal de un sistema de formación de imágenes para formar imágenes de un espécimen ubicado en un portaobjetos de microscopio de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.

- La FIG. 2(A) muestra una imagen mejorada digitalmente de un espécimen biológico de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.
- 5 La FIG. 2(B) muestra una microfotografía de campo claro del espécimen biológico de la FIG. 2(A).
- La FIG. 3 es una vista frontal de un microscopio y de componentes de un aparato de formación de imágenes multispectrales acoplado al microscopio de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.
- 10 La FIG. 4 es un diagrama de flujo de un procedimiento para producir una imagen digital de un espécimen de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.
- Las FIGS. 5(A-E) muestran tejido humano teñido para identificar el linfoma no Hodgkin de células grandes positivo para Ki. Las FIGS. 5(A-D) son microfotografías en blanco y negro de tejido humano iluminado por LED de colores. La FIG. 5(E) es una imagen compuesta con colores falsos del tejido.
- 15 La FIG. 6 muestra una imagen de seudofluorescencia mejorada de tejido humano teñido para identificar el linfoma no Hodgkin de células grandes positivo para Ki de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.
- 20 La FIG. 7 es un gráfico de longitud de onda frente a absorción para diversos tintes.
- La FIG. 8 ilustra un sistema informático para analizar especímenes de tejido de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.
- 25 La FIG. 9 es un diagrama de flujo para detectar una diana de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada.
- Las FIG. 10(A-B) son diagramas esquemáticos de dos conjugados de señalización. La FIG. 10(A) ilustra un conjugado de señalización que comprende un resto reactivo latente y un resto cromóforo. La FIG. 10(B) ilustra un conjugado de señalización alternativo que comprende además un conector.
- 30 Las FIG. 11(A-F) son diagramas esquemáticos que ilustran una forma de detectar una diana en una muestra. La FIG. 11(A) muestra una sonda de detección que se une a la diana. La FIG. 11(B) muestra un conjugado de marcaje que se une a la sonda de detección. La FIG. 11(C) muestra un conjugado de señalización que se deposita enzimáticamente sobre la muestra. La FIG. 11(D) muestra un modo de realización alternativo en el que se usa una sonda de detección basada en anticuerpo para detectar una diana diferente. La FIG. 11(E) muestra un enfoque para detectar una diana usando un conjugado de amplificación. La FIG. 11(F) muestra que el conjugado de amplificación se unió a la muestra y se marcó con un conjugado de marcaje secundario.
- 35 Las FIGS. 12(A-B) son diagramas esquemáticos que ilustran (A) una representación en sección transversal de la distribución de conjugados de marcaje proximales a la diana (T) y (B), un gráfico que representa la relación entre potencia de radiación incidente (P_0) a través de la muestra mostrada en (A) y la potencia de radiación transmitida (P) a través de la muestra, donde el eje y representa la potencia de radiación y el eje x representa la distancia lineal a través de la muestra.
- 40 Las FIGS. 13(A-B) son esquemas que muestran las diferencias entre señales obtenidas con cromógenos y señales obtenidas con fluoróforos. La FIG. 13(A) ilustra la detección de un cromógeno en el que se detecta la luz transmitida. La FIG. 13(B) ilustra la detección de un fluoróforo en el que se detecta la luz emitida.
- 45 Las FIGS. 14(A-B) son imágenes que ilustran las características de color analizadas en el presente documento. La FIG. 14(A) es una rueda de colores que representa la relación entre un color observado, y la FIG. 14(B) es una imagen de la radiación absorbida para conjugados de señalización.
- 50 La FIG. 15(A) es un gráfico que ilustra el espectro de absorción de un conjugado de 5-TAMRA-tiramida, y la FIG. 15(B) es una microfotografía que ilustra una muestra biológica que tiene dianas detectadas por un conjugado de 5-TAMRA-tiramida.
- 55 La FIG. 16(A) es una microfotografía de una tinción doble de dos sondas génicas en una sección de tejido pulmonar que analiza los reordenamientos de ALK asociados a cáncer de pulmón no microcítico, y la FIG. 16(B) es un espectro de UV-Vis de Fast Red y Fast Blue en soluciones de acetato de etilo, así como de las trazas obtenidas de muestras de tejido.
- 60 Las FIGS. 17(A) y 17(B) son gráficos de longitudes de onda frente a absorbancia e ilustran los dos conjuntos de trazas. La FIG. 17(A) ilustra las trazas obtenidas de muestras de tejido, mientras que la FIG. 17(B) ilustra trazas obtenidas a partir de soluciones de acetato de etilo de Fast Red y Fast Blue.
- 65

Las FIGS. 18(A-B) son imágenes y un esquema que ilustran la diferencia entre una detección cromogénica doble de ISH, donde la FIG. 18(A) muestra un protocolo de detección combinado SISH/Red y la FIG. 18(B) muestra un conjugado de señalización púrpura y amarillo como se describe en el presente documento. La señal producida al combinar estos dos cromógenos se detecta como un tercer color único.

Las FIGS. 19(A-B) son microfotografías que muestran dos ejemplos de depósito proximal de dos colores para crear un tercer color visualmente diferenciado.

Las FIGS. 20(A-C) son microfotografías que muestran el uso de iluminación LED para separar la señal de una tinción cromogénica doble. La FIG. 20(A) muestra iluminación con luz blanca, la FIG. 20(B) muestra iluminación con luz verde y la FIG. 20(C) muestra iluminación con luz roja.

Las FIG. 21(A-B) son microfotografías que muestran, en la FIG. 21(A), un portaobjetos de control al que no se añadió BSA-BF y, en la FIG. 21(B), un portaobjetos en el que se había añadido BSA-BF a la muestra.

Las FIGS. 22(A-B) son microfotografías que muestran una muestra teñida con un conjugado de señalización, la FIG. 22(A) sin potenciación de tirosina y la FIG. 22(B) con potenciación de tirosina.

Las FIG. 23(A-B) son microfotografías que muestran una IHC de HER2 (4B5) en xenoinjertos Calu3 teñidos con dos conjugados de señalización diferentes.

La FIG. 24 ilustra espectros de absorbancia de dos conjugados de señalización en solución y usados para teñir las muestras mostradas en las FIG. 23(A-B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

Como se usa en el presente documento, los términos en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. El término "incluye" se define de forma inclusiva, de modo que "incluye A o B" significa que incluye A, B o A y B. Además, también se entiende que todos los tamaños de nucleótidos o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados.

En caso de conflicto con la divulgación de publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

En el presente documento se divulgan una o más fórmulas químicas genéricas. Para las fórmulas generales proporcionadas en el presente documento, si no se indica un sustituyente, un experto en la técnica apreciará que el sustituyente es hidrógeno. Un enlace que no se conecta a un átomo, sino que se muestra, por ejemplo, extendiéndose al interior de un sistema de anillo, indica que la posición de dicho sustituyente es variable. Una línea curva trazada a través de un enlace indica que alguna estructura adicional está unida a esa posición, típicamente un conector o el grupo o resto funcional usado para unir dos restos (por ejemplo, un cromóforo y una tiramida o derivado de tiramida). Además, si no se indica una estereoquímica para los compuestos que tienen uno o más centros quirales, se incluyen todos los enantiómeros y diastereómeros. De forma similar, para una enumeración de grupos alifáticos o alquilo, se incluyen todos los isómeros estructurales de los mismos. A menos que se indique lo contrario, los grupos R (por ejemplo, R1-R24) en las fórmulas generales que figuran a continuación se seleccionan independientemente de: hidrógeno; acilo; aldehído; alcoxi; alifático, en particular alifático inferior (por ejemplo, alquilo C1-10, alquileno C1-10, alquino C1-10); alifático sustituido; heteroalifático (por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo); alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX3 donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, ya sea en la cadena o unido al mismo); oxima; éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=); alcoholes (es decir,

hidroxilo alifático o alquilo, en particular hidroxilo de alquilo inferior); amido; amino; aminoácido; arilo; alquilarilo, tal como bencilo; carbohidratos; monosacáridos, tales como glucosa y fructosa; disacáridos, tales como sacarosa y lactosa; oligosacáridos; polisacáridos; carbonilo; carboxilo; carboxilato (incluyendo sus sales, tales como carboxilatos de metales del Grupo I o de iones de amonio); cíclico; ciano (-CN); éster, tal como éster alquílico; éter; exometileno; halógeno; heteroarilo; heterocíclico; hidroxilo; hidroxilamina; ceto, tal como cetonas alifáticas; nitro; sulfhidrilo; sulfonilo; sulfóxido; exometileno; y combinaciones de los mismos.

"Absorbancia" o **"Absorción"** se refiere a la relación logarítmica de la radiación incidente sobre un material (P_0), respecto a la radiación transmitida a través de un material (P). La absorbancia A de un material varía con la longitud del recorrido de la luz a través del mismo (z) de acuerdo con la ecuación 1.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -(\log T) = \epsilon lc$$

P_0 y P son las intensidades de luz incidente y transmitida, T es la transmisión óptica, y ϵ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l es la longitud o profundidad del área iluminada (cm), y c es la concentración de la molécula absorbente.

"Amplificación" se refiere al acto o resultado de hacer que una señal sea más fuerte.

"Conjugado de amplificación" se refiere a una molécula que comprende una especie reactiva latente acoplada a un hapteno, tal como, por ejemplo, un conjugado hapteno-tiramida. El conjugado de amplificación puede servir como un miembro de un par de unión específico, tal como, por ejemplo, un anticuerpo antihapteno que se une específicamente al hapteno. El aspecto de amplificación se refiere a la especie reactiva latente que se convierte enzimáticamente en una especie reactiva de modo que una sola enzima puede generar una multiplicidad de especies reactivas. Se hace referencia a la patente de EE. UU. n.º 7.695.929.

"Anticuerpo", ocasionalmente abreviado "Ab", se refiere a inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina (incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado (por ejemplo, en mamíferos como humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una constante de unión por la molécula de interés que es al menos $10^3 M^{-1}$ mayor, al menos $10^4 M^{-1}$ mayor o al menos $10^5 M^{-1}$ mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica. Un anticuerpo se refiere además a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se pueden componer de una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas la región variable pesada (VH) y la región variable ligera (VL). Conjuntamente, la región VH y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo. El término anticuerpo también incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y partes de las mismas bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos [tales como fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab como se conocen en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos $F(ab')_2$, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como se conocen en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.015.695, 6.005.079, 5.874.541, 5.840.526, 5.800.988 y 5.759.808). Anticuerpo puede incluir un anticuerpo monoclonal que se caracteriza porque es producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de las cadenas ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

"Antígeno" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que se puede unir específicamente mediante los productos de inmunidad humoral o celular específica, tal como una molécula de anticuerpo o receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluidos, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, azúcares (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

"Cromóforo" se refiere a una molécula o una parte de una molécula responsable de su color. El color surge cuando una molécula absorbe ciertas longitudes de onda de la luz visible y transmite o refleja otras. Una molécula que tiene una diferencia de energía entre dos orbitales moleculares diferentes que están dentro del intervalo del espectro visible puede absorber la luz visible y, por lo tanto, caracterizarse adecuadamente como un cromóforo. La luz visible incidente en un cromóforo puede ser absorbida, excitando así un electrón desde un orbital molecular en el estado fundamental a un orbital molecular en estado excitado.

"Conjugar", "ensamblar", "unir", "acoplar" o "enlazar" se usan como sinónimos para referirse a unir un primer

átomo o molécula a otro átomo o molécula para formar una molécula más grande directa o indirectamente.

5 **“Conjugado”** se refiere a dos o más moléculas que están unidas covalentemente en una construcción más grande. En algunos modos de realización, un conjugado incluye una o más biomoléculas (tales como péptidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, azúcares, polisacáridos, lípidos, glicoproteínas y lipoproteínas) unidas covalentemente a otra u otras moléculas diferentes, tales como otra u otras biomoléculas. En otros modos de realización, un conjugado incluye una o más moléculas de unión específica (tales como anticuerpos y secuencias de ácido nucleico) unidas covalentemente a uno o más marcadores detectables (haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos). En otros modos de realización, un conjugado incluye uno o más restos reactivos latentes unidos covalentemente a marcadores detectables (haptenos, restos cromóforos, restos fluorescentes).

10 **“DABSYL”** se refiere a 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida, un cromóforo amarillo-naranja.

15 **“Derivado”** se refiere a un compuesto que se deriva de un compuesto similar al reemplazar un átomo o grupo de átomos por otro átomo o grupo de átomos.

20 **“Epítopo”** se refiere a un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítopo antigénico particular.

25 **“Potenci(ar/ador/ación)”**. Un potenciador o reactivo potenciador es cualquier compuesto o cualquier combinación de compuestos suficiente para aumentar la actividad catalítica de una enzima, en comparación con la actividad enzimática sin dicho(s) compuesto(s). El(los) potenciador(es) o reactivo(s) potenciador(es) también se puede(n) definir como un compuesto o combinación de compuestos que aumentan o aceleran la velocidad de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. Potenci(ar/ación) es un proceso mediante el cual la actividad catalítica de una enzima se incrementa mediante un potenciador, en comparación con un proceso que no incluye dicho potenciador. Potenci(ar/ación) también se puede definir como el aumento o la aceleración de la velocidad de unión de un conjugado activado a un sitio receptor. La potenciación se puede medir visualmente, por ejemplo, mediante puntuación de un anatomopatólogo. En modos de realización particulares, las puntuaciones varían de más de 0 a más de 4, y un número más alto indica una mejor detección visual. Más típicamente, las puntuaciones varían de más de 0 a aproximadamente 4++, tal como 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 3,75, 4, 4+ y 4++. Además, la potenciación se puede medir mediante la determinación de la $V_{máx}$. aparente de una enzima. En modos de realización particulares, el término abarca valores de $V_{máx}$. aparente (medidos como densidad óptica/minuto) que varían de más de 0 mOD/min a aproximadamente 400 mOD/min, tal como aproximadamente 15 mOD/min, 18 mOD/min, aproximadamente 20 mOD/min, aproximadamente 40 mOD/min, aproximadamente 60 mOD/min, aproximadamente 80 mOD/min, aproximadamente 100 mOD/min, aproximadamente 120 mOD/min, aproximadamente 140 mOD/min, aproximadamente 160 mOD/min, aproximadamente 200 mOD/min, aproximadamente 250 mOD/min, aproximadamente 300 mOD/min, aproximadamente 350 mOD/min y aproximadamente 400 mOD/min. Más típicamente, la $V_{máx}$. varía de más de 0 mOD/min a aproximadamente 160 mOD/min, tal como aproximadamente 20 mOD/min, aproximadamente 40 mOD/min, aproximadamente 60 mOD/min, aproximadamente 80 mOD/min, aproximadamente 100 mOD/min, aproximadamente 120 mOD/min, aproximadamente 140 mOD/min y aproximadamente 160 mOD/min. Además, se puede producir una potenciación usando cualquier concentración de un potenciador mayor que 0 mM. Se hace referencia a la publicación de patente de EE.UU. n.º 2012/0171668, que divulga potenciadores útiles dentro de la presente divulgación.

45 **“Grupo funcional”** se refiere a un grupo específico de átomos dentro de una molécula que es responsable de las reacciones químicas características de la molécula. Grupos funcionales ejemplares incluyen, sin limitación, alcano, alqueno, alquino, areno, halo (fluoro, cloro, bromo, yodo), epóxido, hidroxilo, carbonilo (cetona), aldehído, éster de carbonato, carboxilato, éter, éster, peroxi, hidropoxi, carboxamida, amina (primaria, secundaria, terciaria), amonio, imida, azida, cianato, isocianato, tiocianato, nitrato, nitrito, nitrilo, nitroalcano, nitroso, piridilo, fosfato, sulfonilo, sulfuro, tior (sulfhidrilo) y disulfuro.

50 **“AMA”** se refiere a la anchura total de un pico de absorbancia a la mitad de la absorbancia máxima.

55 **“Hapteno”** se refiere a una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica por sí misma.

60 **“Conector”** se refiere a una molécula o grupo de átomos colocados entre dos restos. Por ejemplo, un conjugado de señalización puede incluir un conector químico entre el resto cromóforo y un resto reactivo latente. Típicamente, los conectores son bifuncionales, es decir, el conector incluye un grupo funcional en cada extremo, donde los grupos funcionales se usan para acoplar el conector a los dos restos. Los dos grupos funcionales pueden ser iguales, es decir, un conector homobifuncional, o diferentes, es decir, un conector heterobifuncional.

65 **“MG”** se refiere al verde malaquita.

“Resto” se refiere a un fragmento de una molécula, o una parte de un conjugado.

“**Molécula de interés**” o “**diana**” se refiere a una molécula para la cual se debe determinar la presencia, ubicación y/o concentración. Ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácidos nucleicos.

5 “**Multiplex(ación/ado/ar)**” se refiere a la detección de múltiples dianas en una muestra de forma simultánea, de forma sustancialmente simultánea o de forma secuencial. La multiplexación puede incluir identificar y/o cuantificar múltiples ácidos nucleicos distintos (por ejemplo, ADN, ARN, mARN, miARN) y polipéptidos (por ejemplo, proteínas) tanto individualmente como en cualquiera y en todas las combinaciones.

10 “**Proximal**” se refiere a estar situado en o cerca del punto de referencia. Como se usa en el presente documento, proximal significa hasta una distancia de aproximadamente 5000 nm, hasta una distancia de aproximadamente 2500 nm, hasta una distancia de aproximadamente 1000 nm, hasta una distancia de aproximadamente 500 nm, hasta una distancia de aproximadamente 250 nm, hasta una distancia de aproximadamente 100 nm, hasta una distancia de aproximadamente 50 nm, hasta una distancia de aproximadamente 10 nm o hasta una distancia de aproximadamente 5 nm del punto de referencia.

15 “**Grupos reactivos**” se refiere a una variedad de grupos adecuados para acoplar una primera unidad a una segunda unidad como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el grupo reactivo podría ser un grupo reactivo de amina, tal como un isotiocianato, un isocianato, una acida de acilo, un éster de NHS, un cloruro de ácido, tal como cloruro de sulfonilo, aldehídos y glioxales, epóxidos y oxiranos, carbonatos, agentes de arilación, imidoésteres, carbodiimidas, anhídridos y combinaciones de los mismos. Grupos funcionales reactivos de tiol adecuados incluyen haluros de haloacetilo y de alquilo, maleimidas, aciridinas, derivados de acrilóilo, agentes de arilación, reactivos de intercambio tiol-disulfuro, tales como disulfuros de piridilo, TNB-tiol y reductores de disulfuro, y combinaciones de los mismos. Grupos funcionales reactivos de carboxilato adecuados incluyen diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, compuestos de carbonildiimidazol y carbodiimidas. Grupos funcionales reactivos de hidroxilo adecuados incluyen epóxidos y oxiranos, carbonildiimidazol, N,N'-disuccinimidil carbonatos o N-hidroxisuccinimidil cloroformatos, compuestos oxidantes de peryodato, oxidación enzimática, alquil halógenos e isocianatos. Grupos funcionales reactivos de aldehído y cetona incluyen hidracinas, bases de Schiff, productos de aminación reductora, productos de condensación de Mannich y combinaciones de los mismos. Compuestos reactivos de hidrógeno activo incluyen derivados de diazonio, productos de condensación de Mannich, productos de reacción de yodación y combinaciones de los mismos. Grupos funcionales químicos fotorreactivos incluyen arilacidas, arilacidas halogenadas, benzofenonas, compuestos diazoicos, derivados de diacirina y combinaciones de los mismos.

35 “**Rhod**” se refiere a Rodamina, una clase estructural de cromóforos que difieren en sus diversos sustituyentes. Además, el compuesto tetrametilrodamina a menudo se denomina “rodamina”.

40 “**Muestra**” se refiere a un espécimen biológico que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína o combinaciones de los mismos, obtenida de un sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, sangre periférica, orina, saliva, biopsia de tejido, espécimen quirúrgico, muestras de amniocentesis y material de necropsia.

45 “**Resto de unión específica**” se refiere a un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan porque se unen entre sí para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, 10^4 M^{-1} mayor o 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión de cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas en una muestra biológica). Ejemplos particulares de restos de unión específica incluyen proteínas de unión específica (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, avidinas tales como estreptavidinas y proteína A), secuencias de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos de proteínas. Los restos de unión específica también pueden incluir las moléculas (o partes de las mismas) que están unidas específicamente por dichas proteínas de unión específica. Los restos de unión específica ejemplares incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, nucleótidos, oligonucleótidos, proteínas, péptidos o aminoácidos.

50 “**TAMRA**” se refiere a carboxitetrametilrodamina, un cromóforo de rodamina rojizo (es decir, variaciones en rojo a magenta).

55 “**TMR**” se refiere a tetrametilrodamina, un cromóforo de rodamina rojizo. “**TSA**” se refiere a la amplificación de la señal de tiramida.

“**TYR**” se refiere a tiramina, tiramida y a derivados de tiramina y/o tiramida.

60 II. SISTEMAS DE FORMACIÓN DE IMÁGENES Y TÉCNICAS DE FORMACIÓN DE IMÁGENES

La FIG. 1 es una vista frontal de un sistema de formación de imágenes 100 para formar imágenes de un espécimen ubicado sobre un portaobjetos de microscopio portador de especímenes 134 de acuerdo con un modo de realización. El sistema de formación de imágenes 100 incluye un microscopio 110, un aparato de formación de imágenes multiespectrales 112 (“aparato de formación de imágenes 112”) y un dispositivo de visualización 114. El aparato de formación de imágenes 112 incluye un dispositivo de captura de imágenes 120 y un dispositivo de procesamiento 122.

El dispositivo de captura de imágenes 120 está montado en el microscopio 110 y está en comunicación con el dispositivo de procesamiento 122. Los oculares 128, 130 se pueden usar para ver directamente un espécimen biológico mientras que el dispositivo de visualización 114 muestra una salida 144 que proporciona un mayor contraste entre los rasgos de interés para IHC, ISH o similares. Los rasgos de interés pueden ser dianas (por ejemplo, ácidos nucleicos, antígenos, etc.), marcadores (por ejemplo, marcadores cromogénicos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores radiométricos, etc.) o componentes o estructuras celulares.

El microscopio 110 puede usarse para localizar convenientemente una región de interés del espécimen. Después de localizar la región de interés, el espécimen se puede analizar usando la salida 144, que puede incluir imágenes y/o vídeo, así como información de preparación de tejidos, información de tinción, información del paciente, informes o similares. El vídeo (o las imágenes que se muestran a una velocidad cercana al vídeo) puede minimizar, limitar o eliminar sustancialmente los retardos entre la visualización directa usando el microscopio 110 y la visualización no directa usando el dispositivo de visualización 114.

El aparato de formación de imágenes 112 incluye un iluminador 140 (mostrado en mediante líneas discontinuas) que ilumina secuencialmente el espécimen para separar las señales de las tinciones. Por ejemplo, el espécimen se puede iluminar con diferentes longitudes de onda, emisiones máximas y/o bandas de onda de energía electromagnética para separar las señales de una tinción doble. El dispositivo de captura de imágenes 120 puede capturar un conjunto de imágenes del espécimen. El conjunto de imágenes se envía al dispositivo de procesamiento 122 para producir la salida 144.

La FIG. 2(A) muestra una imagen mejorada digitalmente en forma de una imagen compuesta con colores falsos 144 de un espécimen humano. La FIG. 2(B) muestra una imagen de campo claro visible a través de un microscopio (por ejemplo, el microscopio 110 de la FIG. 1) del mismo tejido. El contraste de color entre diferentes puntos de color en la imagen 144 de la FIG. 2(A) es mayor que el contraste de color natural de los mismos puntos en la FIG. 2(B). Como resultado, un anatomopatólogo puede identificar rápidamente y con exactitud los puntos de la FIG. 2(A) y puede tener dificultades para diferenciar los puntos de la FIG. 2(B).

Con referencia a la FIG. 2(A), un punto rojo se resalta con un círculo (R), y un punto verde se resalta con un círculo (G). Los puntos adyacentes dentro del círculo (A) se pueden distinguir claramente entre sí como un punto rojo y un punto verde separados. Los puntos rojos y verdes superpuestos pueden aparecer azules, como se resalta con un círculo (B). Un usuario puede seleccionar los colores falsos de la imagen compuesta según, por ejemplo, las preferencias, la separación de señal deseada o similares. Por ejemplo, los puntos verdes se pueden redefinir para que sean azules y los puntos rojos se pueden redefinir para que sean amarillos.

Los puntos rojos en la FIG. 2(A) corresponden a puntos morados en la FIG. 2(B), y los puntos verdes en la FIG. 2(A) corresponden a puntos rojos en la FIG. 2(B). Con referencia ahora a la FIG. 2(B), se ha aplicado una tinción doble al tejido y puede incluir primeros restos cromogénicos y segundos restos cromogénicos. Un círculo (R) resalta un punto rojo correspondiente al primer resto cromógeno y un círculo (P) resalta un rasgo morado. Es difícil distinguir entre rasgos adyacentes dentro de un círculo (A), y es difícil identificar y caracterizar rasgos superpuestos de color rojo y morado, resaltados con un círculo (O). Por consiguiente, puede ser difícil detectar, identificar, caracterizar, contar o realizar otras tareas de manera rápida y precisa para puntuar el tejido, mientras que los puntos adyacentes dentro del círculo (A) de la FIG. 2(A) se pueden distinguir claramente entre sí, y los puntos rojos y verdes dentro de los círculos (R) y (G) de la FIG. 2(A) pueden identificarse con precisión.

La FIG. 3 es una vista frontal de los componentes del aparato de formación de imágenes y el microscopio 110. El microscopio 110 incluye lentes de objetivo 150a-d y un dispositivo de soporte 152. Las lentes de objetivo 150a-d se pueden situar a lo largo de una trayectoria óptica o eje 154 que se extiende desde el iluminador 140 (mostrado en una vista seccionada) hasta el dispositivo de captura de imágenes 120. El dispositivo de soporte 152 puede incluir, sin limitación, una platina 170, elementos de soporte (por ejemplo, pinzas) para sostener un portaobjetos de microscopio 134 situado sobre la platina 170, y un mecanismo de posicionamiento 172 para mover la platina 170. La platina 170 puede tener una abertura (no mostrada) situada generalmente a lo largo de la trayectoria óptica 154. El mecanismo de posicionamiento 172 puede incluir, sin limitación, uno o más mandos giratorios (por ejemplo, mandos giratorios de ajuste preciso, mandos giratorios de ajuste aproximado, mandos giratorios de dirección X, mandos giratorios de dirección Y, etc.), mecanismos de accionamiento, o similares. La configuración, los componentes y el funcionamiento del microscopio 110 se pueden seleccionar en base al análisis de tejido a realizar.

El iluminador 140 se puede alojar en una base 178 y se sitúa en la parte trasera del portaobjetos de microscopio 134 que porta el espécimen para producir una luz que se transmite a través de un espécimen 156. El espécimen 156 ilustrado está entre un cubreobjetos 139 y el portaobjetos 134. En algunos modos de realización, el iluminador 140 puede incluir emisores de energía en forma de fuentes de luz de colores 180a, 180b, 180c, 180d (denominadas conjuntamente "fuentes de luz 180") y un reflector 181. Cada fuente de luz 180 puede producir luz (representada por flechas) para iluminar una parte del espécimen 156 situado dentro del campo de visión del microscopio. El dispositivo de captura de imágenes 120 puede capturar secuencialmente luz de diferente color sin el uso de filtros. En algunos modos de realización, el iluminador 140 puede integrarse en el microscopio 110. En otros modos de realización, el iluminador 140 puede ser externo al microscopio 110 con luz acoplada al microscopio 110 a través de una fibra óptica

u otro tipo de guía de luz. Por ejemplo, el iluminador 140 puede ser un panel externo de LED conectado al microscopio 110 por medio de una pluralidad de fibras ópticas. Los iluminadores también pueden incluir controladores, interruptores, potenciómetros, fuentes de alimentación y otros dispositivos eléctricos.

5 Para microscopía cromogénica, la(s) longitud(es) de onda o banda(s) de onda de radiación emitida(s) desde cada una de las fuentes de luz 180 puede(n) corresponder a, o al menos superponerse con, la(s) longitud(es) de onda o banda(s) de onda de absorción asociada(s) a cromógenos. Las fuentes de luz 180 pueden tener longitudes de onda medias o máximas en diferentes regiones del espectro (incluyendo infrarrojo, visible, ultravioleta, etc.) para una mayor capacidad de multiplexación. La longitud de onda media, la longitud de onda máxima, el espectro de emisión, la
10 intensidad de la luz, la coordenada de color y/o la(s) longitud(es) de onda/banda(s) de onda de las fuentes pueden seleccionarse en base a, por ejemplo, las características de las tinciones. En algunos modos de realización, cada fuente 180 puede ser una fuente de luz espectralmente discreta con una longitud de onda media o máxima dentro de una banda de onda de absorción de uno de los cromógenos.

15 Cada fuente 180 puede incluir, sin limitación, uno o más LED (por ejemplo, LED emisores de borde, LED emisores de superficie, LED superluminiscentes o similares), diodos láser, fuentes de luz electroluminiscentes, fuentes de luz incandescentes, fuentes de luz fluorescentes de cátodo frío, fuentes de luz de polímeros orgánicos, lámparas, fuentes de luz inorgánicas u otras fuentes emisoras de luz adecuadas. Las fuentes 180 pueden ser externas o internas al microscopio 110. Las fuentes de luz 180 pueden ser fuentes de luz espectralmente estrechas que tienen una emisión
20 espectral con una segunda anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm. Se pueden generar otras emisiones espectrales.

25 En modos de realización de LED, la fuente de luz 180a puede ser un LED de luz azul que tiene una intensidad máxima con una longitud de onda en la región azul del espectro. Por ejemplo, el LED de luz azul 180a puede tener una longitud de onda máxima y/o una longitud de onda media en un intervalo de aproximadamente 430 nanómetros a aproximadamente 490 nanómetros (nm). La fuente de luz 180b puede ser un LED de luz verde que tiene una intensidad máxima con una longitud de onda en la región verde del espectro. Por ejemplo, el LED de luz verde 180b
30 puede tener una longitud de onda máxima y/o una longitud de onda media en un intervalo de aproximadamente 490-560 nm. La fuente de luz 180c puede ser un LED de luz ámbar que tiene una intensidad máxima con una longitud de onda en la región ámbar del espectro. Por ejemplo, el LED de luz ámbar 180c puede tener una longitud de onda máxima y/o una longitud de onda media en un intervalo de aproximadamente 570-610 nm. La fuente de luz 180d puede ser un LED de luz roja que tiene una intensidad máxima con una longitud de onda en la región roja del espectro. Por ejemplo, el LED de luz roja 180d puede tener una longitud de onda máxima y/o una longitud de onda media en un
35 intervalo de aproximadamente 620-800 nm. El número, el color y la ubicación de las fuentes de luz LED se pueden seleccionar en base a los biomarcadores del espécimen.

40 A menudo lleva mucho tiempo y es difícil usar múltiples filtros y lámparas de marcador único para detectar todos los marcadores en el ensayo de multiplexación. Además, los filtros, tales como el filtro de paso largo, pueden causar exudación y producir fondos de imagen relativamente brillantes. Los filtros multibanda se pueden usar para la multiplexación, pero a menudo requieren cámaras de color caras, ruedas de color caras y/o software complejo. Los filtros también pueden dar lugar a relaciones señal/ruido indeseables. Además, puede ser difícil seleccionar tintes, fuentes de iluminación y filtros apropiados, especialmente en microscopía de fluorescencia en la que la luz parásita
45 debe minimizarse mientras se maximiza la transmisión de la emisión de excitación. De forma ventajosa, las fuentes de luz LED 180 pueden ser económicas y pueden eliminar uno o más de los inconvenientes asociados a los filtros pulsando los LED 180 para producir de manera fiable un conjunto de imágenes de espécimen de alta calidad como se analiza en relación con las FIGS. 5A-D.

50 Para luz mixta, se pueden combinar emisiones de dos o más de las fuentes de luz de LED 180, lo que produce flexibilidad de procesamiento. Por ejemplo, los LED azul, verde y rojo 180a-c pueden producir una luz mixta que puede parecer blanca para producir una imagen de campo claro. Se pueden seleccionar diferentes disposiciones de las fuentes de luz 180 para lograr el campo de iluminación deseado. Las fuentes de luz LED 180 pueden ser parte de o formar un panel emisor de luz. El número, los colores y las posiciones de los LED se pueden seleccionar para lograr
55 la iluminación deseada.

En modos de realización que no son LED, el iluminador 140 puede incluir, sin limitación, uno o más láseres, fuentes de luz halógena, fuentes incandescentes u otros dispositivos capaces de emitir luz. En algunos modos de realización, cada fuente 180 puede incluir un emisor de luz (por ejemplo, una fuente de luz incandescente de lámpara halógena, etc.) que emite luz blanca y un filtro que transmite determinadas longitudes de onda o bandas de onda de la luz blanca.
60 La(s) longitud(es) de onda de excitación de la fuente, la emisión máxima o la(s) banda(s) de onda pueden coincidir con las características de la tinción. La intensidad de la luz, la secuencia de pulsos (si existe) y la forma del campo de iluminación de la fuente de luz se pueden determinar empíricamente o modelizarse matemáticamente para producir la iluminación deseada.

65 El dispositivo de captura de imágenes 120 se sitúa a lo largo de la trayectoria óptica 154 y puede capturar imágenes

(por ejemplo, imágenes digitales de baja resolución, imágenes digitales de alta resolución, imágenes multiespectrales, imágenes espectralmente discretas, etc.) del espécimen 156. El dispositivo de captura de imágenes 120 puede incluir, sin limitación, una o más cámaras (por ejemplo, cámaras analógicas, cámaras digitales, etc.), elementos ópticos (por ejemplo, una o más lentes, grupos de lentes de enfoque, etc.), sensores de imágenes (por ejemplo, dispositivos de carga acoplada (CCD), sensores de imagen de semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS) o similar), o similar. Una pluralidad de lentes que actúan conjuntamente para proporcionar un enfoque sobre la marcha y un sensor CCD pueden capturar imágenes digitales multiespectrales, imágenes digitales monocromas u otros tipos de imágenes digitales. Para proporcionar imágenes digitales monocromas, el dispositivo de captura de imágenes 120 puede incluir, sin limitación, una o más cámaras monocromas (por ejemplo, una cámara en blanco y negro, una cámara de vídeo en blanco y negro, etc.). Para proporcionar imágenes en color, el dispositivo de captura de imágenes 120 puede ser una cámara multiespectral. Los canales adquiridos se pueden separar usando algoritmos de desconvolución espectral. Se pueden usar otros tipos de dispositivos de captura de imágenes.

Con referencia nuevamente a la FIG. 1, el dispositivo de procesamiento 122 puede controlar el iluminador 140 y el dispositivo de captura de imágenes 120 de modo que el dispositivo de captura de imágenes 120 esté sincronizado con los pulsos de las fuentes de luz 180 (FIG. 3). El dispositivo de procesamiento 122 generalmente puede incluir, sin limitación, un procesador programado 190 ("procesador 190") y un dispositivo de almacenamiento 210. (Los componentes internos se muestran mediante líneas discontinuas). El dispositivo de procesamiento 122 puede incluir, además del *hardware*, código que crea un entorno de ejecución para el programa informático en cuestión, por ejemplo, código que constituye un programa, *firmware* de procesador, una pila de protocolos, un sistema de gestión de base de datos, un sistema operativo, un entorno en tiempo de ejecución multiplataforma, una máquina virtual o una combinación de uno o más de los mismos.

El procesador 190 puede ser todas las clases de aparatos, dispositivos y máquinas para procesar datos, incluyendo a modo de ejemplo un microprocesador programable, un sistema en chip, circuitos, o combinaciones de lo anterior. Por ejemplo, el procesador 190 puede incluir circuitos lógicos de propósito especial 191, por ejemplo, una FPGA (matriz de puertas programable *in situ*) o un ASIC (circuito integrado específico de la aplicación) para procesar datos (por ejemplo, imágenes, vídeo, etc.) y puede proporcionar datos, tales como datos de color con contraste mejorado para generar un vídeo del espécimen que se muestra a una velocidad de fotogramas igual o superior a aproximadamente 2 fotogramas/segundo, 5 fotogramas/segundo, 10 fotogramas/segundo, 30 fotogramas/segundo u otra velocidad de fotogramas deseada. El procesador 190 se puede seleccionar para lograr una velocidad de fotogramas deseada para producir un vídeo uniforme cuando se mueve el microscopio para ubicar una nueva región del espécimen para su inspección.

El dispositivo de almacenamiento 210 puede incluir instrucciones ejecutables que pueden ser ejecutadas por el procesador 190 para, por ejemplo, convertir vídeo/imágenes monocromas en vídeo/imágenes con colores falsos, redefinir colores de vídeo/imágenes (por ejemplo, vídeo/imágenes monocromas, vídeo/imágenes multicolor, etc.) y/u otras instrucciones ejecutables para alterar imágenes, clasificar rasgos (por ejemplo, clasificar puntos u otros rasgos), o similares. Por ejemplo, la memoria del dispositivo de almacenamiento 210 puede almacenar instrucciones de conversión ejecutables por los circuitos del procesador 190 para convertir imágenes de espécimen en imágenes de espécimen con colores falsos y para detectar rasgos y usar una métrica característica y/o morfológica para determinar si los rasgos detectados corresponden a genes, proteínas, cromosomas u otra estructura anatómica de interés. Las métricas características de imagen pueden incluir, por ejemplo, color, balance de color, intensidad o similares. El procesador 190 puede ejecutar instrucciones desde el dispositivo de almacenamiento 210 para redefinir colores, ajustar el balance de color y/o ajustar la intensidad para facilitar el análisis basándose en métricas características. Las métricas de morfología pueden incluir, por ejemplo, tamaño de rasgo, color de rasgo, orientación de rasgo, forma de rasgo, relación o distancia entre rasgos (por ejemplo, de rasgos adyacentes), relación o distancia de un rasgo en relación con otra estructura anatómica, o similares.

El dispositivo de almacenamiento 210 puede incluir un medio de almacenamiento no transitorio legible por ordenador tangible, tal como un medio legible por ordenador, que puede estar codificado con instrucciones ejecutables por ordenador (por ejemplo, un medio legible por ordenador que contiene las instrucciones). Dispositivos adecuados para almacenar instrucciones y datos de programa informático incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo a modo de ejemplo dispositivos de memoria de semiconductor, por ejemplo, EPROM, EEPROM, y dispositivos de memoria *flash*; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles; discos magnetoópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. Un medio de almacenamiento no transitorio puede incluir un dispositivo que sea tangible, lo que significa que el dispositivo tiene una forma física concreta, aunque el dispositivo puede cambiar su estado físico. Por tanto, no transitorio se refiere a un dispositivo que sigue siendo tangible a pesar de un cambio de estado. En algunos modos de realización, el dispositivo de almacenamiento 210 puede ser un medio de almacenamiento accesible por la máquina que incluye, por ejemplo, medios grabables/no grabables (por ejemplo, ROM; RAM; medios de almacenamiento de disco magnético; medios de almacenamiento óptico; dispositivos de memoria flash; etc.), etc., o cualquier combinación de los mismos capaz de almacenar datos, imágenes digitales, programas informáticos o similares.

Las imágenes digitales almacenadas pueden ser datos de imagen en color con contraste mejorado en forma binaria. Las imágenes también se pueden dividir en una matriz de píxeles. Los píxeles pueden incluir un valor digital de uno o

más bits, definido por la profundidad de bits. El valor digital puede representar, por ejemplo, energía, brillo, color, intensidad, sonido, elevación o un valor clasificado derivado del procesamiento de imágenes. Formatos de imagen digital ejemplares no limitantes incluyen, pero no se limitan a, mapas de bits, grupo conjunto de expertos en fotografía (JPEG), formato de archivo de imagen con etiquetas (TIFF) y formato de intercambio de gráficos (GIF), así como otros formatos de datos digitales. El dispositivo de almacenamiento 210 también puede almacenar vídeo. Los programas informáticos almacenados pueden corresponder, aunque no necesariamente, a un archivo en un sistema de archivos. Un programa se puede almacenar en una parte de un archivo que contiene otros programas o datos (por ejemplo, una o más secuencias de comandos almacenadas en un documento de lenguaje de marcado), en un único archivo dedicado al programa en cuestión o en múltiples archivos coordinados (por ejemplo, archivos que almacenan uno o más módulos, subprogramas o partes de código). Un programa informático se puede implementar para ejecutarse en un ordenador o en múltiples ordenadores que están ubicados en un sitio o distribuidos a través de múltiples sitios e interconectados por una red de comunicación. En algunos entornos de laboratorio, el dispositivo de almacenamiento 210 puede almacenar un programa informático usado por varios ordenadores.

Con referencia ahora a la FIG. 1, un usuario puede proporcionar datos de entrada por medio de una herramienta de selección 200, un teclado 202 u otro dispositivo de entrada acoplado al dispositivo de procesamiento 122. La herramienta de selección 200 se puede usar para seleccionar una parte del espécimen para su ampliación y/o análisis automatizado. El usuario también puede seleccionar regiones/estructuras celulares/rasgos de interés individuales usando la herramienta de selección 200.

El dispositivo de visualización 114 está acoplado comunicativamente al dispositivo de procesamiento 122 y puede ser, por ejemplo, una pantalla LCD (pantalla de cristal líquido), pantalla LED (diodo emisor de luz), pantalla OLED (diodo orgánico emisor de luz) u otro tipo de pantalla para mostrar información al usuario. El dispositivo de visualización 114 se puede situar próximo al microscopio 110 para una visualización conveniente. Si el microscopio 110 es un microscopio digital, el dispositivo de visualización digital 114 puede ser parte del microscopio. En otros modos de realización, el dispositivo de visualización 114 puede estar ubicado en una ubicación remota (por ejemplo, otro laboratorio). Un técnico de laboratorio puede manejar el microscopio 110 mientras un anatomopatólogo en la ubicación remota estudia la imagen 144. Se pueden usar múltiples dispositivos de visualización para mostrar simultáneamente diferentes imágenes, incluidas imágenes no mejoradas y mejoradas. Los tipos de dispositivos de visualización, la ubicación de los dispositivos de visualización y/o el número de dispositivos de visualización se pueden seleccionar en base a la detección a realizar.

La FIG. 4 es un diagrama de flujo de un procedimiento para producir imágenes mejoradas digitalmente, vídeo u otra salida. En general, las fuentes de luz emiten luz capaz de ser absorbida por, o causar emisiones de, rasgos de interés. Se captura un conjunto de imágenes. Cada imagen puede corresponder al espécimen que se expone a luz de una fuente de luz respectiva de las fuentes de luz. El conjunto de imágenes se puede usar para producir una imagen/vídeo digitalmente mejorado del espécimen. El procedimiento de la FIG. 4 se analiza en relación con las FIG. 5(A-E), pero se puede usar para producir otros tipos de imágenes mejoradas.

En el bloque 220, un espécimen portado en un portaobjetos de microscopio se expone a una fuente de luz que tiene longitudes de onda/bandas de onda de excitación adaptadas a las longitudes de onda/bandas de onda de absorción de un cromógeno. La luz incidente procedente de la fuente de luz puede ser absorbida por el cromógeno. En algunos modos de realización, al menos aproximadamente el 20 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la luz incidente es absorbida por el cromógeno. También se pueden absorber otros porcentajes de luz dependiendo de la tinción y las características de la fuente de luz. En cuanto a especímenes teñidos con fluorescencia, la luz puede causar una emisión de excitación desde los rasgos de interés teñidos. La detección cromogénica y la detección de fluorescencia se analizan en relación con las FIGS. 13(A-B).

En el bloque 230, un dispositivo de captura de imágenes (por ejemplo, el dispositivo de captura de imágenes 120 de las FIGS. 1 y 3) puede capturar una o más imágenes/vídeo del espécimen iluminado. Por ejemplo, se puede obtener una sola imagen del espécimen iluminado. En otros modos de realización, se puede capturar un conjunto de imágenes en diversos cortes en Z o planos focales y pueden tener diversos grados de nitidez en toda la imagen y/o en regiones específicas.

Cuando la luz de iluminación es absorbida por un cromógeno, la intensidad de la luz se reduce en esa ubicación. La FIG. 5(A) muestra una imagen monocroma capturada de un espécimen iluminado por un LED azul. Un rasgo diana en forma de un cromógeno 210 puede absorber la luz azul, haciendo así que el cromógeno 210 aparezca como un punto relativamente oscuro. Otro rasgo diana en forma de un cromógeno 211 puede ser relativamente claro en comparación con el cromógeno 210. Esto se debe a que el cromógeno 211 absorbe menos luz azul que el cromógeno 210.

En el bloque de decisión 234, si no se han capturado imágenes para obtener diferentes intensidades para todos los rasgos de interés, entonces se puede usar otra fuente de luz para iluminar un rasgo de interés adicional en el bloque 220 para capturar una o más imágenes adicionales en el bloque 230. Los bloques 220 y 230 pueden repetirse para producir un conjunto de imágenes de espécimen. El número de imágenes en un conjunto puede ser igual o superior al número de biomarcadores diferentes aplicados a una muestra de tejido. Si una muestra de tejido ha sido tratada

con seis tintes, un conjunto completo de imágenes de espécimen puede incluir al menos seis imágenes. Esto proporciona flexibilidad para realizar una amplia gama de diferentes tipos de técnicas de detección. El número de imágenes en un conjunto se puede aumentar o disminuir en base al número de biomarcadores en el ensayo de multiplexación. En el análisis de fluorescencia, un conjunto completo de microfotografías monocromas puede mostrar divergencias en las señales de fluorescencia. Por ejemplo, cada imagen monocroma puede tener puntos correspondientes a señales de fluorescencia de un fluoróforo respectivo.

Las FIG. 5(A-D) muestran un conjunto completo de microfotografías monocromas en las que las intensidades de los cromógenos varían entre las imágenes. En algunos modos de realización, el conjunto de imágenes puede incluir una imagen monocroma del espécimen que se expone a la luz de un LED azul (FIG. 5(A)), una imagen monocroma del espécimen que se expone a la luz de un LED verde (FIG. 5 (B)), una imagen monocroma del espécimen que se expone a la luz de un LED ámbar (FIG. 5(C)), y una imagen monocroma del espécimen que se expone a la luz de un LED rojo (FIG. 5 (D)).

A continuación se muestra una secuencia de iluminación para las fuentes de luz 180 de la FIG. 3 que puede usarse para producir las imágenes de las FIGS. 5(A-E) en aproximadamente 0,1 segundos.

TIEMPO (segundos)	LED azul	LED verde	LED ámbar	LED rojo	Imagen
0-0,02	ENCENDIDO	APAGADO	APAGADO	APAGADO	FIG. 5A
0,02-0,04	APAGADO	ENCENDIDO	APAGADO	APAGADO	FIG. 5B
0,04-0,06	APAGADO	APAGADO	ENCENDIDO	APAGADO	FIG. 5C
0,06-0,8	APAGADO	APAGADO	APAGADO	ENCENDIDO	FIG. 5D
0,08-0,1	APAGADO	APAGADO	APAGADO	APAGADO	FIG. 5E

A 0-0,02 segundos, el LED azul 180a (FIG. 3) ilumina el espécimen para producir la imagen de espécimen de la FIG. 5(A). A 0,02-0,04 segundos, el LED verde 180b (FIG. 3) ilumina el espécimen para producir la imagen de espécimen de la FIG. 5(B). A 0,04-0,06 segundos, el LED ámbar 180c (FIG. 3) ilumina el espécimen para producir la imagen de espécimen de la FIG. 5(C). A 0,06-0,08 segundos, el LED rojo 180d (FIG. 3) ilumina el espécimen para producir la imagen de espécimen de la FIG. 5(D). A 0,08-0,1 segundos, el dispositivo de procesamiento 122 puede procesar digitalmente el conjunto de imágenes para producir la imagen de la FIG. 5E. También se pueden usar otros períodos de tiempo y patrones de secuencia.

En el bloque de decisión 234, si se ha generado un conjunto completo de imágenes, entonces el conjunto de imágenes se usa para producir una imagen/vídeo mejorado. En el bloque 236, el conjunto de imágenes se procesa para, por ejemplo, mejorar el contraste, separar imágenes espectrales, clasificar rasgos, combinaciones de los mismos o similares. Para mejorar el contraste de color, las imágenes se pueden reclasificar. Para separar una imagen espectral, un clasificador puede identificar rasgos de interés y reclasificar la imagen para producir un conjunto de imágenes procesadas. El conjunto de imágenes procesadas se puede combinar para producir una o más imágenes en color con contraste mejorado, imágenes desconvolucionadas espectralmente o similares. Los procedimientos de mezcla lineal, los procedimientos de mezcla no lineal u otras técnicas de mezcla conocidas en la técnica, así como el procesamiento digital, se pueden usar para producir una o más imágenes/vídeo de salida deseados.

La imagen/vídeo se puede mostrar en el bloque 236. En modos con colores falsos, cada imagen monocroma en blanco y negro de las FIGS. 5(A-D) se puede convertir en una imagen monocroma en color (es decir, imágenes monocromas con colores falsos). El conjunto de imágenes monocromas en color se puede combinar para producir la imagen compuesta de la FIG. 5(D). Se pueden usar procedimientos de mezcla lineal, procedimientos de mezcla no lineal u otras técnicas de mezcla conocidas en la técnica para producir una imagen multiespectral. En algunos modos de realización, la imagen en blanco y negro de la FIG. 5(A) se convierte en una imagen monocroma roja, la imagen monocroma en blanco y negro de la FIG. 5(C) se convierte en una imagen monocroma verde, y la imagen monocroma en blanco y negro de la FIG. 5(D) se convierte en una imagen monocroma azul. La conversión de color se puede seleccionar en base al número de rasgos diana a detectar.

Para producir imágenes de seudofluorescencia, las imágenes monocromas capturadas se pueden convertir en imágenes de campo oscuro. Las imágenes de campo oscuro pueden recombinarse para producir una imagen de seudofluorescencia. A modo de ejemplo, las imágenes de las FIGS. 5(A-C) se pueden convertir en una imagen monocroma roja, una imagen monocroma verde y una imagen monocroma azul, respectivamente. Las imágenes con colores falsos (es decir, las imágenes monocromas roja, verde y azul) pueden invertirse para producir imágenes de campo oscuro, que se combinan para producir la imagen de la FIG. 6. La imagen de seudofluorescencia puede generarse rápidamente y usarse como fotogramas de un vídeo.

En la formación de imágenes desconvolucionadas espectrales, se puede usar un clasificador para procesar las imágenes de las FIGS. 5(A-D). Los rasgos de interés se pueden identificar en el conjunto de imágenes. El clasificador

puede detectar los rasgos de interés en abundancia y luego reclasificar y/o ajustar las imágenes. En algunos modos de realización, el clasificador puede entrenarse usando portaobjetos de entrenamiento. Cada portaobjetos de entrenamiento puede portar un espécimen teñido. Se puede generar un conjunto de imágenes para una secuencia de iluminación para cada portaobjetos, y la secuencia de iluminación puede incluir iluminar secuencialmente el espécimen con luz de color diferente. Cada conjunto de imágenes se puede analizar para determinar información sobre la tinción, tal como información espectral que se puede usar para detectar rasgos teñidos. En algunos modos de realización, se puede generar un algoritmo de detección, un protocolo de detección u otros medios de detección para cada tinción. Se pueden usar portaobjetos de entrenamiento adicionales para producir algoritmos de detección, protocolos de detección u otros medios de detección adicionales para detectar rasgos teñidos con otras tinciones. Se pueden generar uno o más clasificadores adicionales en base a los algoritmos de detección, protocolos de detección u otros medios de detección producidos usando los portaobjetos de entrenamiento. De forma alternativa, se pueden generar uno o más clasificadores mediante modelización por ordenador u otra técnica adecuada.

Con referencia nuevamente a la FIG. 1, el sistema de formación de imágenes 100 puede realizar el procedimiento de la FIG. 4. En algunos modos de realización, el dispositivo de procesamiento 122 puede detectar automáticamente manchas/puntos/rasgos de interés. Por ejemplo, la detección de puntos puede realizarse haciendo pasar la imagen mejorada de las FIGS. 2A y 5E a través de varios filtros. En un modo de realización, los filtros son filtros de diferencia gaussiana ("DOG"), donde cada tamaño de filtro se selecciona en base al tamaño esperado de los puntos/grupos de puntos a detectar. También se pueden usar otros filtros. Las imágenes mejoradas se pueden analizar usando un software de análisis. Por ejemplo, el color puede medirse como valores de rojo, azul y verde; se pueden determinar valores de tono, saturación e intensidad. Los especímenes también se pueden evaluar cualitativamente, semicuantitativamente y/o cuantitativamente. La evaluación cualitativa puede incluir evaluar la intensidad de la tinción, identificar las células teñidas positivamente y los compartimentos intracelulares implicados en la tinción, y evaluar la calidad general de la muestra o del portaobjetos. Se pueden realizar evaluaciones separadas de las muestras de prueba y este análisis puede incluir una comparación con valores promedio conocidos para determinar si las muestras representan un estado anómalo. El programa informático de análisis se puede usar para identificar rasgos y determinar cuantitativamente una puntuación para el portaobjetos y/o las regiones de interés. El programa informático se puede escribir en cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, lenguajes declarativos o por procedimientos, y se puede implantar de cualquier forma, incluyendo un programa independiente o un módulo, componente, subrutina, objeto u otra unidad adecuada para su uso en un entorno informático.

La FIG. 7 es un gráfico de longitud de onda frente a absorción para los tintes depositados. Cada uno de los tintes tiene una absorbancia máxima. La sulforrodamina B tiene una absorbancia máxima entre aproximadamente 560 nm y 570 nm. Un espécimen teñido con sulforrodamina B puede exponerse a luz que tiene una longitud de onda entre aproximadamente 560 nm y 570 nm o una banda de onda de aproximadamente 560 nm y 570 nm. Las características de las fuentes de luz se pueden seleccionar en base a las características de los tintes. Por ejemplo, un iluminador puede tener diecisiete LED, cada uno seleccionado para que coincida con la absorbancia de uno de los tintes. Los dispositivos de almacenamiento divulgados en el presente documento pueden incluir uno o más correlaciones o tablas de búsqueda para las características del tinte. Un lector (por ejemplo, un lector de código de barras) puede obtener información del portaobjetos para determinar la(s) longitud(es) de onda y/o banda(s) de onda apropiadas para iluminar el espécimen de tejido. De forma alternativa, un usuario puede introducir información acerca del espécimen y/o los tintes usando, por ejemplo, un teclado u otro dispositivo de entrada.

III. SISTEMAS DE FORMACIÓN DE IMÁGENES CON UN ESCÁNER

La FIG. 8 ilustra un sistema informático 300 y el entorno para analizar piezas de tejido de acuerdo con un modo de realización de la tecnología divulgada. El sistema 300 incluye un escáner digital en forma de un aparato de formación de imágenes multiespectrales 310 y un sistema informático cliente 320. Los portaobjetos de microscopio que portan un espécimen se pueden cargar en el aparato de formación de imágenes 311, que puede proporcionar una formación de imágenes de banda de onda o de longitud de onda estrechas, formación de imágenes de campo claro y/o formación de imágenes fluorescentes de los portaobjetos de microscopio que portan un espécimen. En la formación de imágenes de banda de onda o de longitud de onda estrecha, el aparato de formación de imágenes 311 puede incluir un iluminador 312 y un cabezal de escáner para realizar el procedimiento analizado en relación con las FIGS. 1-4. El aparato de formación de imágenes 311 puede ser además un escáner de portaobjetos completo. Un ejemplo de escáner de portaobjetos completo puede ser el producto VENTANA iScan HT del cesionario Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ) que se modifica con un iluminador con múltiples fuentes de luz (por ejemplo, el iluminador 140 de la FIG. 3). El sistema de formación de imágenes 310 puede incluir un mecanismo de manipulación de portaobjetos 318 que puede moverse para suministrar uno o más portaobjetos de microscopio al aparato de formación de imágenes multiespectrales y que puede moverse para retirar uno o más portaobjetos de microscopio del aparato de formación de imágenes multiespectrales 311. El mecanismo de manipulación de portaobjetos 318 puede incluir uno o más brazos robóticos, manipuladores de portaobjetos XYZ, mecanismos de agarre, dispositivos de transporte, o similares, capaces de transportar portaobjetos de microscopio entre diversas ubicaciones. Las imágenes se pueden enviar al sistema informático cliente 320 a través de una conexión directa (no mostrada) o por medio de una red 330. El sistema informático cliente 320 muestra imágenes a los usuarios, tales como anatomopatólogos, histotecnólogos o similares.

El aparato de formación de imágenes 311 puede incluir, sin limitación, uno o más dispositivos de captura de imágenes 313, una o más lentes 315 y dispositivos. (Los componentes internos del sistema de formación de imágenes 310 se muestran mediante líneas discontinuas). El dispositivo de captura de imágenes 313 puede incluir, sin limitación, un generador de imágenes digitales (por ejemplo, una cámara digital) con sensores de formación de imágenes del sistema óptico (por ejemplo, un dispositivo de carga acoplada (CCD), un sensor de imagen de semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS) o similar), o similares. Las lentes 315 pueden actuar conjuntamente para proporcionar enfoque (por ejemplo, autoenfoque). En algunos modos de realización, el dispositivo de captura de imágenes 313 tiene canales de color rojo, verde y azul para producir imágenes en color multiespectrales. El sistema óptico 315 puede incluir filtros múltiples y/o ajustables, y se crean canales de imágenes multiespectrales o en color al adquirir múltiples imágenes usando diferentes filtros y/o configuraciones de filtro. Un procedimiento de producción de una imagen mejorada en color incluye determinar una o más áreas de barrido que comprende una región o posición de portaobjetos del portaobjetos de microscopio que incluye al menos una parte del espécimen. El área de barrido se puede dividir en una pluralidad de instantáneas. Se puede producir una imagen combinando las instantáneas. La imagen combinada de todo el espécimen o portaobjetos puede tener instantáneas con imágenes en los canales RGB en el mismo plano o en diferentes planos focales.

El aparato de formación de imágenes 311 también puede incluir una puerta de acceso 321 y un controlador 323. Los portaobjetos se pueden cargar en el sistema de formación de imágenes 310 por medio de la puerta de acceso 321, y el controlador 323 se puede usar para controlar el funcionamiento del aparato de formación de imágenes 311. El controlador 323 puede incluir uno o más procesadores programables, dispositivos de almacenamiento o similares.

El sistema informático cliente 320 puede incluir un ordenador de escritorio, un ordenador portátil, una tableta o similar y puede incluir circuitos electrónicos digitales, *firmware*, *hardware*, memoria, un medio de almacenamiento informático, un programa informático, un procesador (incluyendo un procesador programado) o similar y puede almacenar imágenes digitales en forma binaria. Las imágenes también se pueden dividir en una matriz de píxeles y mostrarse por medio de un dispositivo de visualización 327.

Una red 330 o una conexión directa interconecta el sistema de formación de imágenes 310 y el sistema informático cliente 320. La red 330 puede incluir, sin limitación, una o más pasarelas, encaminadores, puentes, combinaciones de los mismos o similares. La red 330 puede incluir uno o más servidores y uno o más sitios web que son accesibles para los usuarios y se pueden usar para enviar y recibir información que el sistema informático cliente 320 puede utilizar. Un servidor puede incluir, sin limitación, una o más bases de datos asociadas para almacenar información (por ejemplo, imágenes digitales, algoritmos, protocolos de tinción o similares). La red 330 puede incluir, pero no se limita a, redes que usan el protocolo de control de transmisión (TCP), el protocolo de datagramas de usuario (UDP), el protocolo de Internet (IP) y otros protocolos de datos. El sistema informático cliente 320 puede realizar los procedimientos y técnicas analizados en el presente documento. Los componentes y las características del sistema informático cliente 320 se pueden mezclar y combinar con otros componentes y características de la tecnología divulgada.

IV. TÉCNICAS PARA DETECTAR UNA DIANA EN UNA MUESTRA

El sistema de formación de imágenes divulgado en el presente documento puede proporcionar imágenes digitales mejoradas de muestras de tejido teñidas con una amplia gama de tinciones usadas para IHC, ISH u otros análisis. En diversos modos de realización, las sustancias aplicadas a las muestras de tejido pueden incluir, sin limitación, tinciones, agentes humectantes, sondas, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, etc.), fluidos de recuperación de antígeno (por ejemplo, soluciones de recuperación de antígeno de base acuosa o no acuosa, tampones de recuperación de antígeno, etc.), disolventes (por ejemplo, alcohol, limoneno o similares), o similares. Las tinciones incluyen, sin limitación, colorantes, tinciones de hematoxilina, tinciones de eosina, conjugados de anticuerpos o ácidos nucleicos con marcadores detectables tales como haptenos, enzimas o restos fluorescentes, u otros tipos de sustancias para impartir color y/o para mejorar el contraste, así como sustancias que pueden ser para la recuperación de antígenos u otros tipos de protocolos (por ejemplo, protocolos de inmunohistoquímica, protocolos de hibridación *in situ*, etc.) para preparar especímenes para inspección visual, visualización fluorescente, microscopía o similares. A continuación se analizan ejemplos no limitantes de tinciones, conjugados, conjugados de señalización, conjugados de amplificación, restos cromóforos, cromógenos, sondas, contratinciones y composiciones.

Los conjugados se pueden usar para detectar una o más dianas en una muestra biológica y se pueden usar en ensayos estándar, tales como esquemas de detección por hibridación *in situ*, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Cualquiera de estos ensayos puede combinarse con la amplificación de señales y/o los ensayos pueden referirse a multiplexación en la que se pueden detectar múltiples dianas diferentes usando sistemas de formación de imágenes (por ejemplo, sistemas de formación de imágenes 100, 300). Un procedimiento usa un esquema de detección IHC que se combina con un esquema de detección ISH. Modos de realización ejemplares no limitantes de las técnicas divulgadas de tinción y formación de imágenes se pueden usar para determinar la clonalidad celular (por ejemplo, una célula expresa cualquiera de dos biomarcadores, pero no ambos), predecir la respuesta de pacientes con cáncer al tratamiento del cáncer (por ejemplo, detectar biomarcadores predictivos para determinar si un paciente en particular responderá al tratamiento), análisis simultáneos de expresión de biomarcadores y expresión

de genes de control interno para supervisar el rendimiento del ensayo y la integridad de la muestra, y combinaciones de los mismos.

Se pueden usar procedimientos de detección en muestras biológicas que tienen una fase sólida, tales como componentes proteicos de células o estructuras celulares que se inmovilizan sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de microscopio). En modos de realización ilustrativos, la muestra es una muestra de tejido o de citología, tal como una muestra incluida en parafina y fijada en formol, montada en un portaobjetos de microscopio de vidrio. En un modo de realización, el procedimiento es particularmente para un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos.

Un experto en la técnica apreciará que se pueden detectar y ver numerosos tipos de dianas usando formación de imágenes mejorada. La diana puede ser una secuencia particular de ácido nucleico, una proteína o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, la diana puede ser una secuencia particular de ARN (por ejemplo, ARNm, microARN y ARNip), ADN y combinaciones de los mismos. Se puede suponer que la muestra incluye una o más moléculas diana de interés. Las moléculas diana pueden estar en la superficie de las células y las células pueden estar en una suspensión o en una sección de tejido. Las moléculas diana también pueden ser intracelulares y se detectan después de la lisis celular o la penetración de la célula por una sonda. Un experto en la técnica apreciará que el procedimiento de detección de moléculas diana en una muestra variará dependiendo del tipo de muestra y de la sonda utilizada. En la técnica se conocen procedimientos de preparación y recogida de muestras.

Las muestras que se usarán con la composición divulgada en el presente documento, tales como un tejido u otra muestra biológica, se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica por un experto en la técnica. Las muestras se pueden obtener de un sujeto para el cribado de rutina o de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno, tal como una anomalía genética, una infección o una neoplasia. Los modos de realización descritos del procedimiento divulgado también se pueden aplicar a muestras que no tienen anomalías genéticas, enfermedades, trastornos, etc., que se conocen como muestras "normales". Dichas muestras normales son útiles, entre otras cosas, como controles para la comparación con otras muestras. Las muestras se pueden analizar para muchas finalidades diferentes. Por ejemplo, las muestras se pueden usar en un estudio científico o para el diagnóstico de una enfermedad sospechosa, o como indicadores de pronóstico de éxito del tratamiento, supervivencia, etc. Las muestras pueden incluir dianas múltiples que se pueden unir específicamente por una o más sondas de detección. A lo largo de esta divulgación, cuando se hace referencia a una proteína diana, se entiende que las secuencias de ácido nucleico asociadas a dicha proteína también se pueden utilizar como dianas. En algunos ejemplos, la diana es una proteína o una molécula de ácido nucleico de un patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito intracelular, por ejemplo, de un genoma vírico. Por ejemplo, una proteína diana se puede producir a partir de una secuencia de ácido nucleico diana asociada a (por ejemplo, correlacionada con, causalmente implicada en, etc.) una enfermedad.

Los microARN (miARN o miR) son pequeños ARN no codificantes que regulan negativamente la expresión génica, tal como mediante represión de la traslación. Por ejemplo, miR-205 regula la transición epitelio-mesénquima (EMT), un proceso que facilita la remodelación de tejidos durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la EMT también es una etapa temprana de metástasis tumoral. La regulación por disminución de los microARN, tales como miR-205, puede ser una etapa importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión de miR-205 se regula por disminución o se pierde en algunos cánceres de mama. El miR-205 también se puede usar para estratificar carcinomas de células escamosas y carcinomas de pulmón no microcíticos (*J. Clin Oncol.*, 2009, 27(12):2030-7). Se ha descubierto que otros microARN modulan las cascadas de señalización angiogénicas. La regulación por disminución de miR-126, por ejemplo, puede agravar la progresión del cáncer a través de la angiogénesis y del incremento en la inflamación. Por tanto, los niveles de expresión de microARN pueden ser indicativos de un estado de enfermedad. En cuanto a los microARN que están dentro del alcance de la presente divulgación, se hace referencia a la solicitud de PCT n.º PCT/EP2012/073984.

Los sistemas y técnicas divulgados de formación de imágenes se pueden usar para analizar bloques clínicos de tejido IPFF de cáncer de mama que se han caracterizado por el número de copias del gen *HER2* y la expresión de proteína Fler2 usando ensayos INFORM *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail e IHC (Ventana Medical Systems, Inc., "VMSI"), respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm de *HER2* en relación con *ACTB* (β -actina) se pueden determinar usando qPCR de acuerdo con procedimientos conocidos. Los resultados de los análisis de copia de genes, expresión de proteínas y qPCR se pueden comparar con los resultados obtenidos a través de la detección por ISH-ARNm de ARNm de *HER2* y *ACTB* usando el procedimiento divulgado en el presente documento para analizar muestras IPFF.

Los sistemas y técnicas divulgados de formación de imágenes pueden usarse para identificar la proliferación monoclonal de determinados tipos de células. El cáncer es el resultado del crecimiento incontrolado de una población celular; esta población puede surgir a partir de una única célula madre mutante y, por lo tanto, comprender una población clonal. Un ejemplo de cáncer derivado de una población clonal es el de los linfomas no Hodgkin de linfocitos B (LNH-B) que surgen de la proliferación monoclonal de linfocitos B. La expansión clonal de una población específica de linfocitos B se puede detectar mediante expresión única de proteína y ARNm de cadena ligera KAPPA o LAMBDA como parte de su anticuerpo contra receptores de linfocitos B. En consecuencia, un modo de realización del procedimiento divulgado en el presente documento se refiere a la identificación de la proliferación monoclonal de linfocitos B usando tinción doble cromogénica de ARNm de KAPPA y LAMBDA.

.La expresión uniforme de cualquiera de las cadenas ligeras por los linfocitos B cancerosos permite la diferenciación de los linfomas de linfocitos B monoclonales de las poblaciones de linfocitos B que expresan cadenas ligeras KAPPA y LAMBDA policlonales que resultan durante la respuesta inmunitaria normal. Determinar los patrones de expresión de ARNm de cadena ligera se complica por el intervalo del número de copias de ARNm de cadena ligera y de proteína de anticuerpo expresado mediante neoplasias de linfocitos B derivadas de una variedad de estadios de linfocitos B (células indiferenciadas y de memoria: 10-100 copias por célula; células plasmáticas: ~ 100 mil copias por célula).

Procedimientos

Un procedimiento para detectar una diana en una muestra biológica puede incluir poner en contacto la muestra biológica con una sonda de detección, poner en contacto la muestra biológica con un conjugado de marcaje y poner en contacto la muestra biológica con un conjugado de señalización. La FIG. 9 es un diagrama de flujo para detectar una diana. En particular, el procedimiento incluye una etapa 401 de poner en contacto la muestra con una(s) sonda(s) de detección. Esta etapa puede incluir una sonda de detección única o una pluralidad de sondas de detección específicas para una pluralidad de dianas diferentes. Una etapa 402 posterior incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de marcaje. Una etapa 407 posterior adicional incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de señalización. Las líneas discontinuas a la etapa 403, que incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de amplificación, y a la etapa 405, que incluye poner en contacto la muestra con un conjugado de marcaje secundario, representan que estas etapas son opcionales. Las líneas discontinuas a la etapa 410, que incluye poner en contacto la muestra con un inhibidor enzimático, indican que se puede usar un bucle opcional para detectar dianas múltiples de acuerdo con un enfoque multiplexado. En modos de realización divulgados particulares, se pueden usar una o más etapas en las que se añade un inhibidor enzimático a la muestra biológica. Por ejemplo, en modos de realización en los que se añaden dos o más conjugados de señalización a la muestra, se puede añadir un inhibidor enzimático (por ejemplo, un inhibidor de peroxidasa) para inhibir o destruir cualquier actividad enzimática residual después de que se haya depositado covalentemente un conjugado de señalización y antes de que se añada un segundo conjugado de señalización diferente.

Detectar dianas en la muestra puede incluir poner en contacto la muestra biológica con un primer conjugado de amplificación que se asocia con el primer conjugado de marcaje. Por ejemplo, el conjugado de amplificación se puede depositar covalentemente de forma proximal a o directa sobre el primer conjugado de marcaje. El primer conjugado de amplificación se puede seguir poniendo en contacto la muestra biológica con un conjugado de marcaje secundario. De forma ilustrativa, la amplificación de la señal usando conjugados de amplificación potencia el depósito del conjugado de señalización. El depósito potenciado del conjugado de señalización permite una identificación visual más fácil de la señal cromógena, es decir, la amplificación vuelve el color más oscuro y más fácil de ver. Para dianas de baja expresión, esta amplificación puede dar como resultado que la señal se vuelva lo suficientemente oscura para ser visible, mientras que, sin amplificación, la diana no sería apreciable. En modos de realización en los que se usa una etapa de amplificación, la muestra biológica puede ponerse en contacto primero con la sonda de detección y el conjugado de marcaje y, posteriormente, ponerse en contacto con uno o más conjugados de amplificación. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de amplificación comprende un resto reactivo latente acoplado con un marcador detectable. Por ejemplo, un resto de tiramina (o un derivado del mismo) se puede acoplar con un hapteno, directa o indirectamente, tal como con un conector. El conjugado de amplificación puede ser depositado covalentemente por la enzima del conjugado enzimático, típicamente usando condiciones descritas en el presente documento o que son conocidas por un experto en la técnica que son adecuadas para permitir que la enzima realice su función deseada. El conjugado de amplificación se deposita después covalentemente en o próximo a la diana.

Se usan condiciones adecuadas para introducir los conjugados de señalización con la muestra biológica, e incluyen típicamente proporcionar un tampón o solución de reacción que comprende un peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), y tiene una concentración de sal y un pH adecuados para permitir o facilitar que la enzima lleve a cabo su función deseada. En modos de realización particulares divulgados, esta etapa del procedimiento se realiza a temperaturas que varían de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C. Estas condiciones permiten que la enzima y el peróxido reaccionen y promueven la formación de radicales en el resto reactivo latente del conjugado de señalización. El resto reactivo latente y, por lo tanto, el conjugado de señalización como un todo, se depositarán covalentemente sobre la muestra biológica, particularmente en uno o más residuos de tirosina proximales al conjugado enzimático inmovilizado, residuos de tirosina de la parte de enzima del conjugado enzimático y/o residuos de tirosina de la parte de anticuerpo del conjugado enzimático. La muestra biológica se ilumina entonces con luz y la diana se puede detectar a través de la absorbancia de la luz producida por el resto cromógeno del conjugado de señalización.

Dependiendo del nivel de multiplexación, el bucle opcional se puede repetir una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más veces dependiendo del número de dianas que se vayan a detectar en la muestra. Durante las detecciones posteriores, el conjugado de marcaje puede ser el mismo o diferente dependiendo de los reactivos de bloqueo utilizados. Un ejemplo de diferentes conjugados de marcaje sería un primer conjugado de enzima-anticuerpo anti-hapteno y un segundo conjugado de enzima-anticuerpo anti-hapteno, en el que el primer anticuerpo anti-hapteno y el segundo anticuerpo anti-hapteno son específicos para diferentes haptenos. De acuerdo con otro ejemplo, la diferencia podría implicar diferentes anticuerpos antiespecie, en los que las dianas se detectaron usando anticuerpos primarios derivados de diferentes especies. Durante las detecciones posteriores, el conjugado de señalización usado para cada

diana sería típicamente diferente. Por ejemplo, las diferentes dianas se podrían detectar como colores diferentes.

Aunque la etapa 401 de poner en contacto la muestra con la(s) sonda(s) de detección se muestra en la FIG. 9 como la detección simultánea de múltiples dianas durante una etapa, la multiplexación también se puede realizar de forma secuencial. Un procedimiento secuencial incluiría la adición de una primera sonda de detección, seguida de llevar a cabo las diversas etapas de procedimiento posteriores (es decir, 402, 407, opcionalmente 403 y 405). A continuación, se puede añadir una segunda sonda de detección después de que el primer conjugado de señalización se haya depositado covalentemente en o proximalmente a la primera diana, proporcionando así la capacidad de detectar una segunda diana. Este proceso se puede entonces repetir iterativamente usando un conjugado de señalización diferente que comprende un resto cromóforo que difiere de los otros depositados.

El procedimiento también comprende una etapa 409 de iluminar la muestra con luz y una etapa 411 de detectar la(s) diana(s). La señal producida por el conjugado de señalización se detecta, proporcionando de ese modo la capacidad de detectar una diana particular. En modos de realización divulgados particulares, la señal producida por el conjugado de señalización puede ser fluorescente, cromogénica o combinaciones de ambas cosas. Los modos de realización ejemplares se refieren a la detección de una señal cromogénica. La señal se puede detectar usando procedimientos adecuados conocidos por los expertos en la técnica, tales como procedimientos de detección cromogénica, procedimientos de detección fluorogénica y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la señal se puede detectar usando técnicas de detección de campo claro o técnicas de detección de campo oscuro con o sin mejora digital.

Las FIGS. 10(A-B) son diagramas esquemáticos de dos modos de realización de conjugados de señalización. La FIG. 10(A) ilustra un conjugado de señalización 412 que comprende un resto reactivo latente 404 y un resto cromóforo 406. La FIG. 10(B) ilustra un conjugado de señalización alternativo 414, que comprende un resto cromóforo 406, un resto reactivo latente 404, y que comprende además un conector 408.

Las FIGS. 11(A-F) son diagramas esquemáticos que ilustran un modo de realización de un procedimiento para detectar una diana 417 en una muestra 416. La FIG. 11(A) muestra una sonda de detección 418, que se muestra ilustrativamente como una molécula de ácido nucleico con un hapteno 419, que se une a la diana 417, que, en este caso, sería una diana de ácido nucleico. La FIG. 11(B) muestra un conjugado de marcaje 420 que se une a una sonda de detección 418. El conjugado de marcaje se representa como un anticuerpo anti-hapteno específico para el conjugado de hapteno 419 para dos enzimas, representadas como los círculos que contienen una "E". Aunque se muestra como un conjugado de un anticuerpo y dos moléculas de enzima, el número de enzimas por anticuerpo puede ser alterado y optimizado para aplicaciones particulares por un experto en la técnica. En particular, el número de enzimas se podría modificar de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, dependiendo de diversos factores que incluyen el tamaño del anticuerpo y el tamaño de las enzimas. La FIG. 11(C) muestra el conjugado de señalización 412 que se deposita enzimáticamente sobre la muestra 416. En particular, las enzimas "E", parte del conjugado de marcaje 420, catalizan la conversión del primer resto reactivo latente del conjugado de señalización 412 en una primera especie reactiva 413. Esta catálisis se representa mediante una primera flecha grande 421 que dirige el conjugado de señalización 412 hacia las enzimas "E" y una segunda flecha grande 422 que sale de las enzimas "E" hacia la especie reactiva 413, que está hecha del resto cromóforo 406 (FIG. 10B) y un resto reactivo, que se representa mediante el punto, reemplazando la flecha como se muestra en el conjugado de señalización 406 (FIG. 10B). La especie reactiva 413 se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la primera diana, para formar un cromóforo 415 unido covalentemente. La FIG. 11(D) muestra un modo de realización alternativo en el que se usa una sonda de detección basada en anticuerpo 428 para detectar una diana de proteína 427. La FIG. 11(D) se incluye para mostrar que la detección de una diana de ácido nucleico 417 y/o de una diana de proteína 427 son análogas, excepto que la sonda de detección 428 se representa como un anticuerpo en oposición a un ácido nucleico (por ejemplo, sonda de detección 418). La sonda de detección 428 se muestra como no haptenada, lo que implica que el conjugado de marcaje 430 es un anticuerpo antiespecie conjugado con las enzimas "E". Sin embargo, en modos de realización alternativos, la sonda de detección 428 podría ser haptenada y el conjugado de marcaje 430 podría incluir un anticuerpo anti-hapteno.

La FIG. 11(E) muestra un enfoque para detectar la diana que usa un conjugado de amplificación 442. En particular, el conjugado de amplificación 442 se deposita enzimáticamente sobre una muestra 436. En particular, las enzimas "E", parte del conjugado de marcaje 440, catalizan la conversión del primer resto reactivo latente del conjugado de amplificación 442 en una primera especie reactiva 443. Esta catálisis se representa mediante una primera flecha grande 431 que dirige el conjugado de amplificación 442 hacia las enzimas "E" y una segunda flecha grande 432 que sale de las enzimas "E" hacia la especie reactiva 443, que está hecha de un hapteno (mostrado como una cruz) y un resto reactivo, que se representa mediante el punto, reemplazando la flecha como se muestra en el conjugado de amplificación 442. La especie reactiva 443 se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la primera diana, para formar un hapteno 445 unido covalentemente. El esquema representado en la FIG. 11(E) se muestra en el presente documento para hacer evidentes las similitudes entre el esquema de la FIG. 11(E) y el esquema de la FIG. 11(C). En particular, los esquemas son casi idénticos, excepto por la sustitución del resto cromóforo del conjugado de señalización 412 por el hapteno del conjugado de amplificación 442. La FIG. 11(F) muestra que el conjugado de amplificación unido a la muestra (hapteno 445 unido covalentemente como se observa en la FIG. 11(E)) se puede marcar con un conjugado de marcaje secundario 441. Aunque no se muestra, el esquema mostrado en la FIG. 11(C) se puede usar entonces para formar un cromóforo unido covalentemente. El depósito del

conjugado de amplificación 442 sobre la muestra proporciona un mayor número de moléculas de enzima (es decir, las enzimas del conjugado de marcaje 440 y del conjugado de marcaje secundario 441 se muestran proximalmente a la diana en la FIG. 11(F)).

5 El conjugado de señalización se puede detectar usando procedimientos de detección digital de campo claro, procedimientos de detección automatizados, etc. Los procedimientos de detección automatizados pueden incluir, sin limitación, la producción de imágenes/vídeos digitalmente mejorados y el uso de técnicas de análisis automatizadas para detectar dianas. Una visión general de la detección de campo claro se ilustra en las FIGS. 12(A-B). La FIG. 12(A) es un esquema de una vista en sección transversal de la muestra 416 que incluye una superficie superior 448 y una
10 superficie inferior 449 en la que una pluralidad de los conjugados de señalización 412 están situados proximalmente a una diana (T); la muestra se muestra con una primera flecha 446 que representa la radiación incidente dirigida hacia la superficie superior 448 y una segunda flecha 447 que representa la radiación transmitida que emana de la superficie inferior 449. La FIG. 12(B) es un gráfico que representa la relación entre la potencia de la radiación incidente (P_0) a través de la muestra 416 mostrada en la FIG. 12(A) y la potencia de la radiación transmitida (P) a través de la muestra. Las FIGS. 12(A-B) representan cómo se podría visualizar una diana usando el conjugado de señalización 412. La ecuación 1 proporciona la relación matemática entre la potencia de la radiación incidente y la transmitida.

Las etapas de procedimiento divulgadas se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, y no están limitadas a las descritas en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el procedimiento puede comprender etapas en las que los conjugados de marcaje se añaden a la muestra biológica, seguido del conjugado de señalización. En otros modos de realización divulgados, el procedimiento puede comprender etapas en las que los conjugados de marcaje se añaden a la muestra biológica, seguido de un conjugado de amplificación, un conjugado enzimático adicional y el conjugado de señalización. Los conjugados divulgados en el presente documento se pueden
25 añadir simultáneamente o secuencialmente. Los conjugados se pueden añadir en soluciones separadas o como composiciones que comprenden dos o más conjugados. Además, cada clase de conjugados usados en el procedimiento divulgado puede comprender los mismos o diferentes componentes conjugados. Por ejemplo, cuando se añaden múltiples conjugados de señalización a la muestra, los conjugados pueden comprender los mismos o diferentes restos cromógenos y/o restos reactivos latentes. Únicamente a modo de ejemplo, un conjugado de señalización puede comprender un cromóforo de cumarina acoplado a un resto de tiramina y otro conjugado de señalización puede comprender un cromóforo de rodamina acoplado a un resto de derivado de tiramina. El número de conjugados de señalización adecuado para su uso en el ensayo de multiplexación divulgado puede variar de uno a al menos seis o más, típicamente de dos a cinco. En modos de realización divulgados particulares, el procedimiento se usa para detectar de tres a cinco dianas diferentes usando de tres a cinco conjugados de señalización diferentes.
35 Los iluminadores divulgados en el presente documento pueden tener fuentes de luz que emiten luz para hacer que los conjugados transmitan radiación. Se pueden detectar múltiples dianas en un único ensayo usando los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento. En otro modo de realización, una cualquiera o más de las etapas divulgadas en el presente documento para el procedimiento se realizan mediante un instrumento de tinción automatizada de portaobjetos (por ejemplo, sistema de formación de imágenes 300 de la FIG. 8).

40 Cromogenia frente a fluorescencia

Los modos de realización divulgados en el presente documento se pueden usar para la detección cromogénica y de fluorescencia. Las diferencias entre detección cromogénica y detección de fluorescencia se ilustran gráficamente en
45 las FIGS. 13(A) y 13(B). La FIG. 13(A) muestra un ejemplo de cromógeno rojo 451, un ejemplo de cromógeno azul 453 y un ejemplo de cromógeno multiplexado rojo y azul 452. Cuando los cromógenos se exponen a la luz (es decir, se exponen a luz que tiene una potencia incidente de P_0), los cromógenos interactúan con la luz absorbiendo diversas longitudes de onda. Por ejemplo, las fuentes de luz 180a-d u otras fuentes de luz/iluminadores pueden emitir luz. La luz transmitida tendrá una potencia particular (P_1 , P_2 y P_3 en la FIG. 13(A)) dependiendo de la absorbancia del cromógeno y de la cantidad de cromógeno presente. El mejor evento de detección da como resultado que se deposite más cromógeno, que absorbe más luz y hace que la señal observada sea más pequeña. Incluso para los cromógenos coloreados, una reducción de la luz transmitida hará finalmente que el cromógeno aparezca oscuro o negro, ya que no se transmite luz. La multiplexación a menudo agrava este efecto, como se muestra en el ejemplo de cromógeno multiplexado rojo y azul 452. Cuando un cromógeno rojo tradicional y un cromógeno azul se superponen en el espacio,
55 la absorbancia es amplia y el evento de detección aparece negruzco y oscuro, como se ilustra con la señal P_3 , que es menor que P_1 y P_2 . Esencialmente, la detección cromogénica con señales superpuestas puede dar como resultado un efecto sustractivo. Esto está en contraste con la fluorescencia que se muestra en la FIG. 13(B). Con referencia a la FIG. 13(B), se muestra un ejemplo de flúor púrpura 461, un ejemplo de flúor verde 463, y un ejemplo de flúor multiplexado púrpura y verde 462. La luz de excitación (que se muestra como λ_{ex} en la figura) puede interactuar con el flúor 461, 462, 463 y puede causar una emisión. La luz de excitación puede ser la misma en los tres ejemplos, y 461 presenta λ_{f1} (fluorescencia púrpura), 463 presenta λ_{f2} (fluorescencia verde) y 462 presenta λ_{f1} (fluorescencia púrpura) y λ_{f2} (fluorescencia verde). Cuanto más flúor se deposita sobre la muestra, más fuerte es la señal de fluorescencia que se genera. De manera similar, en un escenario multiplexado, hay un efecto aditivo para los fluoróforos, mientras que se produce un efecto sustractivo con los cromóforos. Este rasgo sustractivo frente a aditivo agrava significativamente la dificultad de multiplexación usando cromógenos. Los sistemas de formación de imágenes divulgados en el presente documento pueden usarse para la detección cromogénica y la detección de fluorescencia

y pueden mejorar la percepción del color de las señales mediante el uso de imágenes compuestas con colores falsos. Por ejemplo, el iluminador 140 de la FIG. 1 se puede ubicar en la parte frontal del portaobjetos para la detección de fluorescencia.

5 DetECCIÓN e ILUMINACIÓN

El conjugado de señalización se configura para proporcionar una variedad de características que facilitan la provisión de una señal detectable. El conjugado de señalización puede comprender un resto cromóforo apropiado para proporcionar una señal de campo claro. Si el resto cromóforo proporciona una señal de campo claro, se puede usar un microscopio de campo claro para detectar visualmente la señal. También se puede usar procesamiento digital para facilitar la detección de la señal. Por ejemplo, el cromóforo divulgado en el presente documento se puede seleccionar para producir una señal óptica adecuada para detectar visualmente la diana divulgada en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el cromóforo tiene propiedades ópticas, tales como las analizadas a continuación, que permiten que el conjugado de señalización se configure para proporcionar la señal deseada.

Cuando la luz (es decir, la radiación electromagnética visible) atraviesa o es reflejada por una sustancia coloreada, se absorbe una parte característica de la distribución de longitud de onda espectral. La absorción de esta parte característica imparte al objeto un color complementario correspondiente a la luz restante. Las FIGS. 14(A) y 14(B) muestran una rueda de colores (FIG. 14(A)) que ilustra la relación entre un color observado y la radiación absorbida. La rueda de colores incluye varias porciones que representan los colores rojo (R), naranja (O), amarillo (Y), verde (G), azul (B), añil (I) y violeta (V). Cada color se muestra como una porción separada del siguiente color por una serie de líneas que terminan en números fuera del círculo. Estos números designan la longitud de onda de la luz en nanómetros de longitudes de onda tradicionalmente consideradas los puntos de transición entre colores. La FIG. 14(B) muestra la misma distribución de colores en un gráfico lineal que tiene la longitud de onda de la luz en el eje x. Es decir, la región de 620 a 800 nm se muestra de color rojo, ya que esas longitudes de onda son longitudes de onda de luz "roja". Los LED rojos pueden emitir longitudes de onda en un intervalo de aproximadamente 620-800 nm. Típicamente, los colores se perciben preferentemente y algunos colores se perciben solo para un intervalo muy estrecho de longitudes de onda. Por ejemplo, una fuente de luz que tiene una emisión entre 490 nm y 560 nm se puede percibir como verde (un intervalo de 70 nm). Para percibirse naranja, la luz puede emitir luz en el intervalo de 580 nm y 620 nm (40 nm). El gráfico se proporciona solo como representación, y un experto en la técnica aprecia que el espectro electromagnético es de naturaleza continua y no discreto, como se muestra. Sin embargo, las clasificaciones de colores delineadas en el presente documento facilitan el entendimiento de la tecnología reivindicada en el presente documento.

Cuando una sustancia absorbe a una longitud de onda particular, la sustancia parece ser del color complementario, correspondiendo ese color a la luz restante. La rueda de colores de la FIG. 14(A) muestra colores complementarios diametralmente opuestos entre sí. De acuerdo con la rueda de colores, la absorción de luz más azul de longitud de onda corta (por ejemplo, luz a 420-430 nm) imparte un color amarillo a la sustancia (425 nm es opuesto a la parte del círculo que es amarilla). De manera similar, la absorción de luz en el intervalo de 500-520 nm imparte un color rojizo a magenta a la sustancia, ya que la porción roja es opuesta al intervalo numérico de 500-520 nm. El verde es único porque la absorción de luz más azul de longitud de onda corta (por ejemplo, cerca de 400 nm) más la absorción de luz más roja de longitud de onda larga (por ejemplo, cerca de 650 nm) puede impartir un color verde a la sustancia.

El concepto de que la absorción de luz a longitudes de onda entre 420-430 nm da como resultado que la sustancia parezca amarilla es una simplificación excesiva de muchos de los fenómenos de absorción descritos en el presente documento. En particular, el perfil espectral de absorción tiene una gran influencia sobre el color observado. Por ejemplo, una sustancia que es negra se absorbe fuertemente en todo el intervalo de 420-430 nm, pero la sustancia negra no aparece amarilla. En este caso, el absorbente negro absorberá luz en todo el espectro visible, incluidos 420-430 nm. Por lo tanto, aunque la absorción de la luz a una longitud de onda particular es importante, las características de absorción en todo el espectro visible (es decir, la absorción espectral) también son importantes.

La absorción espectral se puede caracterizar de acuerdo con varios parámetros medibles. La longitud de onda a la cual la fracción máxima de luz es absorbida por una sustancia se conoce como $\lambda_{\text{máx}}$. Debido a que esta longitud de onda es la que se absorbe en mayor medida, se denomina típicamente longitud de onda de absorbancia. Un iluminador puede generar con una longitud de onda cercana o igual al $\lambda_{\text{máx}}$ del rasgo de interés del que se van a formar imágenes. La FIG. 15(A) es un espectro de absorción de un conjugado de señalización particular, y la FIG. 15(B) ilustra una microfotografía de una proteína teñida usando el conjugado de señalización que produce el espectro de absorción de la FIG. 15(A). La FIG. 15(A) incluye una primera flecha (470) que ilustra la magnitud de la absorbancia máxima. Una segunda flecha (471) muestra la magnitud de la mitad del máximo. Una tercera flecha (472) muestra la anchura del pico a la mitad de la absorbancia máxima. Para este conjugado de señalización ejemplar, $\lambda_{\text{máx}}$ es 552 nm y la anchura del pico a la mitad de la absorbancia máxima (por ejemplo, AMA) es de aproximadamente 40 nm. Mientras que $\lambda_{\text{máx}}$ designa la longitud de onda de absorción máxima, la AMA designa la amplitud de la absorbancia espectral. Ambos factores son importantes para describir el color del cromóforo porque los espectros de absorción amplios no parecen tener el color que se esperaría de su $\lambda_{\text{máx}}$. Por el contrario, parecen ser de color marrón, negro o gris. Con referencia a la FIG. 15(B), el depósito del conjugado de señalización es claramente evidente en aquellas ubicaciones en las que cabría esperar para la tinción positiva (IHC HER2 (4B5) en xenoinjertos Calu-3). Haciendo referencia de nuevo a la

rueda de colores (FIG. 14(A)), una $\lambda_{\text{máx.}}$ de 552 nm debería corresponder a un color complementario del rojo o rojo-violeta. Esto coincide con el color observado en la muestra de tejido mostrada en la FIG. 15(B) (obsérvese que la muestra incluye además contratinción nuclear con hematoxilina, que es azul). Debido a que la contratinción está confinada al núcleo, no parece interferir ni afectar sustancialmente a la tinción de HER2 basada en la membrana celular.

Algunos cromóforos ejemplares pueden tener fuertes características de absorbancia. En algunos modos de realización, los cromóforos son no fluorescentes o débilmente fluorescentes. En virtud de sus características de absorbancia, un cromóforo es una especie capaz de absorber la luz visible. Un cromóforo preferente puede ser capaz de absorber una cantidad suficiente de luz visible con suficiente especificidad de longitud de onda para que el cromóforo pueda visualizarse usando iluminación de campo claro, técnicas de obtención de imágenes digitales, etc. en otro modo de realización, el cromóforo tiene una absorptividad molar promedio superior a de aproximadamente $5.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a aproximadamente $250.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por ejemplo, la absorptividad molar promedio puede ser superior a aproximadamente $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $10\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $20\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, superior a aproximadamente $40\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o superior a aproximadamente $80\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se pueden usar características de absorbancia fuerte para aumentar la señal o el color proporcionado por el cromóforo.

El depósito de conjugados de señalización en las proximidades de la diana crea absorción de la luz incidente. Debido a que la absorción se produce de manera no uniforme a través de la muestra, se puede identificar la ubicación de la diana, dentro de la muestra, como se analiza en relación con las FIGS. 5(A-E).

Determinados aspectos, o todos, de los modos de realización divulgados se pueden automatizar y facilitar mediante un análisis informático y/o un sistema de análisis de imágenes. En algunas aplicaciones, las relaciones de color precisas se miden mediante los sistemas de formación de imágenes divulgados en el presente documento. En algunos modos de realización, se utiliza microscopía óptica para el análisis de imágenes, como se analiza en relación con la FIG. 1. Las imágenes digitales obtenidas de muestras teñidas se pueden analizar usando un software de análisis de imágenes. Por ejemplo, el software puede ser almacenado por el dispositivo de procesamiento 122. El color se puede medir de diferentes maneras. Por ejemplo, el color se puede medir como valores de rojo, azul y verde; valores de matiz, saturación e intensidad; y/o midiendo una longitud de onda específica o un intervalo de longitudes de onda usando una cámara de formación de imágenes espectral.

Los modos de realización ilustrativos implican el uso de formación de imágenes de campo claro con los conjugados de señalización, formación de imágenes de banda de onda estrecha y/o formación de imágenes de longitud de onda. En la iluminación de campo claro, la luz blanca en el espectro visible se transmite a través del resto cromóforo. El cromóforo absorbe luz de determinadas longitudes de onda y transmite otras longitudes de onda. Esto cambia la luz de blanco a color dependiendo de las longitudes de onda específicas de la luz transmitida.

La absorbancia espectral estrecha permite la multiplexación cromogénica a un nivel que va más allá de la capacidad de los cromógenos tradicionales. Por ejemplo, los cromógenos tradicionales se duplexan de forma en cierto modo rutinaria (por ejemplo, Fast Red y Fast Blue, Fast Red y Black (plateado), Fast Red y DAB). Sin embargo, las aplicaciones triplexadas o tricólores son atípicas. En modos de realización ilustrativos, el procedimiento incluye detectar de dos a aproximadamente seis dianas diferentes, tal como de tres a seis, o de tres a cinco, usando diferentes conjugados de señalización o combinaciones de los mismos. En un modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz comprende iluminar la muestra biológica con una fuente de luz espectralmente estrecha, teniendo la fuente de luz espectralmente estrecha una emisión espectral con una segunda anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm (con filtro podría ser 10 nm con fuente clara) y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm. En otro modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una o más fuentes de luz LED (por ejemplo, fuentes de luz LED 180). En otro modo de realización, iluminar la muestra biológica con luz incluye iluminar la muestra biológica con una fuente de luz filtrada. Por ejemplo, las fuentes de luz 180 de la FIG. 3 pueden incluir una lámpara y uno o más filtros.

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

En un modo de realización, el conjugado de señalización se deposita covalentemente de forma proximal a la diana a una concentración adecuada para producir una señal detectable, tal como a una concentración superior a aproximadamente 1×10^{11} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ hasta al menos aproximadamente 1×10^{16} moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ de la muestra biológica. Un experto en la técnica podría calcular el número de moléculas por $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ de la muestra biológica usando la ecuación 1 y las mediciones de absorbancia en la muestra, teniendo cuidado de sustraer la absorbancia correspondiente a la muestra. En un modo de realización del procedimiento divulgado, tal como un procedimiento de multiplexación, detectar una señal incluye detectar una absorbancia de un 5 % o más de luz incidente en comparación con un fondo, y detectar una señal separada diferente incluye detectar una absorbancia de

un 5 % o más de luz incidente en comparación con el fondo. En otro modo de realización, detectar una señal incluye detectar una absorbancia de un 20 % o más de luz incidente en comparación con un fondo, y detectar una señal separada diferente incluye detectar una absorbancia de un 20 % o más de luz incidente en comparación con el fondo. En otro modo de realización más, detectar una señal incluye detectar una absorbancia de un 30% o más de luz incidente en comparación con un fondo, y detectar una señal separada diferente incluye detectar una absorbancia de un 30% o más de luz incidente en comparación con el fondo. Un observador puede ver una imagen compuesta (véase la FIG. 5(E)) para identificar visualmente dicha absorbancia. Por ejemplo, los puntos coloreados en una imagen de campo claro, imagen mejorada digitalmente, etc. pueden corresponder a regiones de alta absorbancia.

En un modo de realización, la primera diana y la segunda diana pueden ser ácidos nucleicos genéticos. La detección de la primera diana a través de la absorbancia de la luz por el primer conjugado de señalización incluye la detección de una primera señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, azul, añil o violeta. La primera señal coloreada se asocia a la absorbancia espectral asociada al primer resto cromógeno del primer conjugado de señalización. La detección de la segunda diana a través de la absorbancia de la luz por el segundo conjugado de señalización incluye la detección de una segunda señal coloreada seleccionada entre rojo, naranja, amarillo, verde, azul, añil o violeta. La segunda señal coloreada se asocia a la absorbancia espectral asociada al segundo resto cromógeno del segundo conjugado de señalización. Las señales coloreadas se pueden redefinir para mejorar el contraste de color. Una superposición en proximidad a través de la absorbancia de la luz por el primer conjugado de señalización se superpone en proximidad con el segundo conjugado de señalización, de modo que se puede detectar una tercera señal coloreada que está asociada a la absorción espectral superpuesta de la primera absorbancia espectral y la segunda absorbancia espectral. De acuerdo con un ejemplo, este tercer color indica una disposición genética normal y el primer y el segundo color indican una reordenación o translocación.

Sonda de separación de tres colores por ISH

Los conjugados de señalización pueden ser particularmente útiles en ensayos multiplexados, así como en ensayos que usan sondas de translocación. La FIG. 16(A) es una microfotografía de campo claro de una tinción doble de dos sondas génicas en una sección de tejido pulmonar que analiza los reordenamientos de ALK asociados a carcinoma de pulmón no microcítico y la FIG. 16(B) es un espectro de UV-Vis de Fast Red y Fast Blue en soluciones de acetato de etilo. La sonda 3' se detectó usando Fast Red y la sonda 5' se detectó usando Fast Blue. Las FIGS. 17(A) y 17(B) ilustran las trazas de la FIG. 16(B) por separado. La FIG. 16(B) muestra que Fast Red y Fast Blue tienen características de absorción espectral amplias y bien definidas. Fast Red muestra una fuerte absorción entre aproximadamente 475 nm y aproximadamente 560 nm. Comparando este intervalo con la rueda de colores, el color esperado correspondiente a la característica de absorción espectral sería rojo o naranja. El intervalo de absorción es tan grande que cubre esencialmente todas las longitudes de onda que se esperaría obtener en un color rojo o naranja. Fast Blue muestra una fuerte absorción entre aproximadamente 525 nm y aproximadamente 625 nm, un intervalo incluso más amplio que el Fast Red. Nuevamente, haciendo referencia a la rueda de colores de la FIG. 14(A), la absorción de 525-625 nm cubre casi la mitad de la rueda de colores, siendo el azul, añil y violeta complementarios. Para mejorar el contraste entre Fast Red y Fast Blue, una fuente de luz puede emitir una longitud de onda con 475 nm-560 nm para formar imágenes del Fast Red y otra fuente de luz puede emitir una longitud de onda dentro de 525-625 nm para formar imágenes del Fast Blue. Se puede producir una imagen mejorada (no mostrada) en base a la absorción.

Con referencia ahora a la FIG. 16(A), un punto de Fast Red se resalta con el círculo (R), un punto de Fast Blue se resalta con el círculo (B), un conjunto de puntos formado por un punto de Fast Red y un punto de Fast Blue se etiquetan como adyacentes con el círculo (A), y un punto de Fast Red y un punto de Fast Blue superpuestos entre sí se etiquetan con el círculo (O). Como se preveía, el punto de Fast Red (A) es rojo y el punto de Fast Blue (B) aparece de un color azulado oscuro que cabría esperar de la mezcla de azul, añil y violeta. Los puntos adyacentes dentro del círculo (A) se pueden distinguir claramente entre sí como un punto rojo y un punto azul separados. Sin embargo, el punto que incluye una superposición de un punto rojo y un punto azul da como resultado un color ambiguo. Parece algo azulado y tiene una franja roja en un lado. El color del punto es difícil de distinguir y difícil de caracterizar. En un punto de superposición, la absorción del Fast Red y del Fast Blue sería aditiva y el perfil de absorción espectral se extendería desde aproximadamente 475 nm hasta aproximadamente 625 nm y tendría una $\lambda_{\text{máx.}}$ de alrededor de 550 nm. Con referencia nuevamente a la rueda de colores (FIG. 14(A)), este intervalo de longitudes de onda cubre casi toda la rueda. La absorción de base amplia que cubre todo el espectro da típicamente un aspecto negro o marrón con un tinte de los colores menos absorbidos, en este caso añil y violeta. Un anatomopatólogo que evalúe la microfotografía de la FIG. 16(A) puede tener dificultad para distinguir entre un punto de azul a añil (B) y el punto de superposición (O).

Se pueden seleccionar deliberadamente diferentes conjugados de señalización y hacer que comprendan restos cromógenos que producen luz en los extremos opuestos del espectro UV-vis. Las FIGS. 18(A) y 18(B) ilustran cómo los conjugados de señalización y el procedimiento divulgados se pueden usar para resolver el problema asociado a sondas que comprenden dos restos cromógenos diferentes. Con referencia a la FIG. 18(A), un resto cromógeno capaz de producir un color negro ("B") se usa en combinación con un resto cromógeno que produce un color rojo ("R"). Cuando los dos conjugados de señalización se superponen, no queda claro si el color negro observado ("B") es producido por el resto cromógeno negro o si se produce por la superposición entre los restos cromógenos rojo y negro. Sin embargo, con referencia a la FIG. 18(B), este problema se puede resolver usando dos restos cromógenos que, cuando se combinan, producen un tercer color único. Por ejemplo, se puede usar un resto cromógeno púrpura ("P")

en combinación con un resto cromógeno amarillo ("Y"). La superposición entre los dos se observa fácilmente, ya que se produce una señal naranja ("O"). Las FIGS. 19(A-B) muestran además cómo se pueden depositar dos colores proximalmente para crear un tercer color visualmente distinto. En particular, la FIG. 19(A) muestra una señal amarilla, que se muestra con una letra "y", combinada con la señal magenta, que se muestra con una letra "m", para crear un color rojo cereza vibrante, que se muestra con una letra "r". La FIG. 19(B) muestra una señal magenta, indicada por la letra "m", y una señal turquesa, indicada por la letra "t", que se combinan para crear una señal azul oscuro, que se muestra con una letra "b".

Iluminación

Se puede usar un sistema tradicional de fuente de luz blanca y filtro, tal como los usados típicamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el iluminador 140 de la FIG. 1 puede incluir una fuente de luz blanca y un filtro para producir un conjunto de imágenes monocromas en color. El color de las imágenes monocromas se puede redefinir y combinar para producir una imagen digital mejorada. En otros modos de realización divulgados se puede usar una fuente de luz LED en la etapa de detección para generar una luz de iluminación más estrecha, como se analiza en relación con la FIG. 3. Dichas fuentes de luz se pueden usar en modos de realización en los que se usan uno o más conjugados de señalización diferentes, particularmente cuando se usan tres o más conjugados diferentes. Las fuentes de luz LED pueden proporcionar flexibilidad en el intervalo de longitud de onda que puede ser absorbida por el conjugado de señalización divulgado. En modos de realización divulgados particulares, los conjugados de señalización se pueden visualizar independientemente iluminando el espécimen con luz de una longitud de onda a la que el cromógeno absorbe, haciendo de este modo que el cromógeno se vea oscuro contra un fondo claro (la luz es absorbida por el cromógeno, reduciendo la intensidad de la luz en ese punto). Por ejemplo, la luz que ilumina el espécimen de la FIG. 5(A) es absorbida por el cromógeno 210, dando como resultado que el cromógeno 210 aparezca relativamente oscuro. En modos de realización divulgados particulares, iluminar el espécimen con luz que no es absorbida por el cromógeno hace que el cromógeno "desaparezca" debido a que la intensidad de la luz no se altera (absorbe) cuando pasa a través del punto cromógeno. Por ejemplo, la luz que ilumina el espécimen de la FIG. 5(A) no es absorbida por el cromógeno 211. Por tanto, el cromógeno 211 parece relativamente claro en comparación con el cromógeno 210. Los rasgos de tejido pueden causar algunas pérdidas de transmisión, lo que da como resultado la visualización de rasgos de tejido que no absorben la luz. Únicamente a modo de ejemplo, al iluminar con luz verde un portaobjetos que tiene una muestra biológica, los cromógenos de rodamina aparecen oscuros, mientras que el cromógeno Cy5 desaparece. Por el contrario, al iluminar el portaobjetos con luz roja, el cromógeno Cy5 aparece oscuro y los cromógenos de rodamina desaparecen.

Los portaobjetos teñidos usando determinados conjugados de señalización divulgados se iluminaron usando un iluminador de múltiples LED que se adaptó al microscopio óptico BX-51 de Olympus. Se formaron imágenes del espécimen en cada etapa de eliminación. Se utilizaron dos iluminadores LED: 1) un iluminador de 3 LED incorporado que incluye un motor de luz Lamina RGB (EZ-43F0-0431) con 3 reguladores de corriente BuckPlus de LEDdynamics con potenciómetros e interruptores para permitir el control de activación/desactivación y la variación de las intensidades de LED rojo, verde y azul de forma independiente; y 2) un iluminador LED controlado por ordenador RGBA de TOFRA, Inc. para microscopios verticales modificado para la conmutación manual de los LED. Para visualizar solo los cromógenos de tiramida, iluminar el espécimen con luz de una longitud de onda a la que el cromógeno absorbe hace que el cromógeno se vea oscuro contra un fondo claro (la luz es absorbida por el cromógeno, reduciendo la intensidad de la luz en ese punto). Iluminar el espécimen con luz que no es absorbida por el cromógeno hace que el cromógeno "desaparezca" debido a que la intensidad de la luz no se altera (absorbe) cuando pasa a través del punto cromógeno.

Las FIGS. 20(A-B) son microfotografías de una muestra que ha sido teñida doblemente con un conjugado de señalización turquesa y magenta bajo (A) iluminación con luz blanca, (B) iluminación con luz verde y (C) iluminación con luz roja. Al iluminar el portaobjetos con luz roja, los conjugados de señalización turquesa aparecen oscuros, mientras que el conjugado de señalización magenta desaparece. Por el contrario, al iluminar el portaobjetos con luz verde, el conjugado de señalización magenta aparece oscuro y el conjugado de señalización turquesa desaparece. La superposición entre los conjugados de señalización magenta y turquesa es oscura bajo iluminación con luz blanca, iluminación con luz verde e iluminación con luz roja. La imagen de las FIGS. 20(A, B) se puede redefinir (por ejemplo, convertir en diferentes colores) y combinar para promover el contraste entre los diferentes conjugados. Uno de los beneficios percibidos de la microscopía de fluorescencia es la capacidad de usar filtros para conmutar entre las señales de sonda individuales. Usando los conjugados de señalización descritos en el presente documento, es posible habilitar la conmutación usando compuestos cromógenos. Se pueden añadir fácilmente fuentes de alimentación LED a un microscopio óptico reemplazando el condensador. La longitud de onda de emisión del LED puede conmutar entre colores mediante la acción del usuario, que pulsa un botón 467 en la FIG. 3, o automáticamente mediante el dispositivo de procesamiento 122. Las fuentes de energía de LED también pueden reemplazar la fuente de iluminación convencional de un microscopio de campo claro, con dispositivos ópticos para guiar adecuadamente la luz hacia el orificio de iluminación del microscopio.

Potenciación de tirosina

La amplificación de la señal de tiramida y los conjugados de señalización descritos en el presente documento pueden

reaccionar con residuos de tirosina disponibles en la muestra y/o las moléculas/conjugados usados para detectar y marcar las dianas. La cantidad de proteína que rodea al biomarcador que se va a detectar es variable en base a la variación natural entre muestras de tejido. Cuando se detectan biomarcadores presentes en niveles altos, o cuando se detecta la colocalización de múltiples biomarcadores, la cantidad de proteína a la que las moléculas de tiramida se pueden unir puede ser un reactivo limitante en el proceso de depósito. Una cantidad insuficiente de proteína en el tejido puede dar como resultado la detección basada en la difusión de tiramida, la posibilidad de infravalorar el nivel de expresión de los biomarcadores y la imposibilidad de detectar biomarcadores colocalizados. Una solución a estos problemas es proporcionar más sitios de unión a proteínas (es decir, tirosina) recubriendo el tejido con una solución proteínica y reticulando permanentemente la proteína al tejido usando formol u otros fijadores.

La mayoría del trabajo con TSA se ha realizado en el contexto de la detección fluorescente. La detección fluorescente de TSA se logra mediante un único depósito de tiramida de un fluoróforo, y los tiempos de depósito son típicamente bastante cortos porque la sensibilidad de la detección fluorescente es alta, mientras que el fondo asociado a la TSA tradicional se vuelve problemático con tiempos de depósito más largos. Por el contrario, la detección cromogénica de TSA puede incluir múltiples depósitos de conjugados de tiramida con tiempos de depósito prolongados. Como resultado, la técnica de TSA fluorescente no sugiere soluciones a problemas de TSA cromogénica porque la naturaleza del problema es muy diferente. En particular, se cree que la saturación de los sitios de unión de tirosina de una muestra por especies reactivas a la tiramida es un problema único particular de las químicas de detección descritas en el presente documento. Las potenciaciones en TSA que se originan a partir de la investigación de fluorescencia de TSA típicamente abordaron la difusión de los restos de tiramida reactivos y la ausencia de señal de TSA. En la técnica se han descrito soluciones a estos problemas. Por ejemplo, se describió un aumento de la viscosidad de la solución de reacción mediante la adición de polímeros solubles para disminuir la difusión y se potenció la actividad de HRP mediante la adición de vainillina y/o yodofenol. Estas soluciones no fueron suficientes para resolver algunos de los problemas observados para las químicas de detección descritas en el presente documento.

A través de varios estudios, se descubrió que la gravedad del problema identificado varía según la muestra utilizada. Por ejemplo, se descubrió que los tejidos de cáncer de mama y los tejidos de cáncer de próstata incluían diferentes niveles de sitios de unión a tiramida disponibles. También se sabe que existen diferencias en el contenido de proteínas en los compartimentos celulares (núcleo, membrana celular, citoplasma, etc.) que son la diana de varias pruebas de IHC y/o ISH. Por lo tanto, además de ser necesaria para la colocalización de TSA, los modos de realización descritos en el presente documento normalizarán el contenido de proteína (por ejemplo, sitios de unión a tiramida) y reducirá la variación entre muestras y a través de ellas. En modos de realización ilustrativos, la adición de un agente potenciador de la tirosina puede aumentar la reproducibilidad inter e intramuestra de los ensayos descritos en el presente documento.

Cuando se usan conjugados de amplificación, como se describe en el presente documento, especialmente en combinación con los conjugados de señalización descritos en el presente documento, la cantidad de proteína que rodea la diana o las dianas puede ser insuficiente. Cuando se detectan biomarcadores presentes a altos niveles, o cuando se detecta la colocalización de múltiples biomarcadores, la cantidad de proteína en la muestra a la que se pueden acoplar los reactivos de detección basados en tiramina puede ser el reactivo limitante. Una insuficiencia en los sitios de unión a tiramida puede provocar una velocidad de reacción reducida, permitir que las moléculas reactivas de tiramida se difundan fuera de la diana y, en general, da como resultado una respuesta más débil debido a cantidades más bajas de los conjugados de señalización que reaccionan en las proximidades de la diana. Se descubrió que proporcionar más sitios de unión a la muestra potenciaba la detección descrita en el presente documento. Un enfoque para potenciar los sitios de unión disponibles fue introducir una solución de proteína en la muestra. Para que la proteína permanezca tras varios lavados y para que la proteína no se difunda durante o después de las etapas de detección posteriores, la proteína se reticuló a la muestra usando un fijador (por ejemplo, formol).

En modos de realización ilustrativos, una cantidad adicional de un reactivo que contiene tirosina, tal como una proteína, se puede incubar con y fijar a la muestra biológica para proporcionar sitios de unión adicionales para múltiples conjugados de señalización o amplificación, tales como en multiplexación o amplificación. Por ejemplo, cuando se usa una sonda de translocación, se puede obtener una tinción de tres colores más clara al añadir una cantidad adicional de proteína a la muestra biológica. Además, la unión a sonda no específica se puede disminuir usando esta etapa adicional. Los modos de realización ejemplares se refieren a la adición de BSA a la muestra biológica, seguida de la fijación de la proteína usando un agente de reticulación, tal como un fijador (por ejemplo, FTN al 10 %).

Para demostrar la eficacia de la solución, primero se estableció que las proteínas exógenas se pueden fijar a una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido incluida en parafina y preparada histológicamente). Para demostrar que la proteína adicional se puede unir covalentemente a secciones de tejido incluidas en parafina, se funcionalizó la albúmina de suero bovino (BSA) con un hapteno (2,1,3-benzoxadiaol-carbamida, "BF"). La BSA-BF se añadió al tejido después de una etapa de hibridación en la que no se añadió ninguna sonda, y todos los experimentos se completaron en un dispositivo de tinción automatizada de portaobjetos Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Se añadieron 10 µg del conjugado BSA-BF al portaobjetos y se incubaron durante 16 minutos. La proteína BSA marcada con BF se fijó covalentemente al tejido mediante la adición de 100 µl de paraformaldehído al 4 %, y se incubó durante 16 minutos. La presencia de BSA-BF unido covalentemente se detectó mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-BF que se funcionalizó con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Las FIGS. 21(A-B)

muestran una microfotografía (FIG. 21(A)) de un portaobjetos de control al que no se añadió BSA-BF, y la FIG. 21(B) es una microfotografía del portaobjetos en el que se había usado BSA-BF. La enzima HRP catalizó el depósito de tiramida-TAMRA que tiñe el portaobjetos con un cromógeno rosa donde el BSA-BF estaba unido al tejido. Sin la presencia del BSA-BF, en las mismas condiciones experimentales, no se deposita ningún cromógeno rosa (FIG. 21(A)), lo que sugiere que la proteína BSA añadida exógenamente se puede fijar permanentemente en secciones de tejido incluidas en parafina.

Se descubrió que la aplicación de un conjugado de señalización, como se describe en el presente documento, para determinados modos de realización es más eficaz usando un agente potenciador de tirosina después de ciclos de depósito de tiramida que no tiñen. Para confirmar esta hipótesis, las muestras de tejido se sometieron a múltiples pases de TSA con un conjugado tiramida-hapteno. Las FIGS. 22(A-B) son microfotografías de una primera muestra (FIG. 22(A)) en la que se depositó un conjugado de señalización, como se describe en el presente documento, y la FIG. 22(B) es una segunda muestra en la que se usó una solución de potenciación de tirosina antes de la detección con el conjugado de señalización. La diferencia entre la FIG. 22(A) y la FIG. 22(B) apoya la hipótesis de que la disponibilidad de proteína en la muestra se ve disminuida por los depósitos de TSA y que la adición de potenciadores que contienen tirosina puede proporcionar una tinción más intensa. En ausencia de fijación de proteína (FIG. 22(A)), el posterior depósito del conjugado de señalización produjo un bajo nivel de señal cromogénica. Cuando la proteína exógena se fijó a la sección de tejido usando paraformaldehído (FIG. 22(B)), el conjugado de señalización produjo señales significativamente más intensas y numerosas. Los datos sugieren que la fijación de la proteína exógena a las secciones de tejido potencia la amplificación de la señal de tiramida al proporcionar sitios de unión a proteínas adicionales para que los reactivos de tiramida se unan covalentemente.

Un modo de realización divulgado de un procedimiento para detectar una diana en una muestra comprende: poner en contacto la muestra con una sonda de detección específica para la diana; poner en contacto la muestra con un potenciador de tirosina; poner en contacto la muestra con un agente de reticulación; poner en contacto la muestra con un reactivo de detección basado en tiramida; y detectar la diana en la muestra; en el que el reactivo de reticulación une covalentemente el potenciador de tirosina a la muestra. En un modo de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con un conjugado de marcaje. En otro modo de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con un conjugado de amplificación. En un modo de realización, el procedimiento comprende además detectar una segunda diana, en el que la puesta en contacto de la muestra con el potenciador de tirosina se produce después de poner en contacto la muestra con los reactivos de detección basados en tiramida para la primera diana y antes de poner en contacto la muestra con reactivos de detección basados en tiramida para la segunda diana. En un modo de realización, el potenciador de tirosina incluye una proteína. En otro modo de realización, el potenciador de tirosina es un polímero que contiene residuos de tirosina. En un modo de realización, el agente de reticulación es formol o formaldehído. En otro modo de realización, el agente de reticulación es formol tamponado neutro (FTN). En otro modo de realización, el agente de reticulación es un imidoéster, un suberimidato de dimetilo o un éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS). En otro modo de realización, el agente de reticulación es radiación de luz. En un modo de realización, el agente de reticulación es luz UV o radiación de rayos X. En un modo de realización, la detección de la diana en la muestra incluye la formación de imágenes de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la formación de imágenes fluorescentes de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la formación de imágenes de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida, donde los reactivos de detección basados en tiramida producen una señal cromogénica detectable usando microscopía de luz de campo claro. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la formación de imágenes de un conjugado de señalización. En otro modo de realización, la detección de la diana incluye la formación de imágenes de un cromógeno que se depositó en las proximidades de al menos uno de los reactivos de detección basados en tiramida.

Contratinción

La contratinción es un procedimiento de postratamiento de las muestras después de que ya se hayan teñido con agentes para detectar una o más dianas de modo que sus estructuras se puedan visualizar más fácilmente. Por ejemplo, se usa opcionalmente un contratinte antes de colocar el cubreobjetos para que la tinción inmunohistoquímica sea más clara. Los contratintes difieren en el color de un tinte primario. Numerosos contratintes son bien conocidos, tales como hematoxilina, eosina, verde de metilo, azul de metileno, Giemsa, azul de Alcian y Fast Red nuclear. En algunos ejemplos, se puede mezclar más de un tinte para producir el contratinte. Esto proporciona flexibilidad y la capacidad de elegir tintes. Por ejemplo, se puede seleccionar un primer tinte para la mezcla que tiene un atributo particular pero que aún no tiene un atributo deseado diferente. Se puede añadir un segundo tinte a la mezcla que muestre el atributo deseado que falta. Por ejemplo, azul de toluidina, DAPI y Pontamine Sky Blue se pueden mezclar para formar un contratinte. Un aspecto de la presente divulgación es que los procedimientos de contratinción conocidos en la técnica pueden combinarse con los procedimientos y composiciones divulgados, de modo que la muestra teñida es fácilmente interpretable por un lector.

V. CONJUGADOS

En el presente documento se divulgan diversos conjugados diferentes adecuados para su uso en los sistemas y

procedimientos divulgados. Las diversas clases de conjugados contemplados por la presente divulgación se describen a continuación. Se puede usar una gran cantidad de conjugados diferentes para la multiplexación.

Sondas de detección

Las sondas de detección se pueden usar para detectar una diana en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. Las sondas de detección pueden incluir un resto de unión específica que es capaz de unirse específicamente a la diana. Las sondas de detección incluyen una o más características que permiten la detección a través de un conjugado de marcaje. Sondas de detección representativas incluyen sondas de ácido nucleico y sondas de anticuerpos primarios.

En modos de realización ilustrativos, la sonda de detección es una sonda de oligonucleótidos o una sonda de anticuerpos. Como se describe en el presente documento, las sondas de detección pueden ser sondas de detección indirecta. Las sondas de detección indirecta no están configuradas para ser detectadas directamente. En particular, las sondas no están configuradas con el propósito de visualización directa. En cambio, las sondas de detección serán, en general, de dos tipos, aunque no son tipos mutuamente excluyentes. El primer tipo de sonda de detección está haptenada y el segundo tipo de sonda de detección se basa en una especie particular de anticuerpo. Se conocen otros tipos de sondas de detección en la técnica y dentro del alcance de la presente divulgación, pero estos se implementan con menos frecuencia, por ejemplo, sondas o anticuerpos marcados con aptámero, sondas o anticuerpos marcados con ácido nucleico, anticuerpos que están unidos covalentemente a otros anticuerpos para proporcionar capacidades de doble unión (por ejemplo, a través de técnicas de acoplamiento o a través de proteínas de fusión). Si bien no están configuradas como tales, algunas de las sondas de detección pueden tener propiedades que permitan su detección directa. Por ejemplo, el uso de fluoróforos de hapteno está dentro del alcance de la presente divulgación. De acuerdo con un modo de realización, la sonda de detección incluye un marcador de hapteno. Los expertos en la técnica apreciarán que una sonda de detección se puede marcar con uno o más haptenos usando diversos enfoques. La sonda de detección puede incluir un hapteno seleccionado del grupo que consiste en un hapteno oxazólico, hapteno pirazólico, hapteno tiazólico, hapteno nitroarílico, hapteno benzofuránico, hapteno triterpénico, hapteno ureico, hapteno tioureico, hapteno rotenoídico, hapteno cumarínico, hapteno ciclolignánico, hapteno dinitrofenílico, hapteno biotínico, hapteno digoxigenínico, hapteno fluoresceínico y hapteno rodamínico. En otros ejemplos, la sonda de detección es un anticuerpo monoclonal derivado de una segunda especie tal como cabra, conejo, ratón o similar. Para marcar una sonda de detección marcada con hapteno, el conjugado de marcaje incluiría un anticuerpo antihapteno. Para marcar una sonda de detección basada en especies, el conjugado de marcaje se puede configurar con un anticuerpo antiespecie.

En modos de realización ilustrativos, la presente divulgación describe sondas de ácido nucleico que se pueden hibridar con una o más secuencias de ácido nucleico diana. La sonda de ácido nucleico se hibrida preferentemente con una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones adecuadas para la hibridación, tales como condiciones adecuadas para hibridación *in situ*, transferencia Southern o transferencia Northern. Preferentemente, la parte de sonda de detección comprende cualquier ácido nucleico adecuado, tal como ARN, ADN, LNA, PNA o combinaciones de los mismos, y puede comprender nucleótidos estándar tales como ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, así como análogos de nucleótidos. LNA y PNA son dos ejemplos de análogos de ácido nucleico que forman complejos de hibridación que son más estables (es decir, tienen una T_m aumentada) que los formados entre ADN y ADN o ADN y ARN. Los análogos LNA y PNA se pueden combinar con nucleósidos de ADN y ARN tradicionales durante la síntesis química para proporcionar moléculas de ácido nucleico híbridas que se pueden usar como sondas. El uso de los análogos LNA y PNA permite modificar parámetros de hibridación tales como la T_m del complejo de hibridación. Esto permite diseñar sondas de detección que se hibridan con las secuencias diana de detección de las sondas de ácido nucleico diana en condiciones que son iguales o similares a las condiciones requeridas para la hibridación de la parte de sonda diana con la secuencia de ácido nucleico diana.

Se pueden seleccionar sondas de ácido nucleico adecuadas manualmente o con la ayuda de un algoritmo implementado por ordenador que optimice la selección de sonda en base a parámetros deseados, tales como temperatura, longitud, contenido de GC, etc. Están disponibles numerosos programas o algoritmos implementados por ordenador para su uso a través de Internet o en un ordenador personal. Por ejemplo, para generar múltiples regiones de unión a partir de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica), se identifican regiones de secuencia desprovistas de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras secuencias indeseables, por ejemplo, que producen fondo), por ejemplo, manualmente o usando un algoritmo informático, tal como RepeatMasker. Procedimientos para crear sondas sin repeticiones e inequívocamente específicas se encuentran, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2012/0070862. Dentro de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) que abarca de varias a varios cientos de kilobases, típicamente se identifican numerosas regiones de unión que están sustancialmente o preferentemente completamente libres de secuencias de ácido nucleico repetitivas (u otras secuencias indeseables, por ejemplo, que producen fondo).

En algunos modos de realización, se incorpora un hapteno en la sonda de ácido nucleico, por ejemplo, mediante el uso de un nucleósido haptenilado. Procedimientos para conjugar haptenos y otros marcadores con dNTP (por ejemplo, para facilitar la incorporación en sondas marcadas) son bien conocidos en la técnica. De hecho, numerosos dNTP

marcados están disponibles comercialmente, por ejemplo de Invitrogen Detection Technologies (Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Un marcador se puede unir directa o indirectamente a un dNTP en cualquier localización del dNTP, tal como un fosfato (por ejemplo, fosfato α , β o γ), un anillo o posición exocíclica, o un azúcar. Las sondas se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos conocido adecuado. En algunos modos de realización, las sondas de detección se sintetizan químicamente usando nucleósidos de fosforamidita y/o análogos de nucleósidos de fosforamidita. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las sondas se sintetizan usando nucleósidos de fosforamidita de ARN o ADN estándar. En algunos modos de realización, las sondas se sintetizan usando fosforamiditas de LNA o fosforamiditas de PNA, solas o en combinación con nucleósidos de fosforamidita estándar. En algunos modos de realización, se introducen haptenos en fosforamiditas abásicas que contienen los restos detectables deseados. Otros procedimientos también se pueden usar para la síntesis de sondas de detección. Por ejemplo, se puede usar un cebador hecho de análogos de LNA o una combinación de análogos de LNA y nucleótidos estándar para la transcripción del resto de la sonda. Como otro ejemplo, se utiliza un cebador que comprende restos detectables para la transcripción del resto de la sonda. En otros modos de realización más, los segmentos de la sonda producidos, por ejemplo, mediante transcripción o síntesis química, se pueden unir mediante unión enzimática o química.

Se puede usar una variedad de haptenos en la parte de restos detectables de la sonda de detección. Dichos haptenos incluyen, pero no se limitan a, pirazoles, en particular nitropirazoles; compuestos de nitrofenilo; benzofurazanos; triterpenos; ureas y tioureas, en particular fenilureas, e incluso más en particular feniltioureas; rotenona y derivados de rotenona, también denominados en el presente documento rotenoides; oxazol y tiazoles, en particular oxazol y tiazolsulfonamidas; cumarina y derivados de cumarina; ciclolignanos, ejemplificados por podofilotoxina y derivados de podofilotoxina; y combinaciones de los mismos. Derivados de fluoresceína (FITC, TAMRA, Texas Red, etc.), digoxigenina (DIG), 5-nitro-3-pirazolcarbamida (nitropirazol, NP), 4,5-dimetoxi-2-nitrocinamida (nitrocinamida, NCA), 2-(3,4-dimetoxifenil)-quinolina-4-carbamida (fenilquinolona, DPQ), 2,1,3-benzoxadiazol-5-carbamida (benzofurazano, BF), 3-hidroxi-2-quinoxalinacarbamida (hidroxiquinoxalina, HQ), 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (DABSYL), rotenona isoxazolina (Rot), (E)-2-(2-(2-oxo-2,3-dihidro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-4-il)fenozil)acetamida (benzodiazepina, BD), ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (cumarina 343, CDO), 2-acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida (tiazolsulfonamida, TS) y p-metoxifenilpirazopodofilamida (Podo). Estos haptenos y su uso en sondas se describen con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 7.695.929.

Conjugados de marcaje y conjugados de marcaje secundario

En modos de realización ilustrativos, el conjugado de marcaje se une específicamente a la sonda de detección y se configura para marcar la diana con una enzima. Como se describió anteriormente, las sondas de detección configuradas a partir de una segunda especie o para incluir un hapteno pueden ser detectadas por un anticuerpo antiespecie o un anticuerpo antihapteno. Un enfoque para configurar un conjugado de marcaje ha sido acoplar directamente una enzima al anticuerpo antiespecie o antihapteno. Los conjugados de este tipo, que pueden incluir, o no, diversos conectores, también se describen en la patente de EE. UU. n.º 7.695.929. El conjugado de marcaje incluye una o más enzimas. Enzimas ejemplares incluyen oxidorreductasas o peroxidadasas. El conjugado de señalización incluye un resto reactivo latente y un resto cromógeno. La enzima cataliza la conversión del resto reactivo latente en un resto reactivo que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directa sobre la diana.

El conjugado de marcaje secundario se usa en conexión con los conjugados de amplificación, como se describe en el presente documento. Los conjugados de marcaje secundario se configuran de la misma manera que los conjugados de marcaje, excepto que están configurados para marcar haptenos depositados a través de un proceso de amplificación en lugar de haptenos conjugados con conjugados de detección. En modos de realización ilustrativos, un conjugado de marcaje secundario comprende un anticuerpo antihapteno conjugado con una enzima. En un modo de realización, la enzima es una oxidorreductasa o una peroxidasa.

Conjugado de señalización

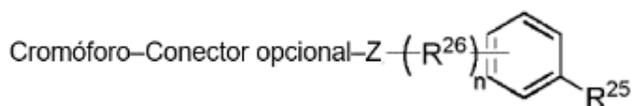
Otro tipo de conjugado divulgado en el presente documento es un conjugado de señalización. El conjugado de señalización proporciona la señal detectable que se usa para detectar la diana, de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización comprende un resto reactivo latente y un resto cromóforo.

Los conjugados de señalización pueden configurarse para absorber luz de manera más selectiva que los cromógenos disponibles tradicionalmente. La detección se lleva a cabo mediante la absorbancia de la luz por el conjugado de señalización; por ejemplo, la absorbancia de al menos aproximadamente un 5 % de la luz incidente facilitaría la detección de la diana. En otras manchas más oscuras, se absorbería al menos aproximadamente un 20 % de la luz incidente. La absorbancia no uniforme de la luz dentro de los espectros visibles da como resultado que el resto cromóforo aparezca coloreado. Los conjugados de cromógeno divulgados en el presente documento pueden aparecer coloreados debido a su absorbancia; los conjugados de cromógeno pueden aparecer de color rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta dependiendo de la absorbancia espectral asociada con el resto cromóforo. De acuerdo con otro aspecto, los restos cromóforos pueden tener absorbancias espectrales más estrechas que las absorbancias de los

5 cromógenos usados tradicionalmente (por ejemplo, DAB, Fast Red, Fast Blue). En modos de realización ilustrativos, la absorbancia espectral asociada al primer resto cromóforo del primer conjugado de señalización tiene una anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm.

10 Las absorbancias espectrales estrechas permiten que el resto cromóforo de conjugado de señalización se analice de forma diferente que los cromógenos tradicionales. Si bien tiene características mejoradas en comparación con los cromógenos tradicionales, la detección de los conjugados de señalización sigue siendo sencilla. La detección puede incluir el uso de un microscopio de campo claro, sistemas de formación de imágenes divulgados en el presente documento o un escáner digital equivalente.

15 Un modo de realización del conjugado de señalización divulgado se ilustra en las FIGS. 10(A) y 10(B). Con referencia a las FIGS. 10(A-B), el conjugado de señalización 412 comprende un resto reactivo latente 404 y un resto cromóforo 6; en otro modo de realización, un conjugado de señalización alternativo 414 puede incluir un conector 408 para conjugar el resto cromóforo 406 con el resto reactivo latente 404. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización tiene la siguiente fórmula 1 general:



Fórmula 1

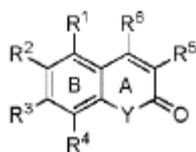
25 El conjugado de señalización divulgado comprende típicamente un resto reactivo latente como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el resto reactivo latente puede ser el mismo o diferente del conjugado de amplificación divulgado; sin embargo, cada resto reactivo latente es capaz de formar una especie radical reactiva y tiene la fórmula general proporcionada en el presente documento. Como se muestra en la fórmula 1, el conjugado de señalización puede comprender un conector opcional. Si se usa un conector, se puede seleccionar de cualquiera de los conectores divulgados en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el conector se selecciona para mejorar la solubilidad de solución hidrófila del conjugado de señalización y/o para mejorar la funcionalidad de conjugado en la muestra biológica. En un modo de realización divulgado particular, el conector es un conector de óxido de alquileo, tal como un conector de polietilenglicol; sin embargo, cualquiera de los conectores divulgados en el presente documento se puede usar para el conjugado de señalización.

35 Resto cromóforo

40 En general, un resto cromóforo se describe como la parte de una molécula responsable de su color. Los colores surgen cuando una molécula absorbe determinadas longitudes de onda de la luz visible y transmite o refleja otras. El cromóforo es una región de la molécula en la que la diferencia de energía entre dos orbitales moleculares diferentes está dentro del intervalo del espectro visible, en el que la luz visible que interactúa con esa región puede ser absorbida. En general, la absorbancia se asocia a una transición de electrones desde su estado fundamental a un estado excitado. Las moléculas que tienen un estado fundamental para las diferencias de energía de estado excitado dentro del espectro visible a menudo son estructuras de carbono conjugadas. En estos compuestos, los electrones hacen la transición entre niveles de energía que son orbitales pi extendidos, creados por una serie de enlaces simples y dobles alternados, a menudo en sistemas aromáticos. Ejemplos comunes incluyen diversos colorantes alimentarios, tintes de tejidos (compuestos azoicos), indicadores de pH, licopeno, β -caroteno y antocianinas. La estructura de la molécula imparte la característica de los orbitales pi que dan como resultado el nivel de energía. Típicamente, alargar o extender un sistema conjugado con más enlaces insaturados (múltiples) en una molécula tenderá a desplazar la absorción a longitudes de onda mayores. Las reglas de Woodward-Fieser se pueden usar para aproximar la longitud de onda de absorción máxima en el ultravioleta visible en compuestos orgánicos con sistemas de enlaces pi conjugados.

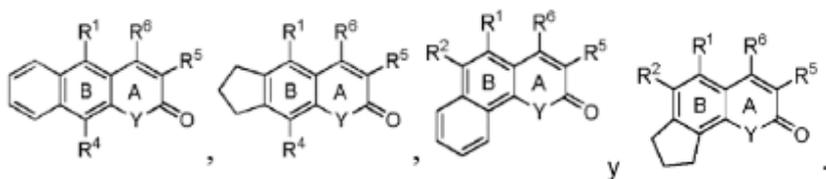
50 En modos de realización ilustrativos, los complejos metálicos pueden ser cromóforos. Por ejemplo, un metal en un complejo de coordinación con ligandos a menudo absorberá la luz visible. Por ejemplo, la clorofila y la hemoglobina (el transportador de oxígeno de la sangre de los animales vertebrados) son cromóforos que incluyen complejos metálicos. En estos dos ejemplos, un metal está complejoado en el centro de un anillo de porfirina: el metal es hierro en el grupo hemo de la hemoglobina, o magnesio en el caso de la clorofila. El sistema de enlace pi altamente conjugado del anillo de porfirina absorbe la luz visible. La naturaleza del metal central también puede influir en el espectro de absorción del complejo de metaloporfirina o en propiedades como la duración del estado excitado.

60 En modos de realización ilustrativos, el resto cromóforo es una cumarina o derivado de cumarina. A continuación se proporciona una fórmula general para cumarina y derivados de cumarina.



Fórmula 2

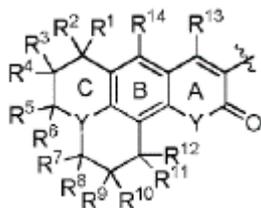
5 En el presente documento se definen R¹-R⁶ con referencia a la fórmula 2. Al menos uno de los sustituyentes R¹-R⁶ también se une típicamente a un conector o al resto reactivo latente (por ejemplo, una tiramida o un derivado de tiramida). Determinados modos de realización de trabajo han usado la posición indicada como que tiene un sustituyente R⁵ para el acoplamiento a un conector o resto reactivo latente (por ejemplo, una tiramida o un derivado de tiramida). Se cree que sustituyentes distintos de hidrógeno en la posición 4 inactivan la fluorescencia, pero son
10 útiles dentro del alcance de la presente divulgación. Se selecciona Y entre oxígeno, nitrógeno o azufre. Dos o más de los sustituyentes R¹-R⁶ disponibles para formar dichos compuestos también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Modos de realización ejemplares de estos tipos de compuestos incluyen:



15

Un experto en la técnica apreciará que los anillos también pueden ser heterocíclicos y/o heteroarilos.

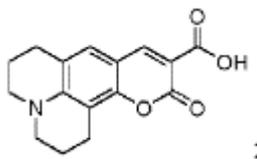
20 Modos de realización de trabajo comprenden típicamente sistemas de anillo A-D fusionados que tienen al menos una posición de acoplamiento de conector, tiramida o derivado de tiramida, con una posición de acoplamiento posible que se indica a continuación:



25

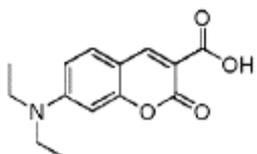
Fórmula 3

30 Con referencia a la fórmula 3, los grupos variables R e Y son como se indica en el presente documento. Más típicamente, R¹-R¹⁴ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior. Modos de realización particulares de cromóforos basados en cumarina incluyen ácido 2,3,6,7-tetrahidro-11-oxo-1H,5H,11H-[1]benzopirano[6,7,8-ij]quinolizina-10-carboxílico

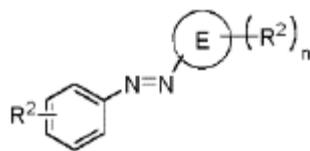


35

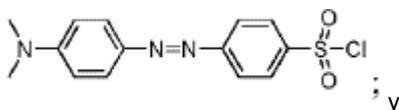
y ácido 7-(dietilamino)cumarin-3-carboxílico



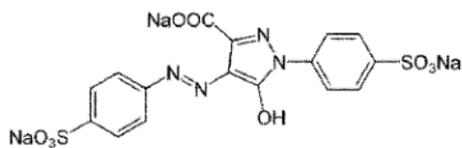
Otra clase de restos cromógenos adecuados para su uso en el presente documento incluye cromógenos que contienen diazo. Estos cromóforos particulares pueden tener una fórmula como se ilustra a continuación.



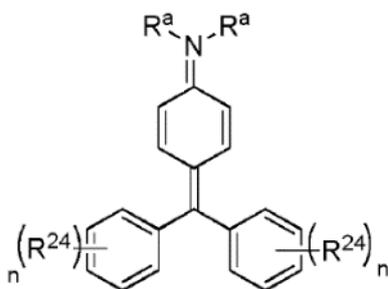
5 Con respecto a esta fórmula, el anillo E se puede seleccionar entre fenilo, imidazol, pirazol, oxazol y similares. Cada R² se puede seleccionar independientemente de los grupos enumerados en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, cada R² se selecciona independientemente entre amina, amina sustituida, fenilo, hidroxilo, cloruro de sulfonilo, sulfonato, carboxilato y combinaciones de los mismos; y n puede variar de cero a 5. Los modos de realización divulgados particulares se pueden seleccionar de los siguientes cromóforos diazoicos: DABSYL, que tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 436 nm y tiene la siguiente estructura química



15 tartrazina, que tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 427 nm y tiene la siguiente estructura química

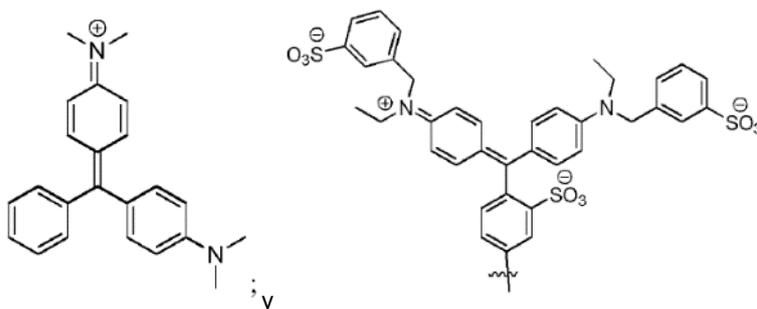


20 Aun en otros modos de realización, el cromóforo puede ser un compuesto de triarilmetano. Los compuestos de triarilmetano dentro del alcance de la presente divulgación pueden tener la siguiente fórmula.

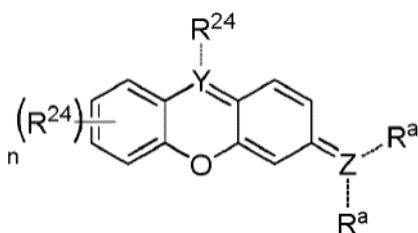


Fórmula 4

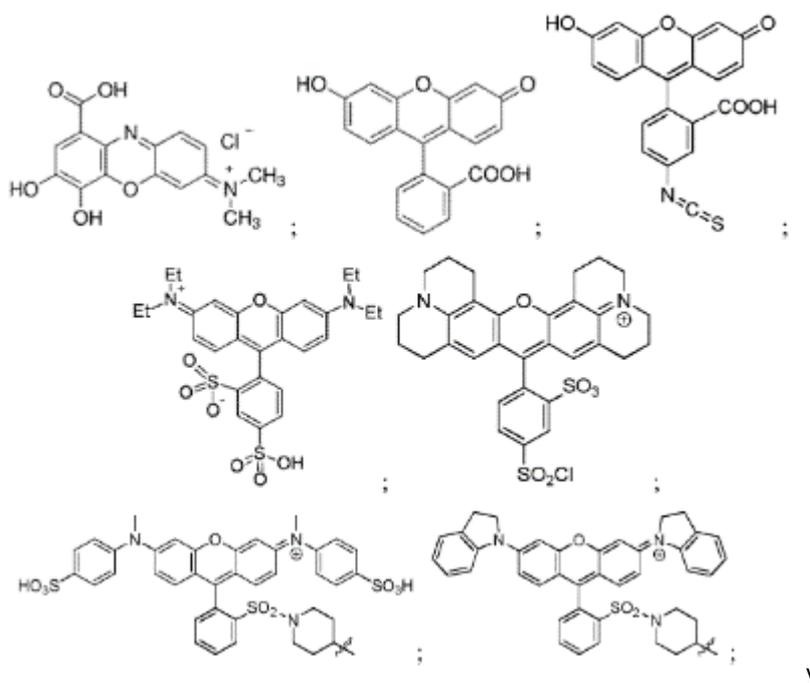
25 Con respecto a la fórmula 4, cada Rᵃ se puede seleccionar independientemente entre hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo; y cada R²⁴ se puede seleccionar entre amina, amina sustituida, hidroxilo, alcoxi y combinaciones de los mismos; cada n puede variar independientemente de cero a 5. A continuación se proporcionan cromóforos ejemplares:



30 En otros modos de realización divulgados, el resto cromóforo puede tener la siguiente fórmula



5 en la que cada R^a se puede seleccionar independientemente entre hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo; cada R²⁴ se puede seleccionar independientemente entre los grupos proporcionados en el presente documento, incluyendo arilo sustituido, que comprende un grupo arilo sustituido con uno o más grupos seleccionados entre uno cualquiera de R¹-R²³, que se divulgan en el presente documento; Y puede ser nitrógeno o carbono; Z puede ser nitrógeno u oxígeno; y n puede variar de cero a 4. En modos de realización divulgados particulares, Z es nitrógeno y cada R^a puede ser alifático y estar fusionado a un átomo de carbono del anillo al que se une la amina que comprende R^a, o cada uno de R^a se puede unir para formar un anillo alifático o aromático de 4 o 6 miembros, que puede ser sustituido
10 adicionalmente. A continuación se proporcionan modos de realización a modo de ejemplo:



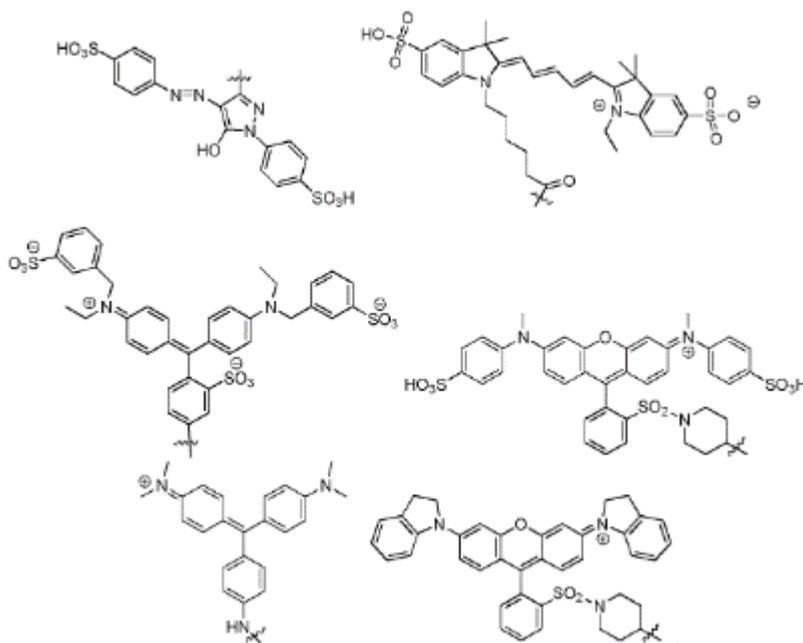
15 otros derivados de rodamina, tales como tetrametilrodaminas (incluyendo TMR, TAMRA y derivados de isotiocianatos reactivos), y derivados de diarilrodamina, tales como los tintes QSY 7, QSY 9 y QSY 21.

Cromóforos ejemplares se seleccionan del grupo que consiste en DAB; AEC; CN; BCIP/NBT; Fast Red; Fast Blue; fucsina; NBT; ALK GOLD; acetilazida Cascade Blue; éster succinimidílico del ácido carboxílico/ácido dapoxilsulfónico; DY-405; éster succinimidílico de Alexa Fluor 405; éster succinimidílico de Cascade Yellow; éster succinimidílico de piridiloxazol (PyMPO); éster succinimidílico de Pacific Blue; DY-415; éster succinimidílico del ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico; DYG-425; fosforamidita 6-FAM; Lucifer Yellow; yodoacetamida; éster succinimidílico de Alexa Fluor 430; éster succinimidílico de Dabcilo; cloruro/fluoruro de NBD; éster succinimidílico de QSY 35; DY-485XL; éster succinimidílico de Cy2; DY-490; éster succinimidílico del ácido carboxílico Oregon Green 488; éster succinimidílico de Alexa Fluor 488; éster succinimidílico de BODIPY 493/503 C3; DY-480XL; éster succinimidílico de BODIPY FL C3; éster succinimidílico de BODIPY FL C5; éster succinimidílico de BODIPY FL-X; DYQ-505; éster succinimidílico del ácido carboxílico Oregon Green 514; DY-510XL; DY-481XL; éster succinimidílico de 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); DY-520XL; DY-521XL; éster succinimidílico de BODIPY R6G C3; isotiocianato de eritrosina; éster succinimidílico de 5-carboxi-2',4',5',7'-tetrabromosulfonafluoresceína; éster succinimidílico de Alexa Fluor 532; éster succinimidílico de 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); éster succinimidílico de BODIPY 530/550 C3; DY-530; éster succinimidílico de BODIPY TMR-X; DY-555; DYQ-1; DY-556; éster succinimidílico de Cy3; DY-547; DY-549; DY-550; éster succinimidílico de Alexa Fluor 555; éster succinimidílico de Alexa Fluor 546; DY-548; éster succinimidílico de BODIPY 558/568 C3; éster succinimidílico de Rodamina Red-X; éster succinimidílico de QSY 7; éster succinimidílico de BODIPY 564/570 C3; éster succinimidílico de BODIPY 576/589 C3; éster succinimidílico de carboxi-X-rodamina (ROX); éster succinimidílico de Alexa Fluor 568; DY-590; éster succinimidílico de BODIPY 581/591 C3; DY-591; éster succinimidílico de BODIPY TR-X; éster succinimidílico de Alexa Fluor 594;

DY-594; éster succinimidílico de carboxinaftofluoresceína; DY-605; DY-610; éster succinimidílico de Alexa Fluor 610; DY-615; éster succinimidílico de BODIPY 630/650-X; erioglaucina; éster succinimidílico de Alexa Fluor 633; éster succinimidílico de Alexa Fluor 635; DY-634; DY-630; DY-631; DY-632; DY-633; DYQ-2; DY-636; éster succinimidílico de BODIPY 650/665-X; DY-635; éster succinimidílico de Cy5; éster succinimidílico de Alexa Fluor 647; DY-647; DY-648; DY-650; DY-654; DY-652; DY-649; DY-651; DYQ-660; DYQ-661; éster succinimidílico de Alexa Fluor 660; éster succinimidílico de Cy5,5; DY-677; DY-675; DY-676; DY-678; éster succinimidílico de Alexa Fluor 680; DY-679; DY-680; DY-682; DY-681; DYQ-3; DYQ-700; éster succinimidílico de Alexa Fluor 700; DY-703; DY-701; DY-704; DY-700; DY-730; DY-731; DY-732; DY-734; DY-750; éster succinimidílico de Cy7; DY-749; DYQ-4; y éster succinimidílico de Cy7,5.

En modos de realización divulgados particulares, el resto cromóforo se puede seleccionar entre tartrazina, éster succinimidílico del ácido 7-dietilaminocumarina-3-carboxílico, cloruro de sulfonilo de Dabsyl, éster carboxi succinimidílico de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DY-495), éster succinimidílico del ácido carboxílico de Rhodamine Green (DY-505), isotiocianato de eosina (EITC), éster succinimidílico de 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET), éster succinimidílico de carboxirrodamina 6G, éster succinimidílico de carboxitetrametilrodamina (TMR, TAMRA) (DY-554), éster succinimidílico de QSY 9, cloruro de sulfonilo de sulforrodamina B (DY-560), Texas Red (sulforrodamina 101), galocianina, Fast Green FCF, verde malaquita, isotiocianato y éster succinimidílico de QSY 21. En determinados modos de realización divulgados, el resto cromóforo del conjugado de señalización es cloruro de sulfonilo de Dabsyl, FITC, éster succinimidílico del ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico, éster succinimidílico del ácido carboxílico Rhodamine Green (DY-505), isotiocianato de eosina (EITC), éster succinimidílico de 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET), éster succinimidílico de carboxitetrametilrodamina (TMR, TAMRA) (DY-554), cloruro de sulfonilo de sulforrodamina B (DY-560), Texas Red (sulforrodamina 101) y galocianina.

A continuación se proporcionan otros restos cromógenos ejemplares que se usan para el conjugado de señalización:



El conjugado de señalización puede tener máximos de absorción y amplitudes de absorción particularmente adecuados para la formación de imágenes de campo claro de dianas en muestras biológicas. En un modo de realización, un conjugado de señalización está configurado para proporcionar un pico de absorbancia que tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 800 nm, entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 750 nm, o entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 700 nm. Estos intervalos de longitud de onda son de particular interés porque se traducen en colores visibles para los humanos. Sin embargo, los enfoques descritos en el presente documento también se podrían aplicar a restos cromóforos útiles para metodologías de diagnóstico en el infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo (IR) o ultravioleta (UV). Los picos no visibles de los conjugados de señalización se pueden representar y convertir en colores. En algunos modos de realización, el iluminador 140 de las FIGS. 1 y 3 pueden incluir una o más fuentes IR y/o UV. Con referencia a la FIG. 3, por ejemplo, las fuentes de luz 180 pueden ser fuentes IR y/o UV que emiten energía IR/UV hacia el espécimen. El dispositivo de captura de imágenes 120 puede configurarse para capturar una imagen del espécimen basándose en la energía IR/UV del espécimen. La imagen capturada se puede convertir en una imagen en color visible (por ejemplo, una imagen monocroma con colores falsos). Si se capturan múltiples imágenes en color visibles para la multiplexación, el conjunto de imágenes se puede

combinar para producir una imagen compuesta (por ejemplo, una imagen mejorada digitalmente).

En un modo de realización, el conjugado de señalización está configurado para producir una señal coloreada seleccionada del grupo que consiste en rojo, naranja, amarillo, verde, añil, violeta o mezclas de los mismos. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 400 nm y 430 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal amarilla. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 430 nm y 490 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal naranja. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 490 nm y 560 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal roja. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 560 nm y 570 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal violeta. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 570 nm y 580 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal añil. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 580 nm y 620 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal azul. En un modo de realización, un conjugado de señalización tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de entre aproximadamente 620 nm y aproximadamente 800 nm. En otro modo de realización, el conjugado de señalización produce una señal verde a azul-verde.

En un modo de realización, el conjugado de señalización está configurado para tener una anchura a media altura (AMA) de entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 60 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 150 nm, o entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 250 nm. En modos de realización divulgados particulares, la AMA es inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 250 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 50 nm. En modos de realización ilustrativos, se describe un conjugado de señalización que tiene una AMA inferior a aproximadamente 150 nm. En un modo de realización, la AMA es inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 120 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 80 nm, inferior a aproximadamente 60 nm, inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 40 nm, inferior a aproximadamente 30 nm, entre aproximadamente 10 nm y 150 nm, entre aproximadamente 10 nm y 120 nm, entre aproximadamente 10 nm y 100 nm, entre aproximadamente 10 nm y 80 nm, entre aproximadamente 10 nm y 60 nm, entre aproximadamente 10 nm y 50 nm o entre aproximadamente 10 nm y 40 nm.

En otro modo de realización, el conjugado de señalización tiene una absorptividad molar promedio superior a de aproximadamente 5000 M⁻¹ cm⁻¹ a aproximadamente 250 000 M⁻¹ cm⁻¹. Los tintes Cy pueden tener coeficientes de extinción > 200 000 M⁻¹ cm⁻¹. Por ejemplo, una absorptividad molar promedio superior a aproximadamente 5000 M⁻¹ cm⁻¹, superior a aproximadamente 10 000 M⁻¹ cm⁻¹, superior a aproximadamente 20 000 M⁻¹ cm⁻¹, superior a aproximadamente 40 000 M⁻¹ cm⁻¹ o superior a aproximadamente 80 000 M⁻¹ cm⁻¹. Aún en otro modo de realización, el conjugado de señalización tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 M. Por ejemplo, el conjugado de señalización tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,1 mM, al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 100 mM, o al menos aproximadamente 1 M. En un modo de realización, el conjugado de señalización es estable frente a la precipitación en una solución acuosa tamponada durante más de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 30 meses. Por ejemplo, el conjugado de señalización es estable frente a la precipitación en una solución acuosa tamponada durante más de aproximadamente 1 mes, más de aproximadamente 3 meses, más de aproximadamente 6 meses, más de aproximadamente 12 meses, más de aproximadamente 18 meses o más de aproximadamente 24 meses.

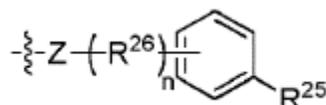
La FIG. 23(A) es una primera microfotografía y la FIG. 23(B) es una segunda microfotografía de una proteína teñida (IHC de HER2 (4B5) en xenoinjertos Calu-3) usando el conjugado de señalización que tiene los espectros de absorción mostrados en la FIG. 24. La línea A corresponde al conjugado de señalización usado para la FIG. 23(A) y la línea B corresponde al conjugado de señalización usado para la FIG. 23(B); obsérvese que cada conjugado de señalización se analizó con espectrometría en solución antes de la tinción y en el portaobjetos después de haber detectado el HER2 (las líneas discontinuas que representan los espectros obtenidos en el tejido). El conjugado de señalización usado para teñir el tejido mostrado en la FIG. 23(A) tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 456 nm y una AMA de aproximadamente 111 nm. El conjugado de señalización usado para teñir el tejido mostrado en la FIG. 23(B) tiene una $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente 628 nm y una AMA de aproximadamente 70 nm.

Resto reactivo latente

El resto reactivo latente está configurado para experimentar una activación catalítica para formar una especie reactiva que se puede unir covalentemente a la muestra o a otros componentes de detección. La activación catalítica es impulsada por una o más enzimas (por ejemplo, enzimas oxidorreductasas y enzimas peroxidasas, como la peroxidasa de rábano picante). En presencia de peróxido, estas enzimas pueden catalizar la formación de especies reactivas. Estas especies reactivas, por ejemplo, radicales libres, son capaces de reaccionar con compuestos fenólicos proximales a su generación, es decir, cerca de la enzima. Los compuestos fenólicos disponibles en la muestra son a menudo residuos de tirosilo de las proteínas. Como resultado, el resto reactivo latente se puede añadir

a una muestra que contiene proteína en presencia de una enzima peroxidasa y un peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), que puede catalizar la formación de radicales y posteriormente hacer que el resto reactivo forme un enlace covalente con la muestra biológica.

- 5 En modos de realización divulgados particulares, el resto reactivo latente comprende al menos un resto aromático. En modos de realización ejemplares, el resto reactivo latente comprende un resto fenólico y se une a un grupo fenol de un aminoácido tirosina. Sin embargo, es deseable unir específicamente el conjugado de marcaje por medio del resto reactivo latente en, o en estrecha proximidad con, una diana deseada a la muestra. Este objetivo se puede lograr
- 10 inmovilizando la enzima en la región diana, como se describe en el presente documento. Solo los restos reactivos latentes que se encuentren muy próximos a la enzima inmovilizada reaccionarán y formarán enlaces con los residuos de tirosina en los alrededores de, o proximales a, la enzima inmovilizada, incluidos residuos de tirosina en la propia enzima, residuos de tirosina en el anticuerpo con el que se conjuga la enzima y/o residuos de tirosina en la muestra que son proximales a la enzima inmovilizada. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de marcaje se puede unir proximalmente, tal como hasta una distancia de aproximadamente 800 nm, hasta una distancia de aproximadamente 100 nm, hasta una distancia de aproximadamente 10 nm, o hasta una distancia de aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Por ejemplo, el residuo de tirosina puede estar a una distancia de aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 800 nm, aproximadamente 100 angstroms hasta aproximadamente 50 nm, aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 10 nm o aproximadamente 10 angstroms hasta aproximadamente 5 nm de la enzima inmovilizada. Dicha unión proximal permite que la diana se detecte con al menos el mismo grado de especificidad que los procedimientos de tinción convencionales usados con los procedimientos de detección divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los modos de realización del procedimiento divulgado permiten distinguir estructuras subcelulares, por ejemplo, la membrana nuclear frente a la región nuclear, la membrana celular frente a la región citoplásmica, etc.
- 25 El resto reactivo latente puede ser la fórmula general ilustrada a continuación.



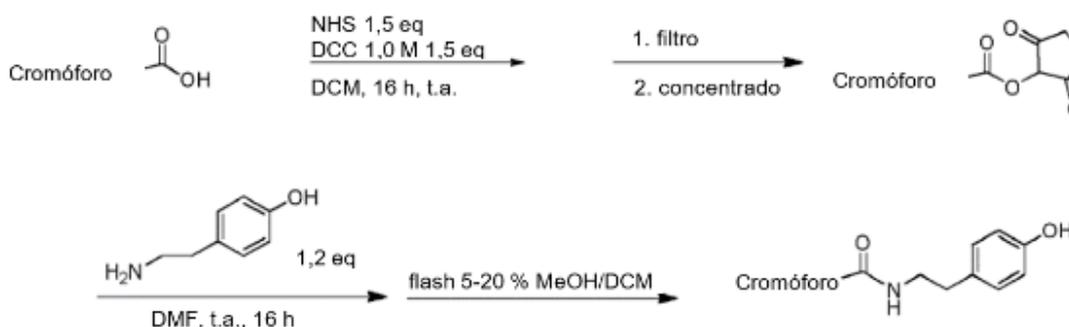
Fórmula 5

- 30 Con referencia a la fórmula 5, R²⁵ se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, éter, amina y amina sustituida; R²⁶ se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, -OR_m, -NR_m y -SR_m, donde m es 1-20; n es 1-20; Z se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y NR^a, donde R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, arilo y alquilarilo. Un modo de realización ejemplar del resto reactivo latente es tiramina (o tiramida, que es el nombre dado a una molécula de tiramina conjugada con el marcador detectable y/o el conector opcional) o un derivado de la misma.

- 35 En modos de realización divulgados particulares, el conjugado de señalización tiene una concentración mínima, cuando se deposita covalentemente sobre la muestra, de más de aproximadamente 1x10¹¹ moléculas por cm²·µm o de más de aproximadamente 1x10¹³ moléculas por cm²·µm dentro de la muestra biológica. En modos de realización divulgados particulares, la concentración de conjugado de señalización depositado varía de aproximadamente 1x10¹¹ moléculas por cm²·µm a aproximadamente 1x10¹⁶ moléculas por cm²·µm.

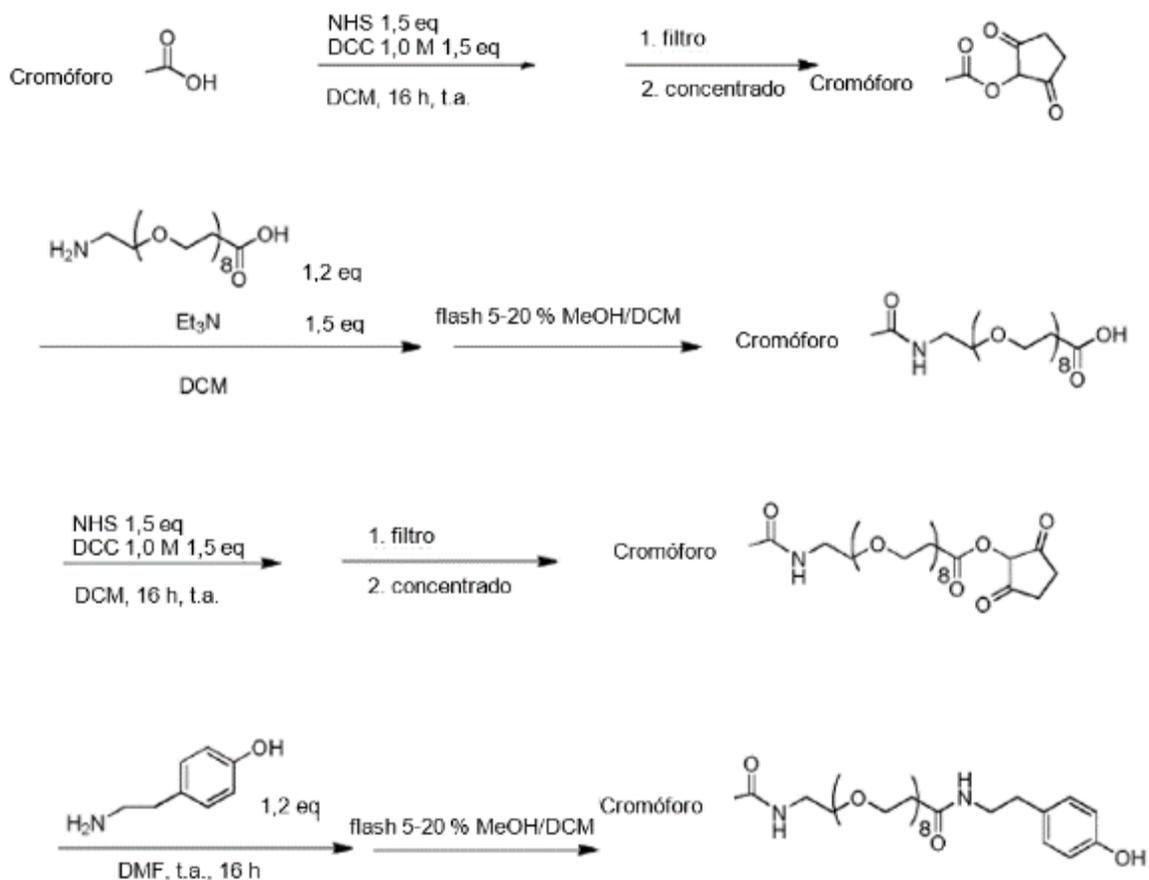
- 40 Los modos de realización del conjugado de señalización divulgado se pueden realizar usando el procedimiento general ilustrado en el esquema 1. En modos de realización divulgados particulares, el conjugado se forma sin un conector opcional. Por ejemplo, un resto de ácido carboxílico del cromóforo se puede acoplar con una molécula de tiramina o derivado de tiramina convirtiendo primero el ácido carboxílico en un éster activado y luego formando un enlace amida entre el cromóforo y la molécula de tiramina o derivado de tiramina. Un procedimiento ejemplar para preparar un conjugado de señalización sin un conector se ilustra a continuación en el esquema 2.

50



Esquema 1

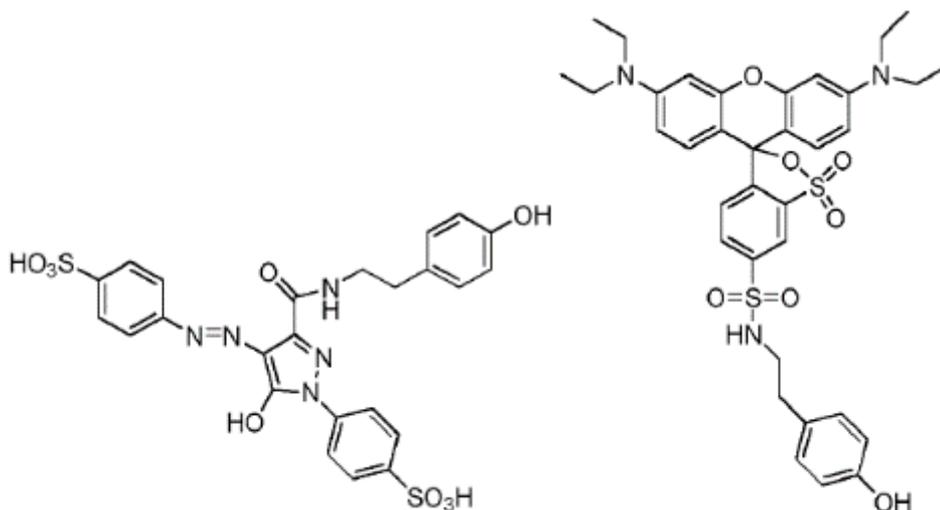
5 En modos de realización en los que el conector está presente, el resto de ácido carboxílico del cromóforo se puede acoplar con un conector terminado en amina (por ejemplo, un óxido de alquileo) convirtiendo primero el ácido carboxílico en un éster activado y luego formando un enlace amida entre el cromóforo y el conector terminado en amina. El extremo restante del conector se puede activar y posteriormente acoplar con una molécula de tiramina o derivado de tiramina. Un procedimiento ejemplar para preparar el conjugado de señalización se proporciona a continuación en el esquema 2.



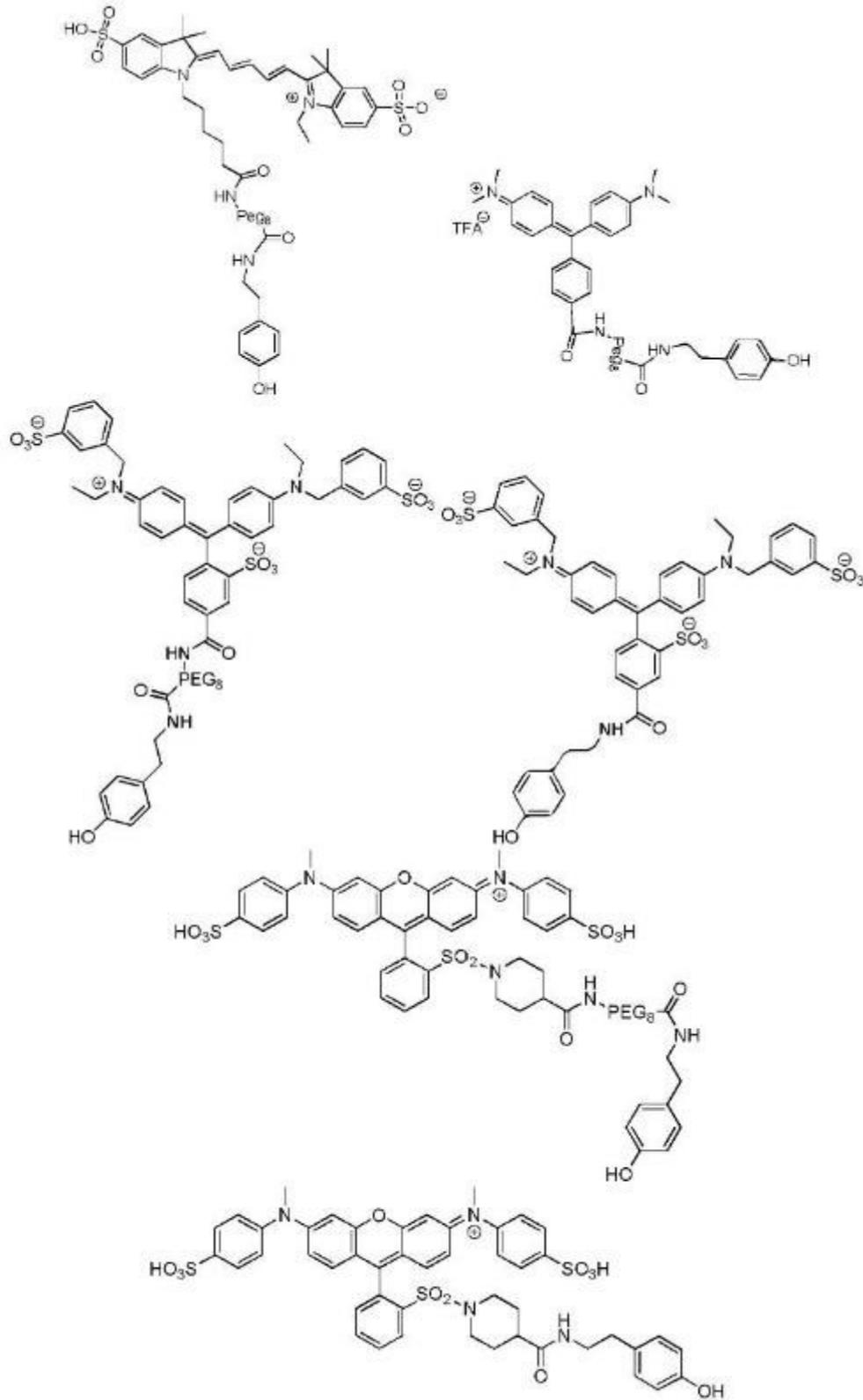
10

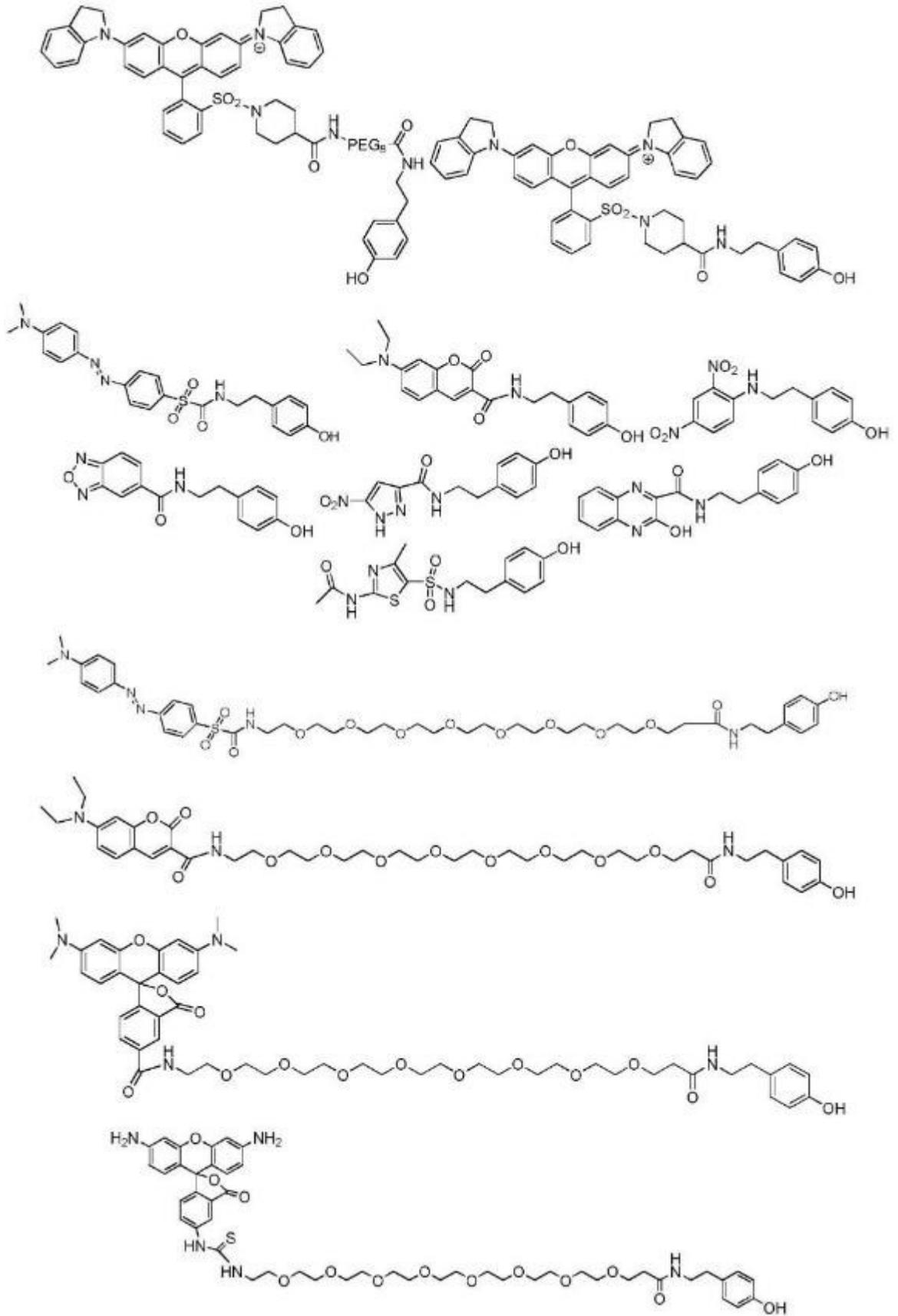
Esquema 2

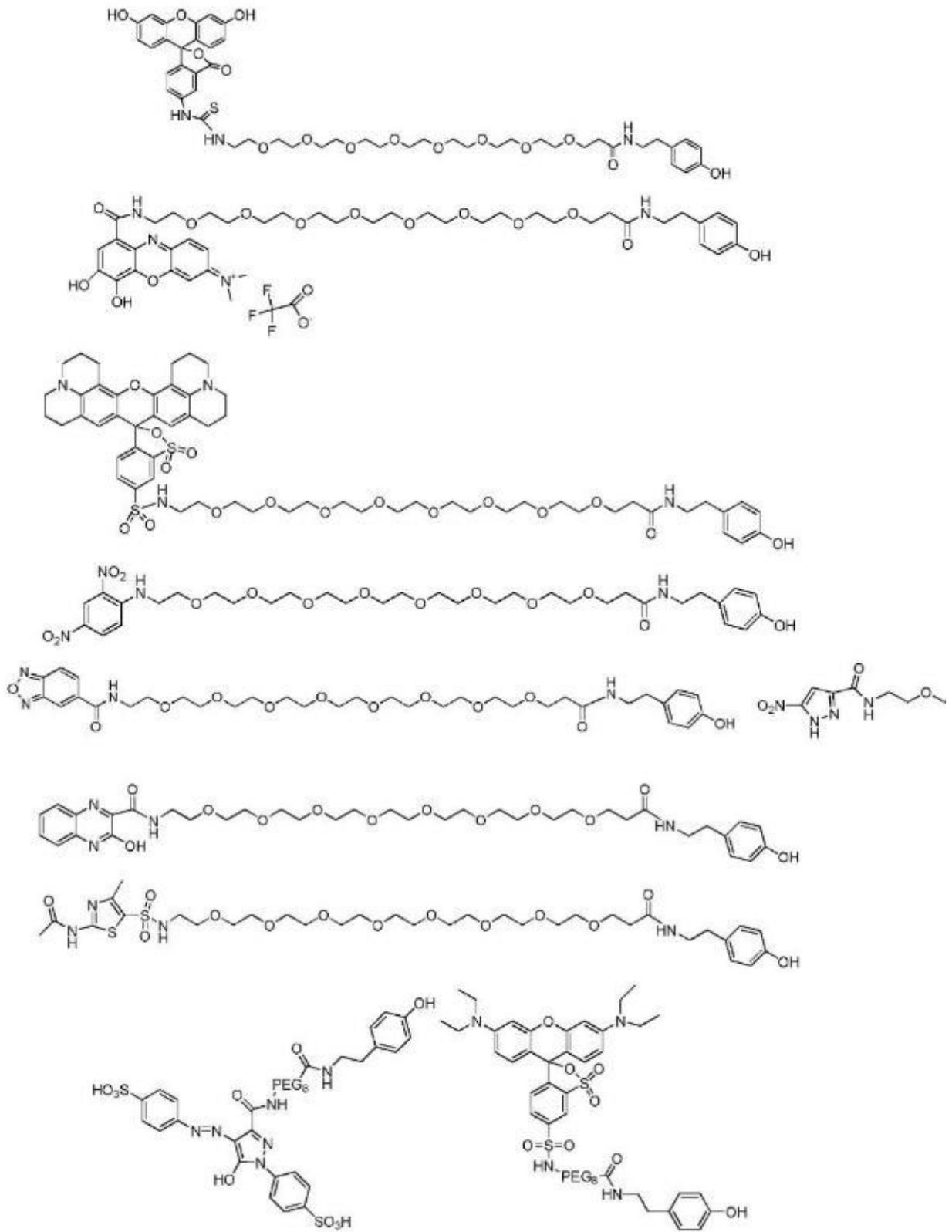
A continuación se proporcionan conjugados de señalización ejemplares.

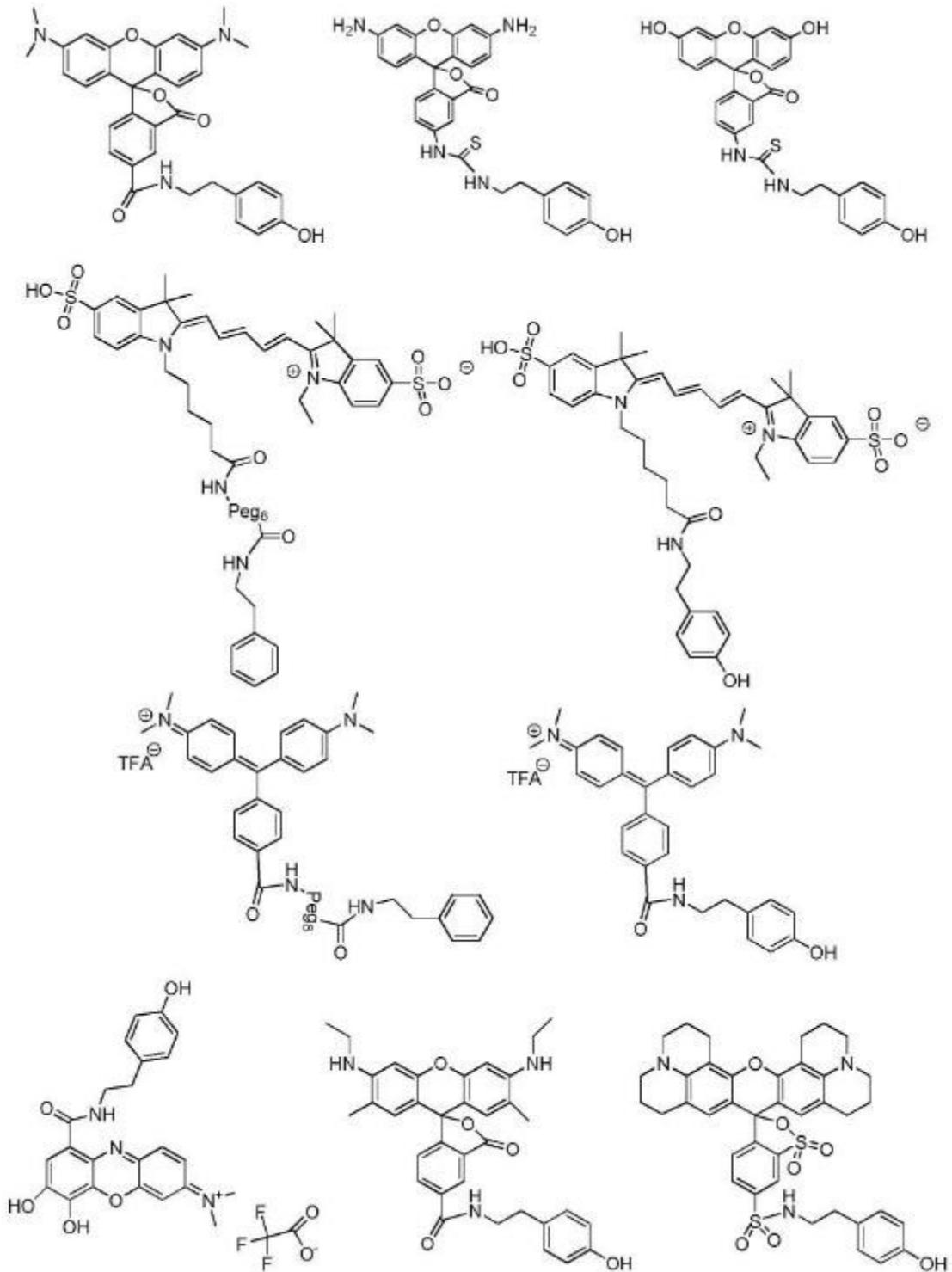


15









Conjugados de amplificación

5 También se divulgan en el presente documento conjugados adecuados para amplificar una señal obtenida tras llevar a cabo el procedimiento divulgado en el presente documento. Los conjugados de amplificación comprenden típicamente un resto reactivo latente, un marcador detectable y un conector opcional.

10 El marcador detectable del conjugado de amplificación puede ser cualquier marcador detectable proporcionado en el presente documento. En modos de realización divulgados particulares, el marcador detectable es un hapteno, tal

como cualquiera de los haptenos divulgados en el presente documento. Se hace referencia a la patente de EE. UU. n.º 7.695.929, que divulga estructuras y enfoques sintéticos para preparar conjugados de amplificación y sus correspondientes anticuerpos específicos. En modos de realización divulgados particulares, un hapteno que tiene un grupo funcional electrófilo (o que tiene un grupo funcional capaz de convertirse en un grupo funcional electrófilo) se conjuga con el resto reactivo latente o con un conector (por ejemplo, un conector alifático o de poli(óxido de alquileno)). En determinados modos de realización, el hapteno incluye un grupo funcional de ácido carboxílico que se convierte en un grupo funcional electrófilo activado que contiene carbonilo, tal como, pero sin limitarse a, un haluro de acilo, un éster (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida) o un anhídrido. El resto reactivo latente incluye un grupo funcional nucleófilo (por ejemplo, amino, hidroxilo, tiol o aniones formados a partir de los mismos) capaz de reaccionar con el grupo funcional electrófilo activado del hapteno. El grupo electrófilo del hapteno se puede acoplar al grupo nucleófilo del resto reactivo latente usando técnicas de acoplamiento orgánico conocidas por un experto en la técnica de la síntesis química orgánica. En modos de realización en los que el conjugado incluye un conector, el conector tiene típicamente un grupo funcional nucleófilo en un extremo y un grupo funcional electrófilo en el otro extremo. El grupo nucleófilo del conector se puede acoplar al grupo electrófilo del hapteno, y el grupo electrófilo del conector se puede activar y acoplar al grupo nucleófilo del resto reactivo latente usando técnicas de acoplamiento orgánico conocidas por un experto en la técnica de la síntesis química orgánica.

En modos de realización ilustrativos adicionales, el conjugado de señalización se usa como un conjugado de amplificación. El conjugado de señalización se puede usar como un conjugado de amplificación en el que el resto cromóforo es un resto de marcaje eficaz. En modos de realización ilustrativos, un anticuerpo específico para un resto cromóforo permite que el resto cromóforo sirva como un conjugado de señalización y marcaje. Desde otra perspectiva, un hapteno que posee atributos físicos, como se divulga en el presente documento, para restos cromóforos eficaces, se puede usar como un resto cromóforo y como un hapteno. Existen beneficios particulares de usar un conjugado de señalización como conjugado de amplificación. En particular, la etapa de amplificación daría como resultado el depósito de cantidades significativas, por ejemplo, potencialmente detectables, del resto cromóforo. Como resultado, la detección cromogénica posterior podría ser más fuerte. De manera similar, como se describe en el presente documento con respecto a la mezcla de cromógenos de diferentes clasificaciones, se podría generar un color único usando la superposición de absorbancias de dos o más restos cromóforos.

VI. COMPOSICIONES

Una composición ilustrativa puede ser un espécimen que incluye una muestra biológica y una pluralidad de conjugados de señalización. En modos de realización particulares divulgados, la composición comprende una muestra biológica que comprende una o más dianas marcadas con enzimas para su visualización. La enzima usada para marcar la diana puede originarse a partir de un conjugado de marcaje, tal como un conjugado enzimático. La composición también puede comprender además una o más sondas de detección. La pluralidad de conjugados de señalización son como se divulgan en el presente documento y están configurados para proporcionar una señal de campo claro. La pluralidad de conjugados de señalización están unidos covalentemente de manera proximal a o directamente en una o más dianas. En modos de realización particulares divulgados, configurados para proporcionar una señal de campo claro comprende elegir un resto cromógeno particular para el conjugado de señalización que es capaz de absorber aproximadamente un 5% o más de luz incidente. En modos de realización particulares divulgados, se puede absorber aproximadamente el 20% de la luz incidente.

La composición comprende un conjugado de señalización que se ha configurado para proporcionar los máximos de longitud de onda particulares divulgados en el presente documento para los restos cromógenos de los conjugados de señalización. Solamente a modo de ejemplo, el conjugado de señalización está configurado para proporcionar una señal de campo claro de modo que un pico de absorbancia tenga una $\lambda_{\text{máx}}$, como se divulga en el presente documento. También pueden obtenerse dos picos de absorbancia diferentes configurando diferentes conjugados de señalización para comprender restos cromógenos diferentes que tienen picos de absorbancia de diferentes valores de $\lambda_{\text{máx}}$, como se divulga en el presente documento. La composición también puede comprender una pluralidad de conjugados de señalización configurados para proporcionar una señal de campo claro al seleccionarse como que tienen un valor de AMA particular. En el presente documento se divulgan valores de AMA adecuados. En otros modos de realización divulgados, al menos una parte de la pluralidad de conjugados de señalización tiene una absorptividad molar promedio seleccionada a partir de los valores particulares proporcionados en el presente documento.

Modos de realización particulares divulgados de la composición también se refieren a una pluralidad de conjugados de señalización que tienen una solubilidad particular en agua, tales como los valores proporcionados en el presente documento. Además, la pluralidad de conjugados de señalización también pueden ser estables en una solución tampón acuosa durante el período de tiempo proporcionado en el presente documento.

En modos de realización particulares divulgados, la composición comprende una pluralidad de conjugados de señalización que están configurados para impartir un color ópticamente aparente bajo iluminación de campo claro, tal como rojo, naranja, amarillo, verde, añil o violeta. El color ópticamente aparente también puede ser una mezcla, de modo que puede obtenerse y visualizarse un primer color ópticamente distinto, un segundo color ópticamente distinto, un tercer color ópticamente distinto, un cuarto color ópticamente distinto e incluso un quinto color ópticamente distinto.

La muestra biológica presente en la composición divulgada puede ser una muestra de tejido o citología como se divulga en el presente documento. En modos de realización particulares divulgados, la muestra biológica puede comprender dos dianas, una primera diana y una segunda diana, y la composición puede comprender además una primera sonda de detección que es específica para la primera diana y una segunda sonda de detección que es específica para la segunda diana.

VII. KITS

También se divulgan en el presente documento modos de realización de un kit que comprende el conjugado de señalización para su uso con los sistemas de formación de imágenes divulgados en el presente documento. En otro modo de realización, el kit incluye una sonda de detección. En otro modo de realización, el kit incluye un conjugado de marcaje. En otro modo de realización, el kit incluye un conjugado de amplificación y un conjugado de marcaje secundario. En otro modo de realización, el kit puede comprender además una solución de peróxido. En modos de realización ilustrativos, el kit incluye una sonda de detección. En modos de realización ilustrativos, los reactivos del kit se envasan en recipientes configurados para su uso en una plataforma de tinción de portaobjetos automatizada. Por ejemplo, los recipientes pueden ser dispensadores configurados para su uso y un dispositivo de tinción de portaobjetos IHC/ISH automatizados de la serie BENCHMARK.

En modos de realización ilustrativos, el kit incluye una serie de reactivos contenidos en diferentes recipientes configurados para trabajar juntos para realizar un ensayo particular. En un modo de realización, el kit incluye un conjugado de marcaje en una solución tampón en un primer recipiente. La solución tampón está configurada para mantener la estabilidad y para mantener la capacidad de unión específica del conjugado de marcaje mientras el reactivo se almacena en un entorno refrigerado y mientras está colocado en el instrumento. En otro modo de realización, el kit incluye un conjugado de señalización en una solución acuosa en un segundo recipiente. En otro modo de realización, el kit incluye una solución de peróxido de hidrógeno en un tercer recipiente para su uso concomitante en la muestra con el conjugado de señalización. En el segundo o tercer recipiente, se pueden encontrar varios potenciadores (por ejemplo, pirimidina) para aumentar la eficiencia por la cual la enzima activa las especies reactivas latentes en las especies reactivas. En un modo de realización adicional, el kit incluye un conjugado de amplificación.

Los kits pueden incluir una amplia gama de ensayos de cóctel, incluidos el kit ULTRAVIEW SISH Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-001), la sonda INFORM HER2 DNA Probe (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4332), el anticuerpo Rabbit Anti-DNP Antibody (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4335), el anticuerpo Rabbit Anti-HER2 (4B5) Antibody (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-2996), el kit ULTRAVIEW Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 760-501), el lavado de plata (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-002), y/o la sonda INFORM Chromosome 17 Probe (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4331). Otro ensayo de cóctel es la sonda INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe vendida por (Ventana Medical Systems, Inc.), que incluye el cóctel INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-4422), HybReady (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4409), el kit ultraView SISH DNP Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-098), el kit ultraView Red ISH DIG Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-505), el kit ultraView Siler Wash II (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-003), y/o los portaobjetos HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 783-4332). Se pueden usar otros ensayos de cóctel. Se pueden usar ensayos de cóctel para detectar cuantitativamente la amplificación del gen HER2 por medio de ISH cromogénica de dos colores en especímenes de tejido fijadas con formol e incluidas en parafina de cáncer de mama y cáncer gástrico humano, incluyendo la unión gastroesofágica, y pueden ser una ayuda en la evaluación de pacientes para quienes Herceptin (trastuzumab) puede ser una opción de tratamiento. Aún en otros protocolos, el ensayo de cóctel es el ensayo VENTANA HER2 DNA Probe Assay vendido por Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-4422. La solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/809.024 (correspondiente a la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/299555) titulada MULTICOLOR CHROMOGENIC DETECTION OF BIOMAKERS y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/809.024 (correspondiente a la publicación de patente de EE. UU. n.º 2011/0136130) titulada METHOD FOR CHROMOGENIC DETECTION OF TWO OR MORE TARGET MOLECULES IN A SINGLE SAMPLE divulgan sustancias, protocolos y técnicas de procesamiento de especímenes que se pueden usar con los sistemas, aparatos y procedimientos divulgados en el presente documento. También se pueden usar otros ensayos o cócteles.

En algunos modos de realización, una muestra de tejido se procesó de acuerdo con un protocolo ISH. El protocolo ISH puede proporcionar visualización de secuencias de ácido nucleico específicas (por ejemplo, ADN, ARNm, etc.) en cortes de tejido congelados, cortes de tejido fijados/incluidos en parafina u otras preparaciones celulares hibridando hebras complementarias de nucleótidos (por ejemplo, sondas) a la secuencia de interés. El protocolo ISH puede incluir, sin limitación, un protocolo doble SISH y Red ISH, un único protocolo Red ISH, un único protocolo SISH o similares. Para determinar una proporción HER2/cromosoma 17 en tejido mamario, el aparato de formación de imágenes 112 de la FIG. 1 puede capturar imágenes que incluyen señales de hibridación *in situ* con plata, señales de hibridación *in situ* rojas, o similares. Se pueden producir imágenes/videos digitalmente mejorados en base a las imágenes y visualizarlos en el dispositivo de visualización. El tejido se puntúa en base a las señales correspondientes a genes HER2 y cromosomas 17 para determinar la proporción HER2/CR17. Basándose en la proporción, se determina que el gen HER2 del espécimen está amplificado o no amplificado. Para puntuar automáticamente la muestra de tejido mamario, se pueden seleccionar núcleos candidatos para análisis cuantitativo. El dispositivo de

procesamiento 122 de la FIG. 1 puede contar automáticamente diferentes rasgos (por ejemplo, genes HER2, cromosomas 17, etc.) y determina la proporción del número de rasgos. Se pueden puntuar núcleos adicionales. Se puede realizar un diagnóstico basado, al menos en parte, en las proporciones. Los resultados se pueden mostrar en el dispositivo de visualización 114 de la FIG. 1. Para evaluar si la muestra de tejido (por ejemplo, tejido mamario) es un carcinoma, el dispositivo de procesamiento 122 de la FIG. 1 puede ayudar al usuario a obtener información acerca de la región seleccionada, por ejemplo, detectando la amplificación de genes evaluando la proporción del número de señales de genes HER2 con respecto al número de señales de cromosoma 17.

VIII. CONCLUSIÓN

La tecnología divulgada en el presente documento se puede usar en diferentes tipos de muestras biológicas. Las muestras biológicas pueden ser una muestra o muestras de tejido (por ejemplo, cualquier colección de células extraída(s) de un sujeto. La muestra de tejido puede ser una colección de células interconectadas que realizan una función similar dentro de un organismo. Una muestra biológica también puede ser cualquier muestra sólida o fluida obtenida de, excretada por o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo sin limitación, organismos unicelulares, tales como bacterias, levaduras, protozoos y amebas, organismos multicelulares (tales como plantas o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o de un paciente humano afectado por una afección o enfermedad que se va a diagnosticar o investigar, tal como cáncer). En algunos modos de realización, una muestra biológica se puede colocar en un portaobjetos de microscopio e incluye, sin limitación, una sección de tejido, un órgano, una sección de tumor, un frotis, una sección congelada, una preparación para citología o líneas celulares. Para obtener la muestra se puede usar una biopsia por incisión, una biopsia con aguja gruesa, una biopsia por excisión, una biopsia aspirativa, una biopsia por punción con aguja gruesa, una biopsia estereotáctica, una biopsia abierta o una biopsia quirúrgica.

Las muestras biológicas pueden ser portadas mediante portaobjetos de microscopio estándar de vidrio, tal como vidrio de borosilicato (por ejemplo, vidrio BK7). El portaobjetos puede tener una longitud de aproximadamente 3 pulgadas (75 mm), un ancho de aproximadamente 1 pulgada (25 mm) y un grosor de aproximadamente 1 mm. Se pueden usar portaobjetos hechos de diferentes materiales y con diferentes dimensiones. Los cubreobjetos también pueden estar hechos de vidrio (por ejemplo, vidrio de borosilicato) u otros materiales ópticamente transparentes o semitransparentes (por ejemplo, plásticos o polímeros). Tanto el portaobjetos (por ejemplo, el portaobjetos 134 de la FIG. 3) como el cubreobjetos (por ejemplo, el cubreobjetos 139 de la FIG. 3) pueden ser sustratos sustancialmente planos. La expresión "sustrato sustancialmente plano" se refiere, sin limitación, a cualquier objeto que tenga al menos una superficie sustancialmente plana, pero más típicamente a cualquier objeto que tenga dos superficies sustancialmente planas en lados opuestos del objeto, e incluso más típicamente a cualquier objeto que tenga superficies opuestas sustancialmente planas, superficies opuestas que son generalmente de igual tamaño pero más grandes que cualquier otra superficie en el objeto. Los sistemas y técnicas de formación de imágenes pueden modificarse para su uso con otros tipos de portadores de especímenes.

Los sistemas de formación de imágenes divulgados en el presente documento pueden utilizar diferentes tipos de imágenes multiespectrales redefiniendo las características espectrales de imágenes de modo que el observador perciba de manera óptima los rasgos diana. Por ejemplo, la redefinición del color y/o la mejora del contraste se pueden realizar para distinguir mejor visualmente cada rasgo diana y adaptarse a la agudeza de color del observador. En modos de realización, el dispositivo de captura de imágenes 120 de la FIG. 1 es una cámara multiespectral, y el dispositivo de procesamiento 122 de la FIG. 1 puede realizar una separación espectral de colores, o técnicas similares, como parte de la redefinición para proporcionar una separación óptima de colores. La separación espectral de colores puede realizarse usando algoritmos de separación conocidos, que incluyen, sin limitación, los aparatos, algoritmos y procedimientos divulgados en la patente de EE.UU. n.º 8.285.024 y la solicitud PCT. PCT/EP2012/058253 (Publicación PCT n.º WO2012/152693).

Además, se pueden realizar análisis basados en tejidos, análisis basados en células u otros tipos de análisis en las imágenes separadas. Una o más de las imágenes separadas se pueden redefinir y dos o más de las imágenes separadas se pueden combinar para producir una o más imágenes mejoradas (por ejemplo, imágenes compuestas con colores falsos).

En vista de los muchos modos de realización posibles a los que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, se debe reconocer que los modos de realización ilustrados son solo ejemplos preferentes de la materia objeto divulgada en el presente documento y no se deben tomar como limitantes del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, se reivindica la presente invención como todo lo que entra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema de formación de imágenes multiespectrales (100) para formar imágenes de un espécimen teñido con diferentes fluoróforos y cromógenos ubicado en un portaobjetos de microscopio (134), comprendiendo el sistema de formación de imágenes multiespectrales:
- 10 i) un aparato de formación de imágenes (112), que incluye
- un microscopio (110), que comprende:
- 15 ▪ un dispositivo de soporte (152) que sostiene el portaobjetos de microscopio que porta el espécimen teñido con los diferentes fluoróforos y cromógenos;
- 20 ▪ un iluminador (140) que incluye una pluralidad de fuentes de luz pulsada de diferentes colores (180a, 180b, 180c, 180d) configuradas para producir luz secuencialmente para iluminar secuencialmente al menos una parte del espécimen, en el que las longitudes de onda o bandas de onda de excitación de las fuentes de luz de diferentes colores corresponden a longitudes de onda o bandas de onda de absorción de los diferentes fluoróforos o cromógenos usados para teñir el espécimen;
- 25 ▪ un dispositivo de captura de imágenes (120) situado para capturar una pluralidad de imágenes de espécimen, cada una correspondiente al espécimen expuesto a luz procedente de una fuente de luz respectiva de las fuentes de luz, en el que el dispositivo de captura de imágenes está sincronizado con la pulsación de las fuentes de luz;
- 30 ▪ al menos una lente (150a, 150b, 150c, 150d) situada a lo largo de una trayectoria óptica que se extiende desde el espécimen hasta el dispositivo de captura de imágenes;
- 35 ▪ al menos un ocular (128, 130);
- un dispositivo de procesamiento (122) configurado para producir datos de imagen en color con contraste mejorado basándose en las imágenes de espécimen capturadas por el dispositivo de captura de imágenes, en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para mejorar el contraste entre (a) primeros rasgos de interés del espécimen y (b) segundos rasgos de interés del espécimen, en el que los primeros rasgos de interés comprenden primeros cromógenos o primeros fluoróforos, y en el que los segundos rasgos de interés comprenden segundos cromógenos o segundos fluoróforos, comprendiendo la producción de los datos de imagen en color con contraste mejorado generar datos de imagen con colores falsos en base a la pluralidad de imágenes de espécimen capturadas, de modo que los datos de imagen con colores falsos representan una imagen con colores falsos del espécimen con contraste de color mejorado entre los diferentes rasgos de interés, en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para proporcionar los datos de imagen en color con contraste mejorado de modo que la salida con contraste mejorado es un vídeo que se muestra a una velocidad de fotogramas igual o superior a 2
- 40 fotogramas/segundo;
- ii) un dispositivo de visualización (114) en comunicación con el aparato de formación de imágenes y configurado para mostrar una salida con contraste mejorado (144) del espécimen basándose en los datos de imagen en color con contraste mejorado del dispositivo de procesamiento, en el que el al menos un ocular permite que un usuario vea el espécimen mientras el dispositivo de visualización muestra la salida con contraste mejorado del espécimen, en el que la salida se muestra en el dispositivo de visualización en tiempo real.
- 45
- 50 2. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de captura de imágenes comprende un sensor de formación de imágenes que es un dispositivo CCD.
- 55 3. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, que comprende además un escáner digital de portaobjetos de microscopio que comprende el aparato de formación de imágenes y un mecanismo de manipulación de portaobjetos, en el que el mecanismo de manipulación de portaobjetos puede moverse para suministrar uno o más portaobjetos de microscopio al aparato de formación de imágenes y puede moverse para retirar uno o más portaobjetos de microscopio del aparato de formación de imágenes.
- 60 4. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que cada una de las fuentes de luz incluye al menos un diodo emisor de luz.
- 65 5. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de procesamiento incluye un dispositivo de almacenamiento (210) configurado para almacenar una primera imagen de espécimen capturada por el dispositivo de captura de imágenes mientras el espécimen está iluminado por una primera de la pluralidad de fuentes de luz y una segunda imagen de espécimen capturada por el dispositivo de captura de imágenes mientras el espécimen está iluminado por una segunda de la pluralidad de fuentes de luz, y en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para combinar digitalmente datos de imagen de la primera y la segunda imágenes de espécimen para producir una imagen compuesta con colores falsos del espécimen.

- 5 6. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de diferentes fuentes de luz en color incluye al menos cuatro fuentes de luz que tienen longitudes de onda medias respectivas que son diferentes entre sí.
7. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el iluminador está configurado para producir una pluralidad de emisiones de energía que tienen longitudes de onda medias que son diferentes entre sí, y en el que un número total de las emisiones de energía está en un intervalo de 4 a 8.
- 10 8. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para producir de 4 a 10 imágenes desconvolucionadas espectralmente del espécimen y para producir una imagen con colores falsos del espécimen basándose en las imágenes desconvolucionadas espectralmente.
- 15 9. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que cada una de las fuentes de luz incluye uno o más diodos emisores de luz, en el que el dispositivo de captura de imágenes está configurado para proporcionar imágenes monocromas del espécimen, y en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para generar imágenes con colores falsos basándose en las imágenes monocromas.
- 20 10. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para producir una imagen compuesta con colores falsos del espécimen generada a partir de las imágenes de espécimen.
- 25 11. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de procesamiento está configurado para generar imágenes multicolor a una velocidad de fotogramas igual o superior a 10 fotogramas por segundo para su visionado en el dispositivo de visualización.
- 30 12. El sistema de formación de imágenes multiespectrales de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de captura de imágenes incluye una cámara monocroma.
- 35 13. Un procedimiento de formación de imágenes con contraste mejorado de un espécimen teñido con diferentes fluoróforos o cromógenos portado por un portaobjetos de microscopio (134), comprendiendo el procedimiento:
- exponer secuencialmente al menos una parte del espécimen a pulsos de luz procedentes de una pluralidad de fuentes de luz de diferentes colores (180a, 180b, 180c, 180d), en el que las longitudes de onda o las bandas de onda de excitación de las fuentes de luz de diferentes colores corresponden a longitudes de onda o bandas de onda de absorción de los diferentes fluoróforos o cromógenos usados para teñir el espécimen;
 - capturar, mediante un dispositivo de captura de imágenes (120), una pluralidad de imágenes del espécimen, correspondiendo las imágenes capturadas individualmente al espécimen expuesto a luz procedente de una fuente de luz respectiva de las fuentes de luz, en el que el dispositivo de captura de imágenes está sincronizado con la pulsación de las fuentes de luz; y
 - generar datos de imagen con colores falsos en base a la pluralidad de imágenes capturadas de modo que los datos de imagen con colores falsos representan una imagen con colores falsos del espécimen con contraste de color mejorado entre diferentes rasgos de interés; siendo el contraste de color mejorado un contraste entre (a) primeros rasgos de interés del espécimen y (b) segundos rasgos de interés del espécimen, en el que los primeros rasgos de interés comprenden primeros cromógenos o primeros fluoróforos, y en el que los segundos rasgos de interés comprenden segundos cromógenos o segundos fluoróforos, y
 - proporcionar los datos de imagen con contraste de color mejorado como un vídeo visualizado a una velocidad de fotogramas igual o superior a 2 fotogramas/segundo, en el que la salida (144) se visualiza en un dispositivo de visualización (114) en tiempo real.
- 50
- 55 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que cada una de las fuentes de luz de color proporciona una longitud de onda media capaz de ser absorbida por rasgos de interés respectivos del espécimen.
- 60 15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que exponer secuencialmente el espécimen a luz incluye:
- exponer el espécimen a luz procedente de una primera fuente de luz de color;
 - capturar una primera imagen de espécimen del espécimen iluminado por la primera fuente de luz de color;
 - después de capturar la primera imagen de espécimen, exponer el espécimen a luz procedente de una segunda fuente de luz de color; y
- 65

- capturar una segunda imagen de espécimen del espécimen iluminado por la segunda fuente de luz de color.

5 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la primera fuente de luz de color tiene una primera longitud de onda máxima y la segunda fuente de luz de color tiene una segunda longitud de onda máxima diferente de la primera longitud de onda máxima.

10 17. El procedimiento de la reivindicación 14, que comprende además procesar las imágenes capturadas redefiniendo las características espectrales de las imágenes capturadas para aumentar la percepción visual de un usuario de uno o más rasgos diana en la imagen con colores falsos.

18. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que las imágenes capturadas son imágenes monocromas.

15 19. El procedimiento de la reivindicación 15, que comprende además realizar una separación espectral de las imágenes capturadas.

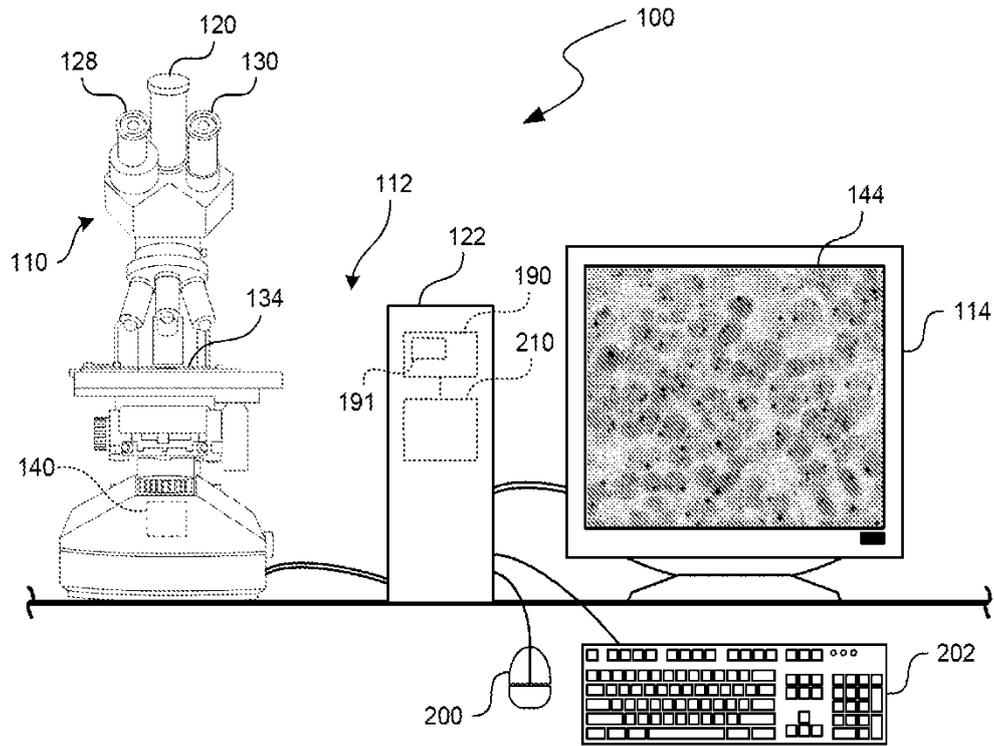


FIG. 1

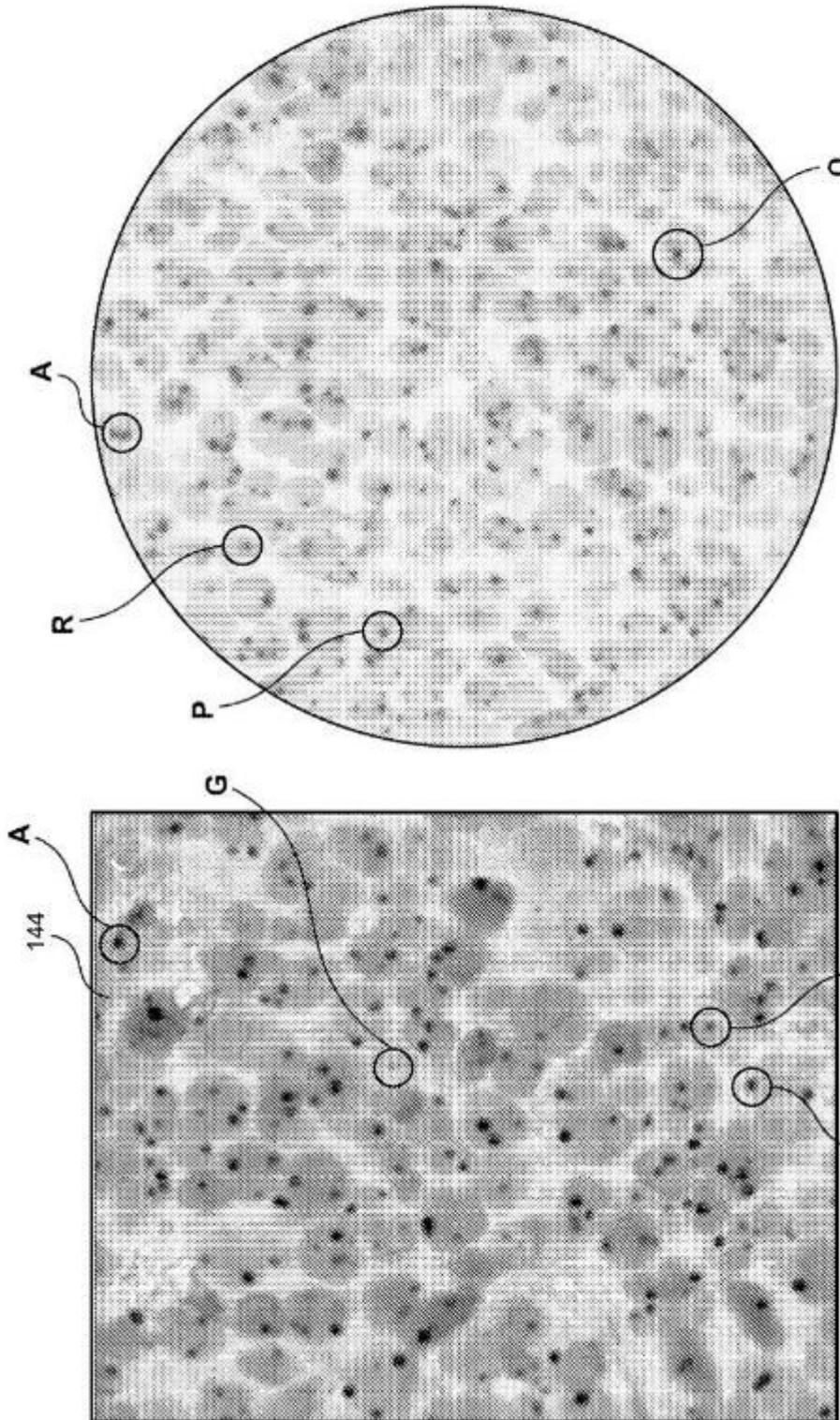


FIG. 2(B)

FIG. 2(A)

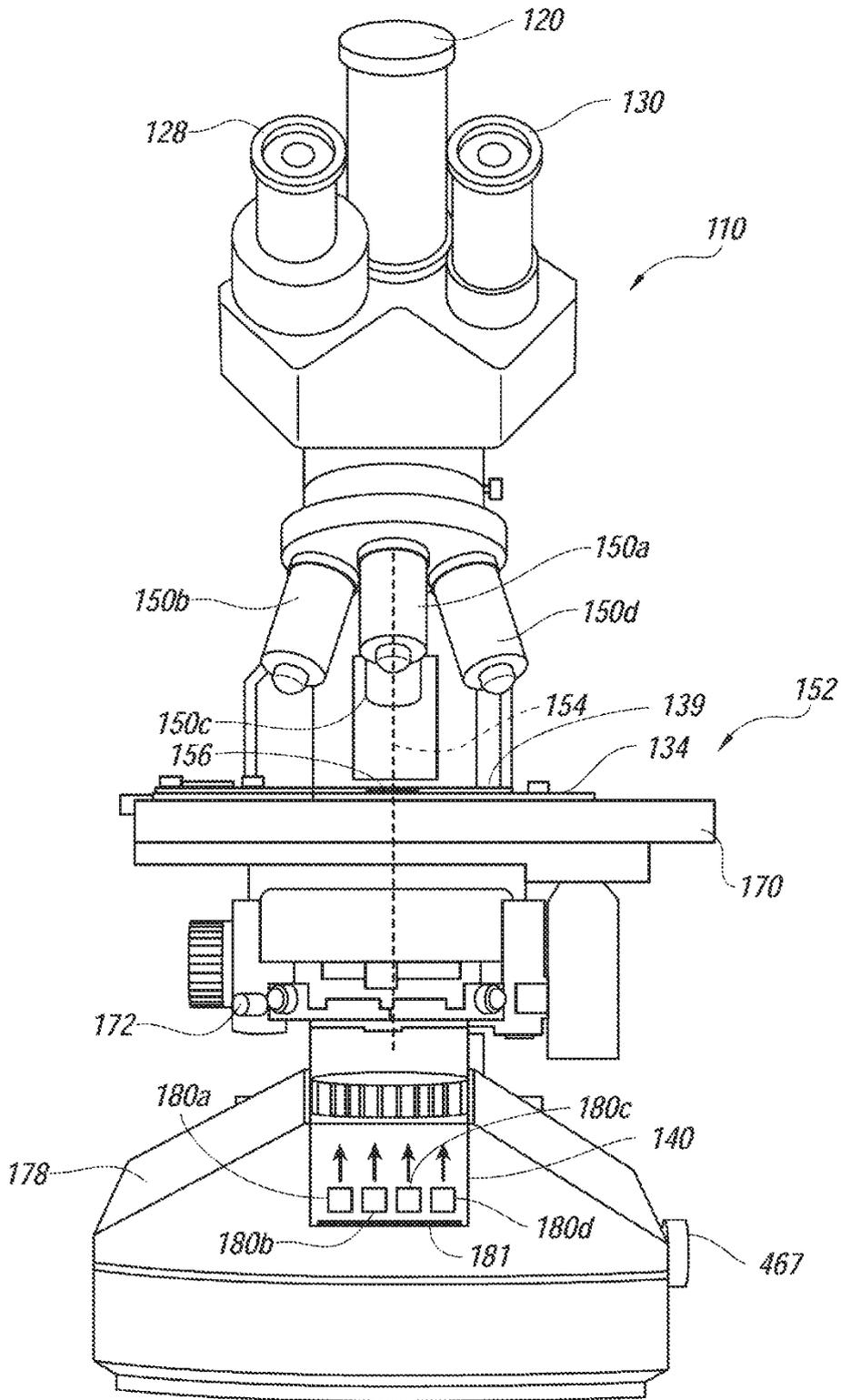


FIG. 3

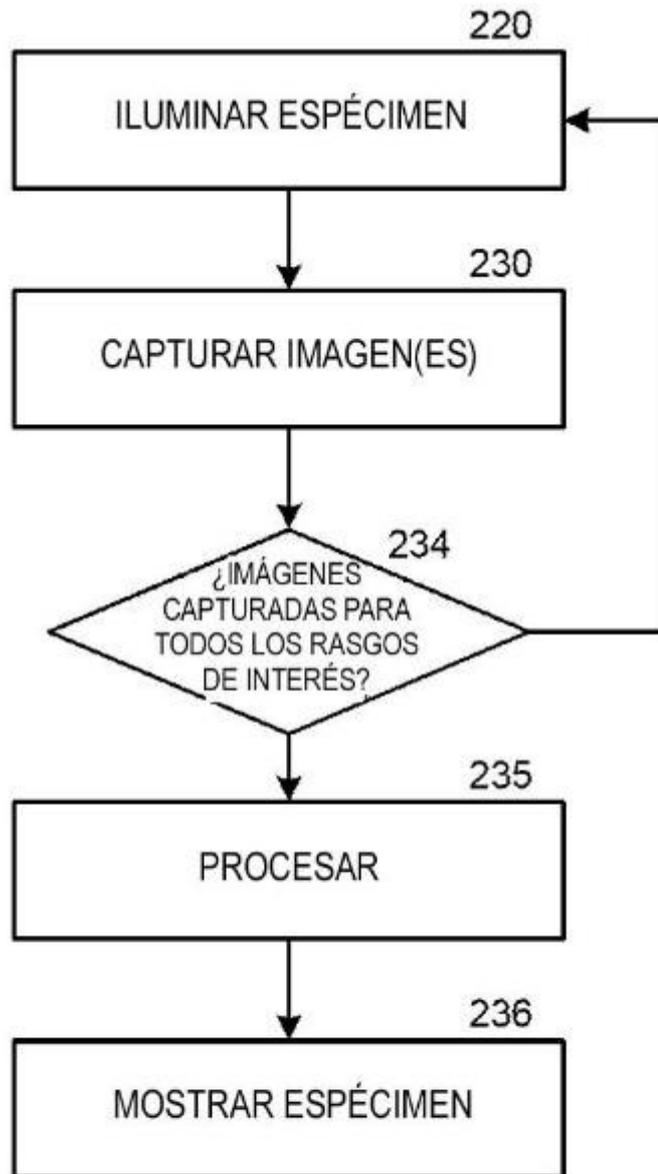


FIG. 4

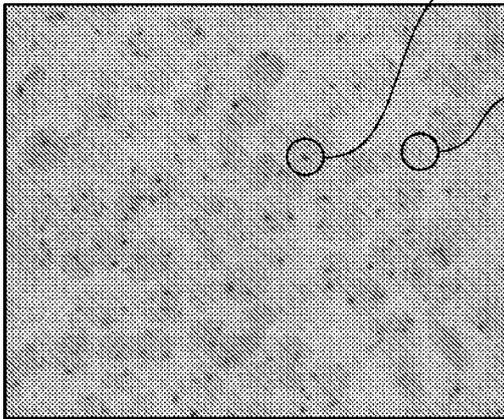


FIG. 5(A)

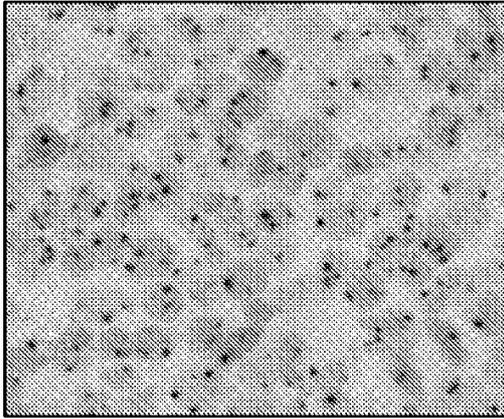


FIG. 5(B)

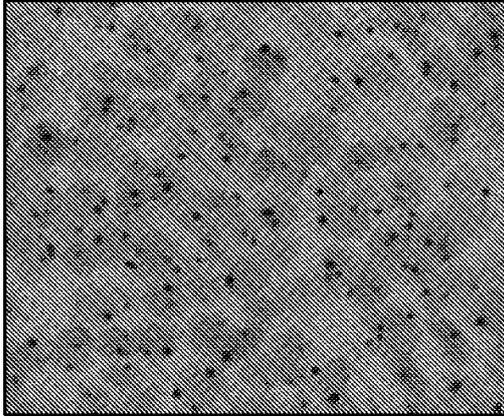


FIG. 5(C)

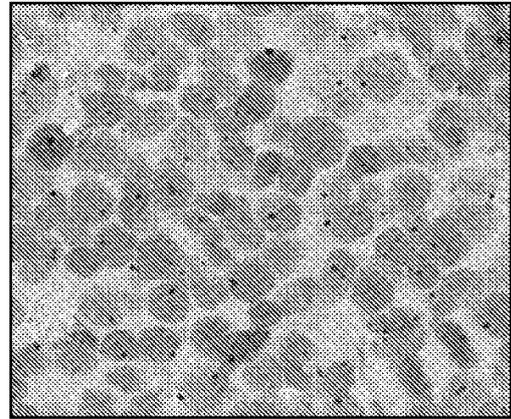


FIG. 5(D)

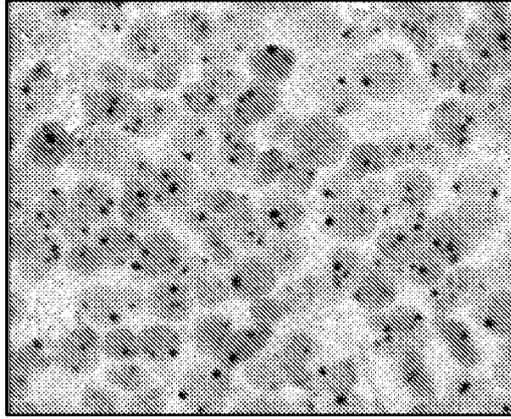


FIG. 5(E)

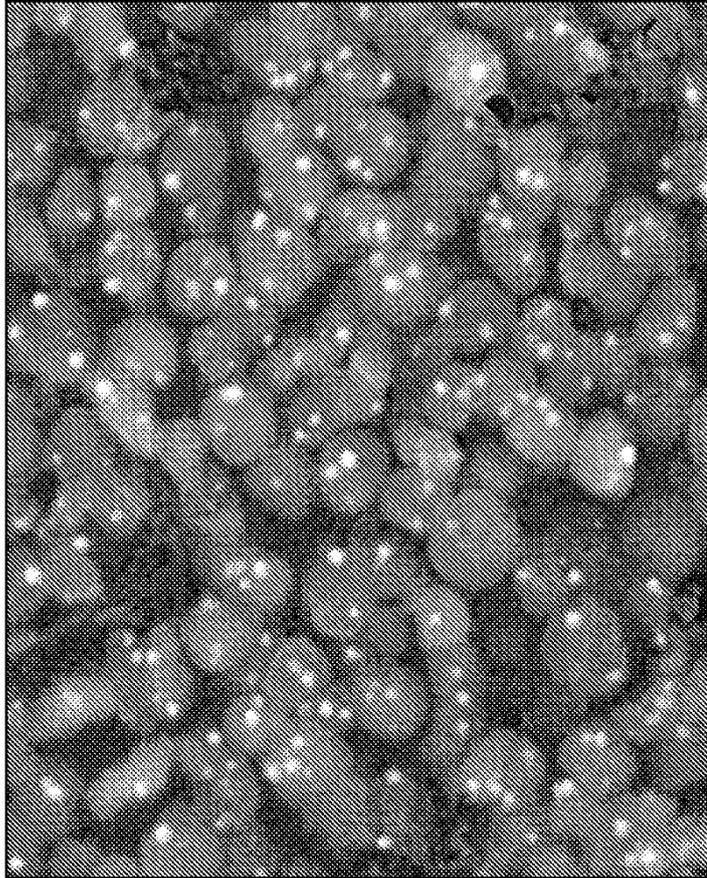


FIG. 6

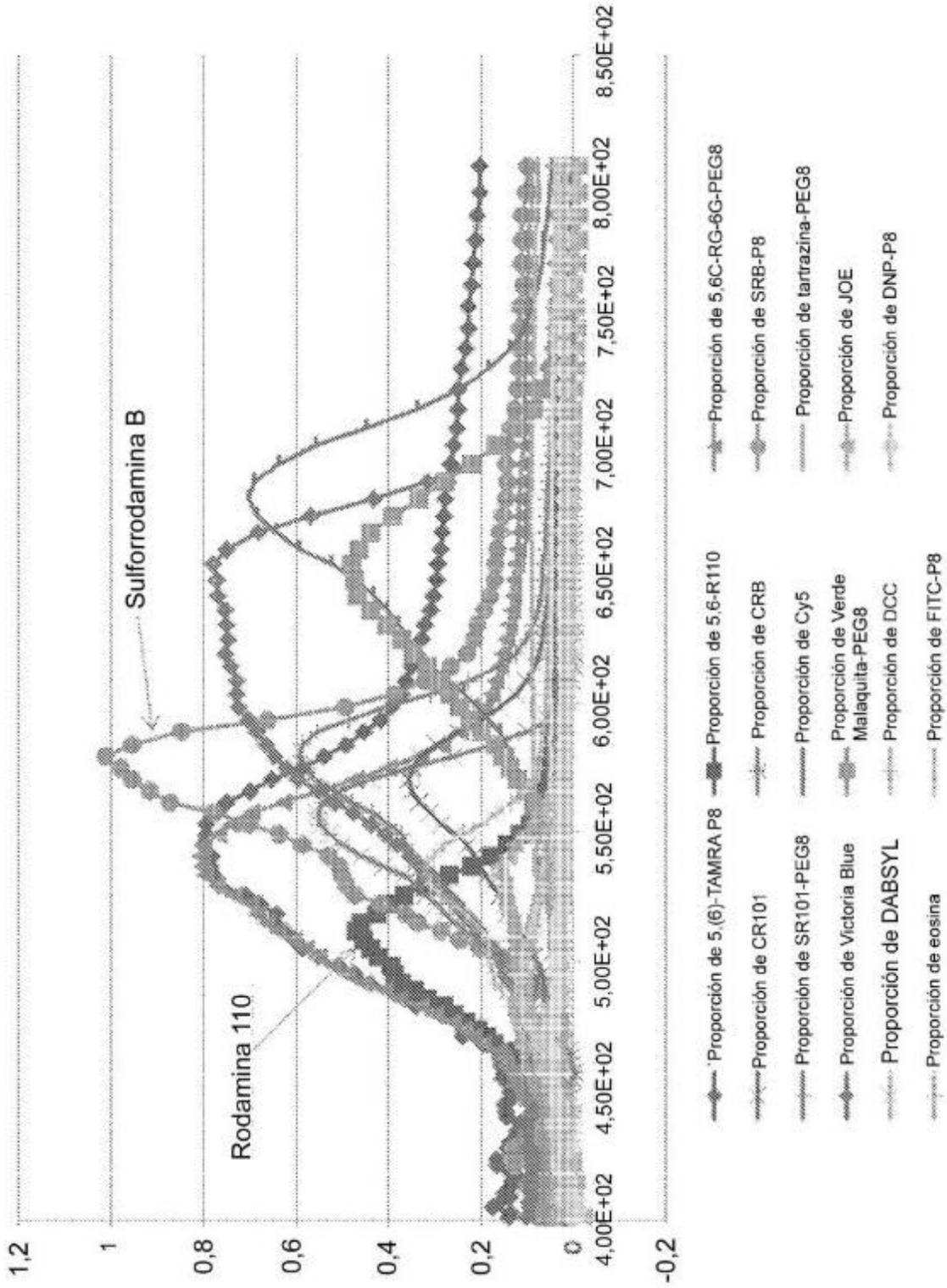


FIG. 7

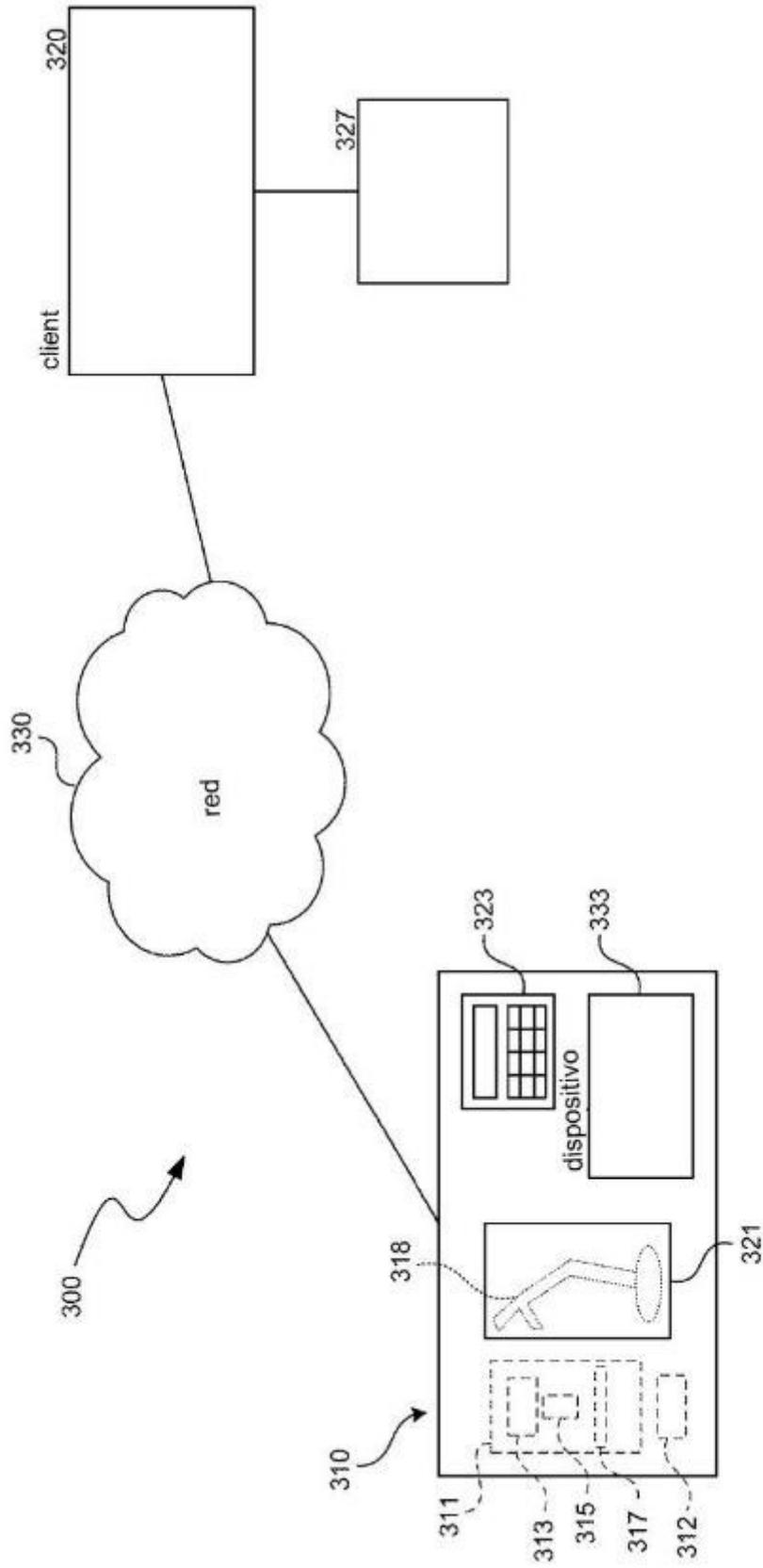


FIG. 8

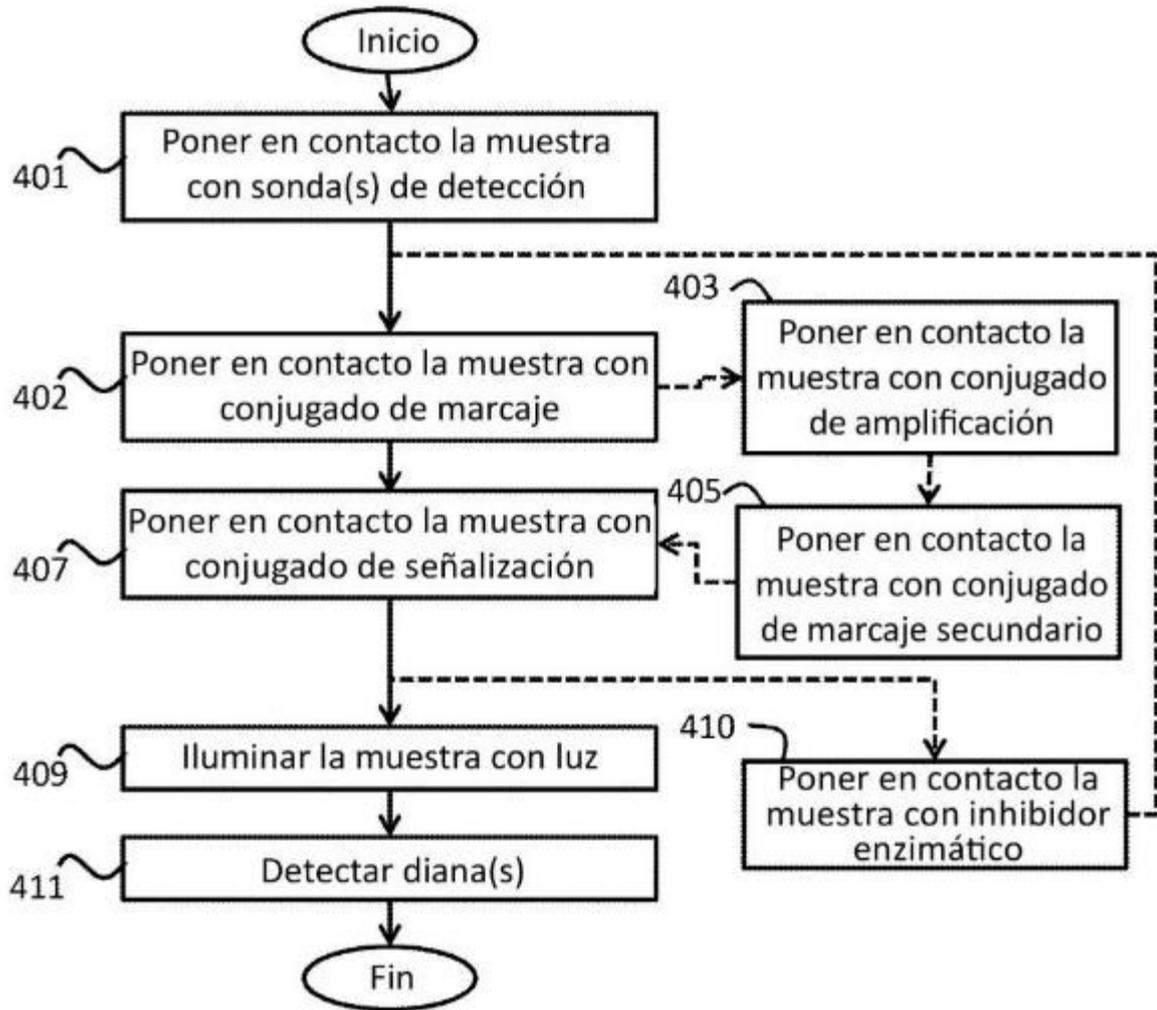


FIG. 9

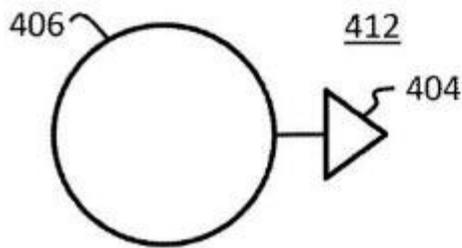


FIG. 10(A)

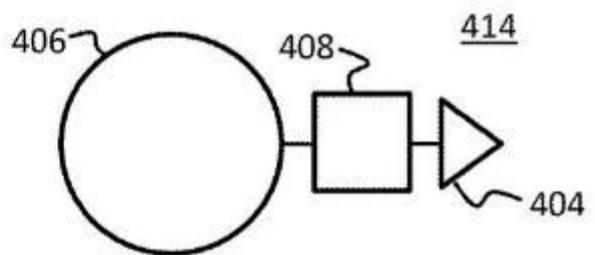
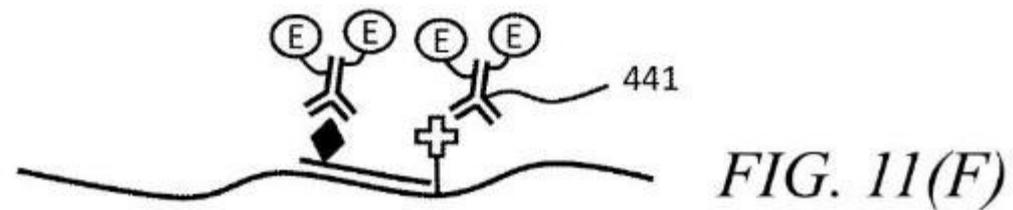
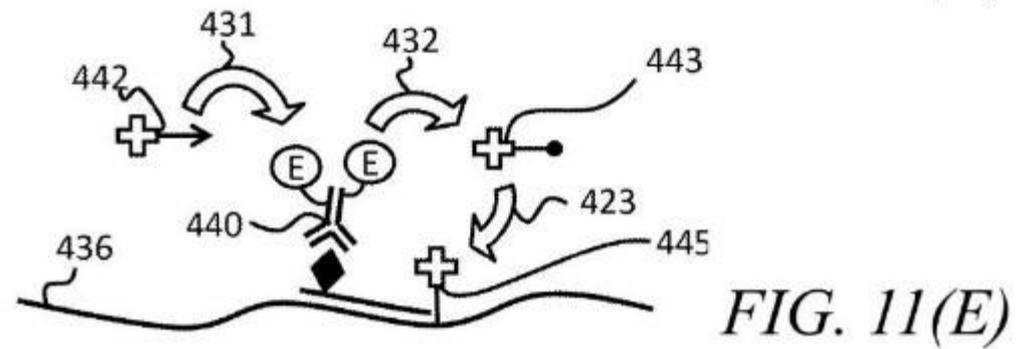
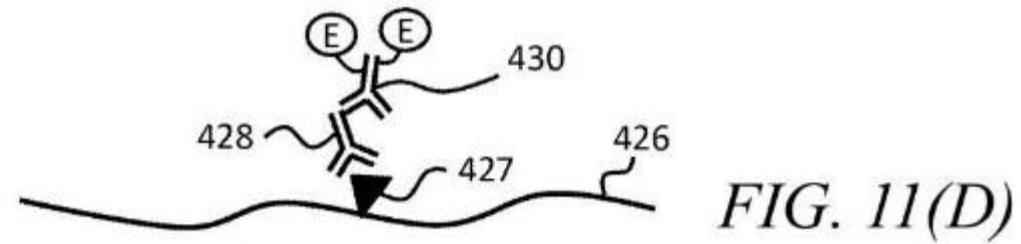
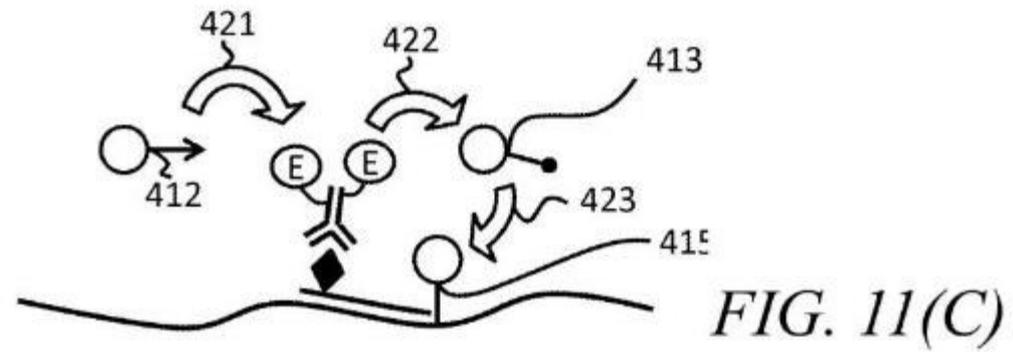
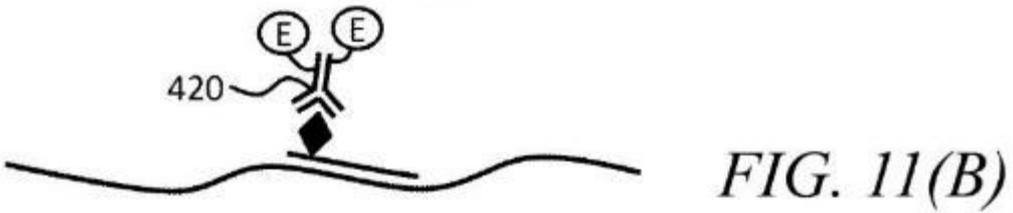
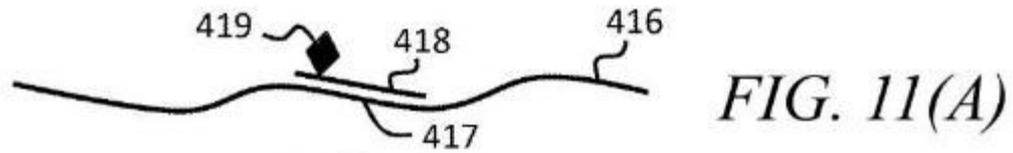


FIG. 10(B)



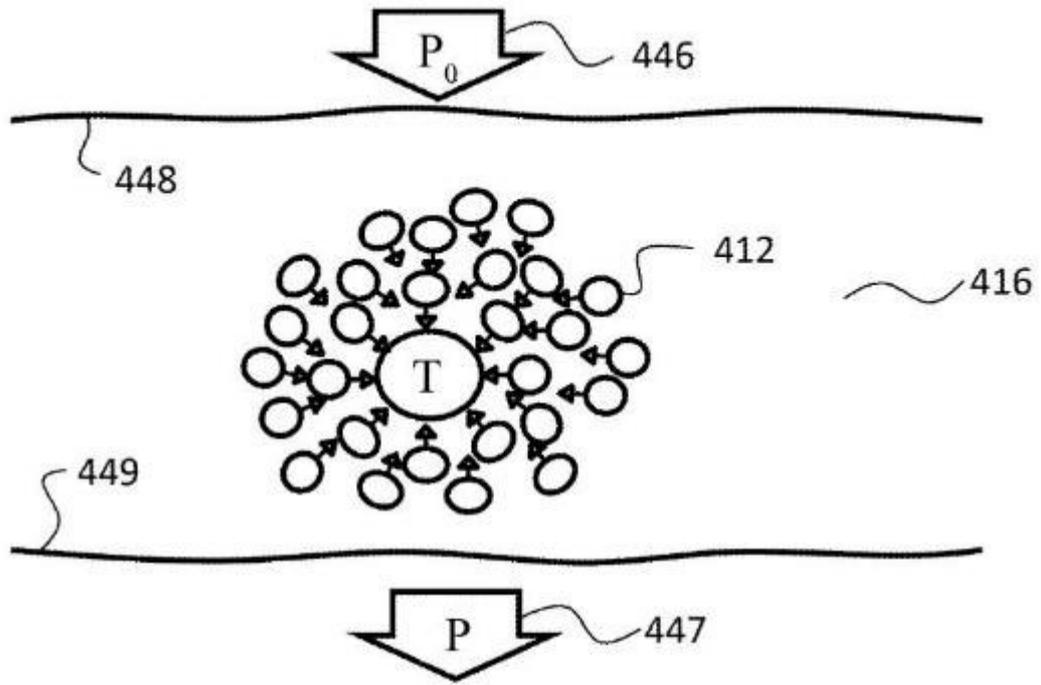


FIG. 12(A)

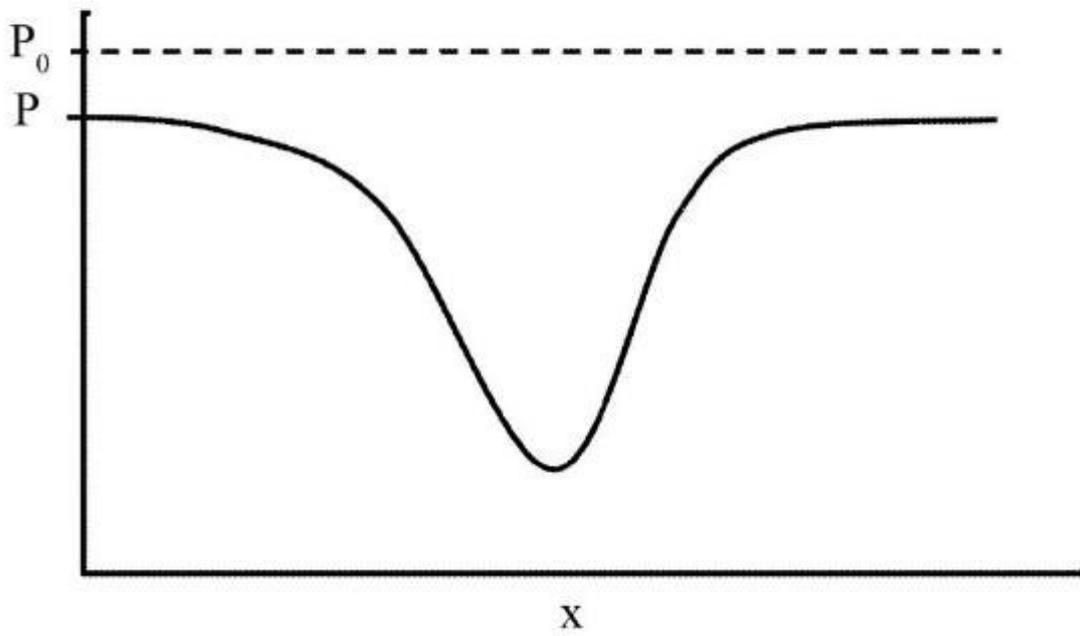


FIG. 12(B)

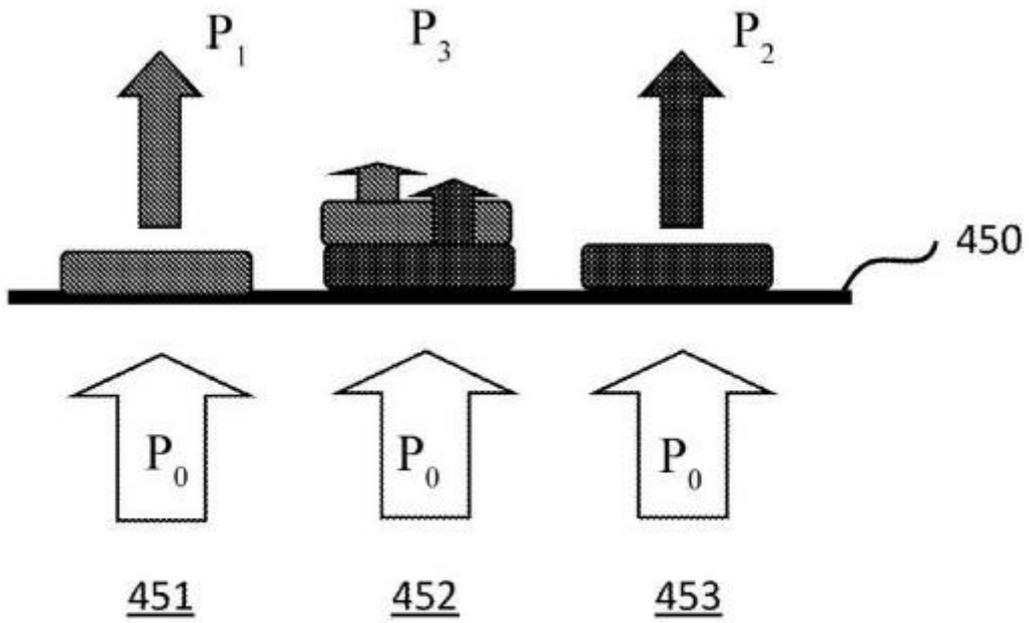


FIG. 13(A)

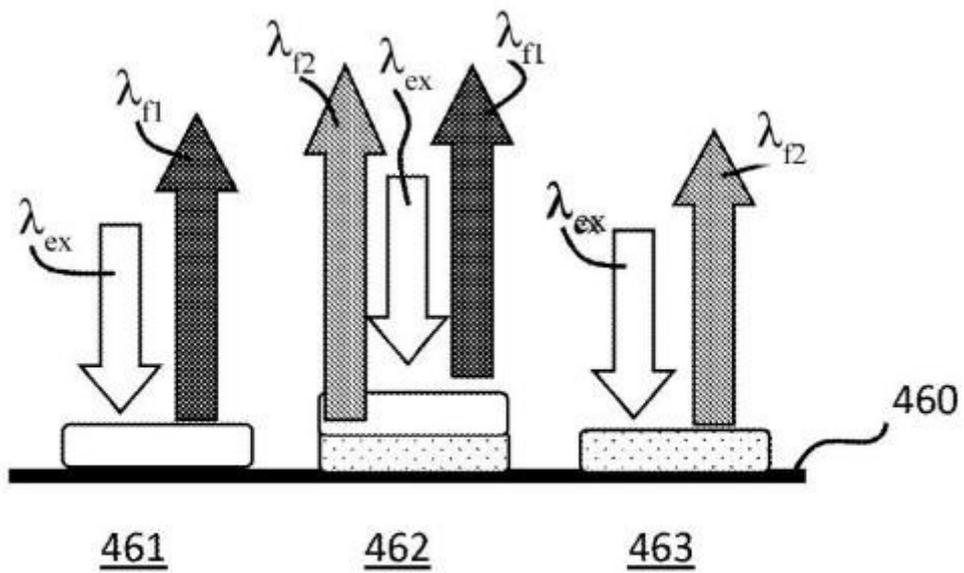


FIG. 13(B)

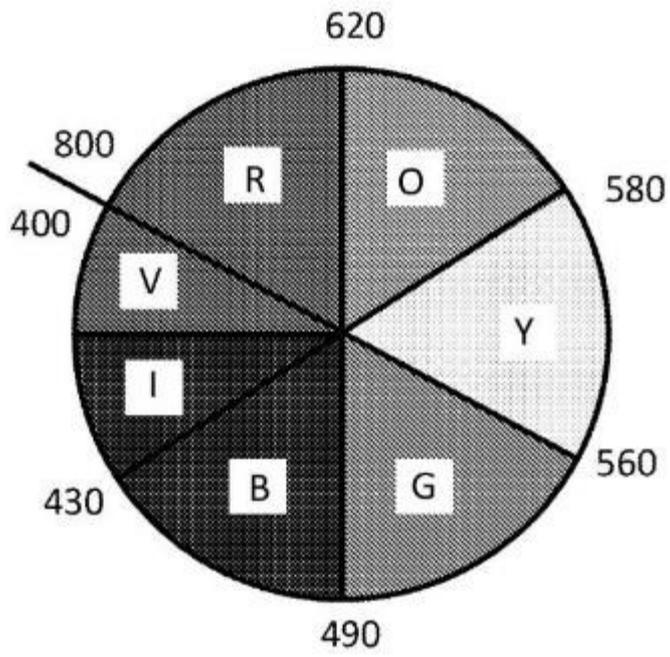


FIG. 14(A)

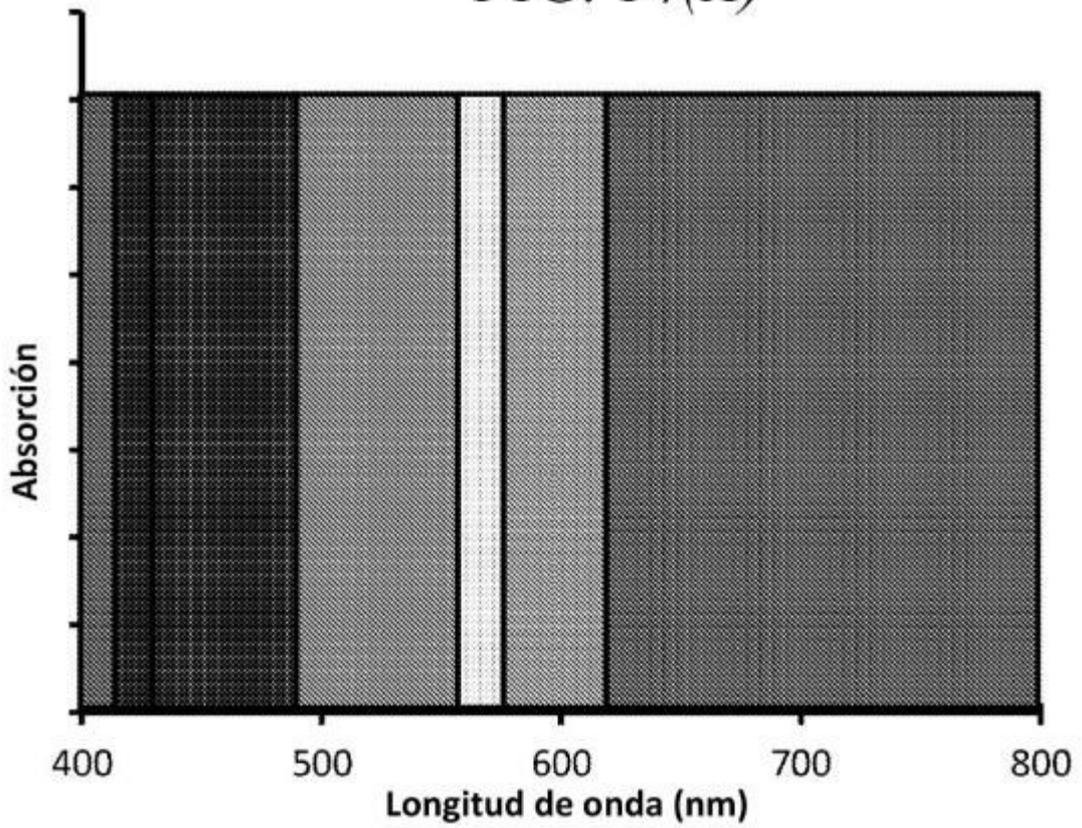


FIG. 14(B)

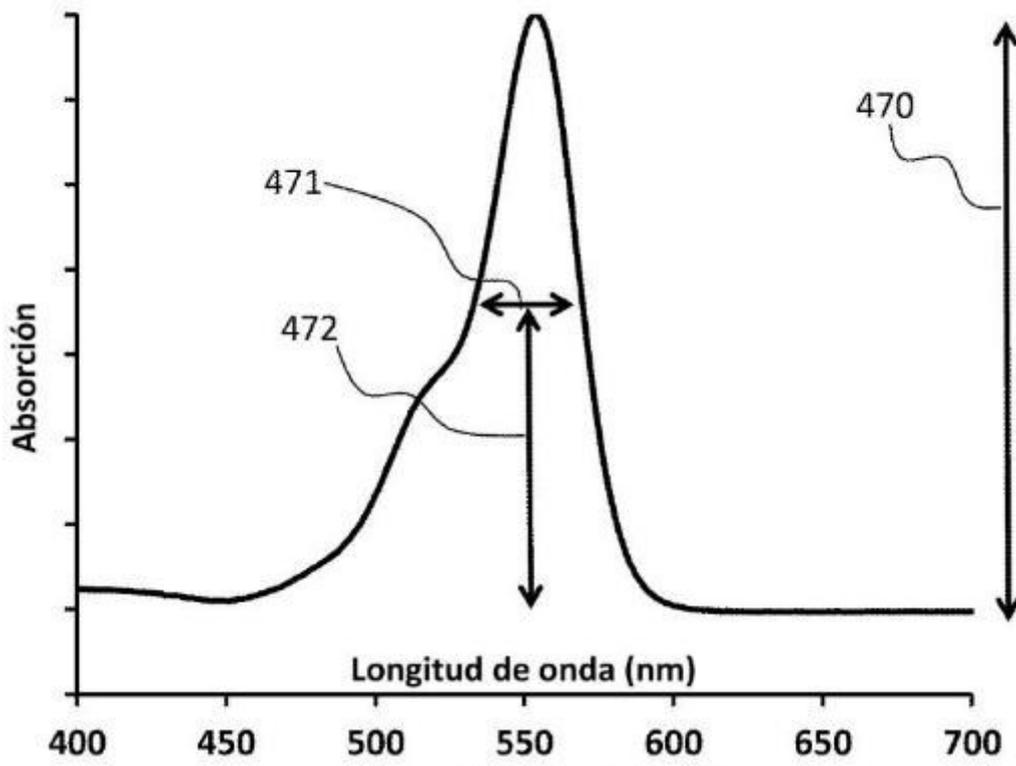


FIG. 15(A)

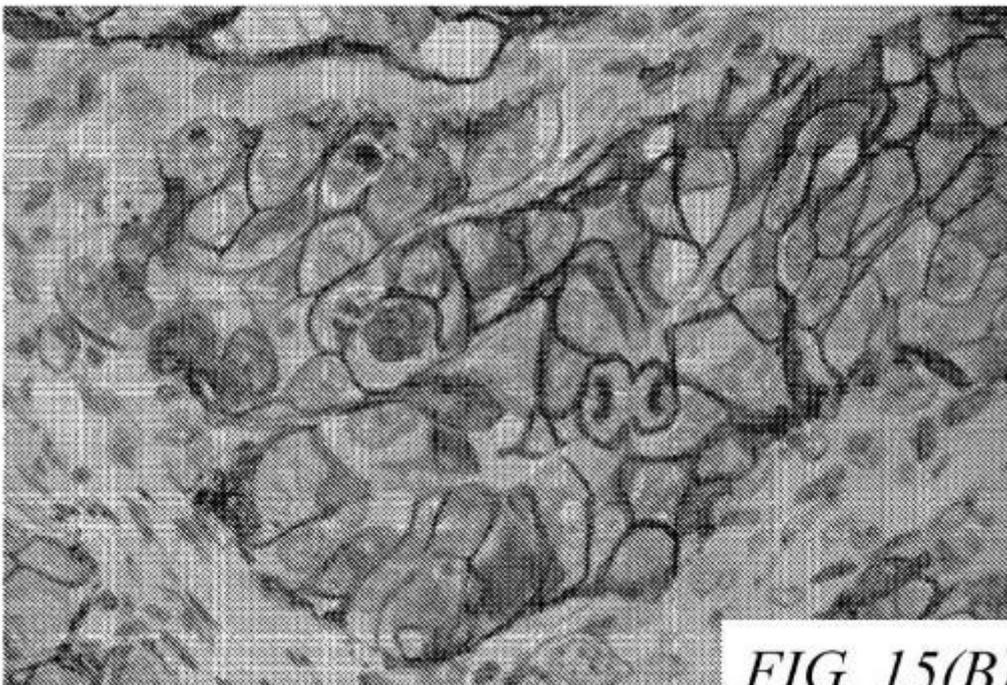


FIG. 15(B)

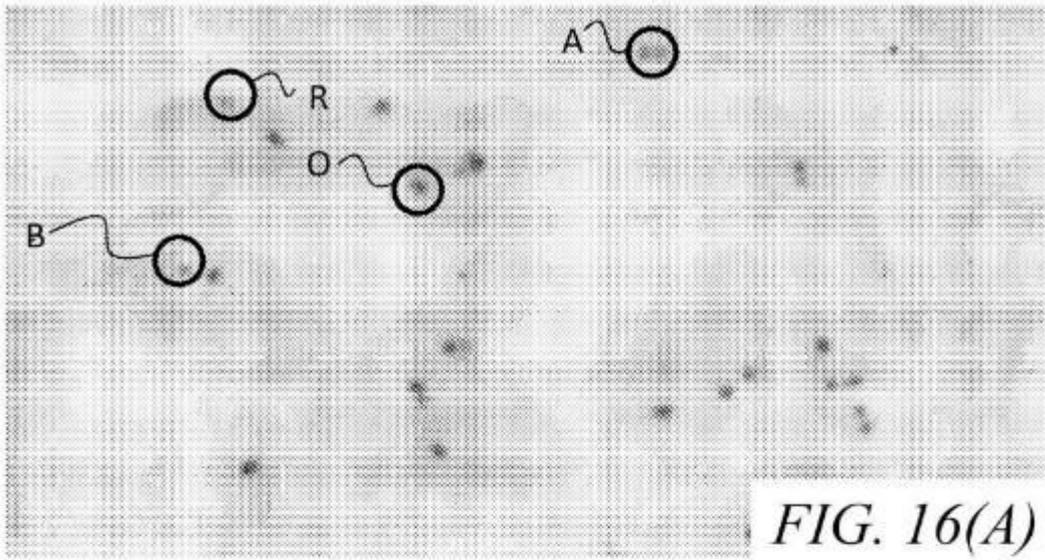


FIG. 16(A)

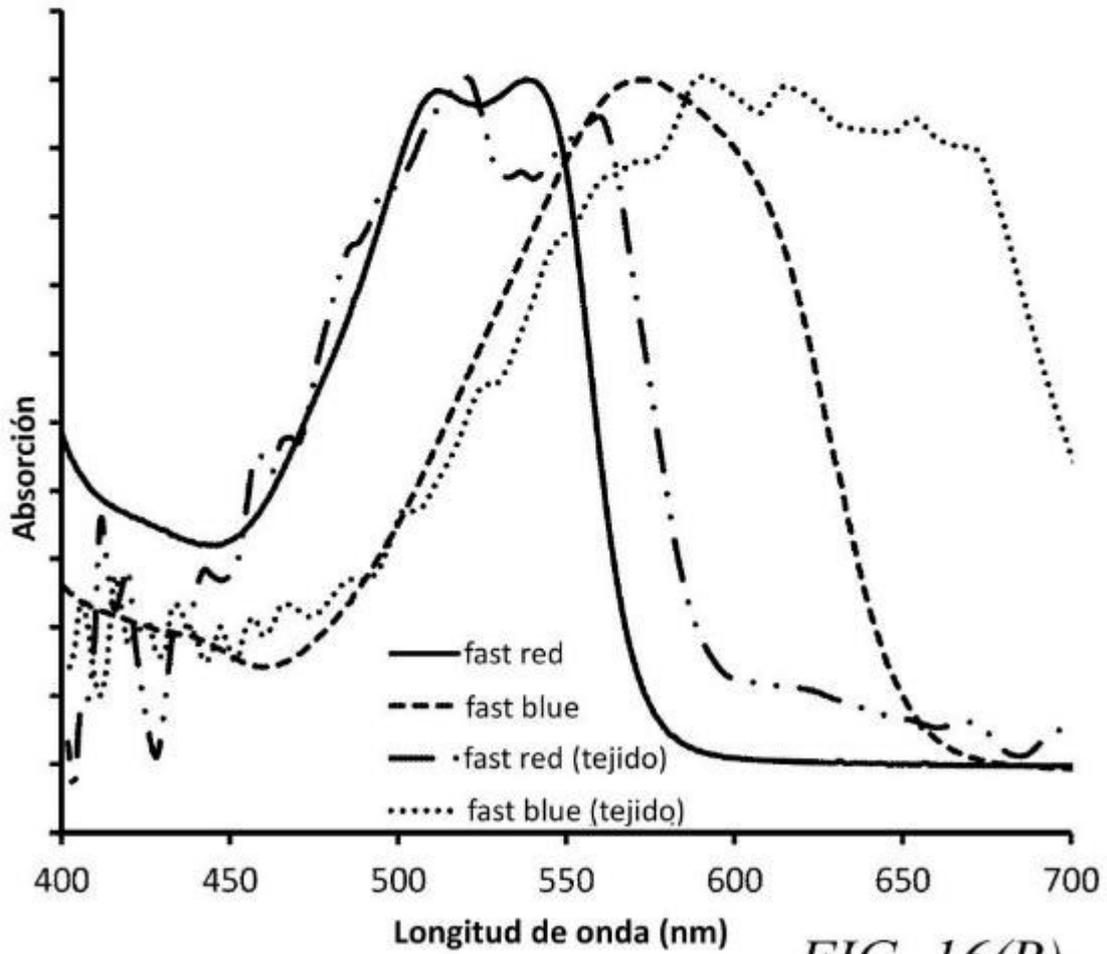


FIG. 16(B)

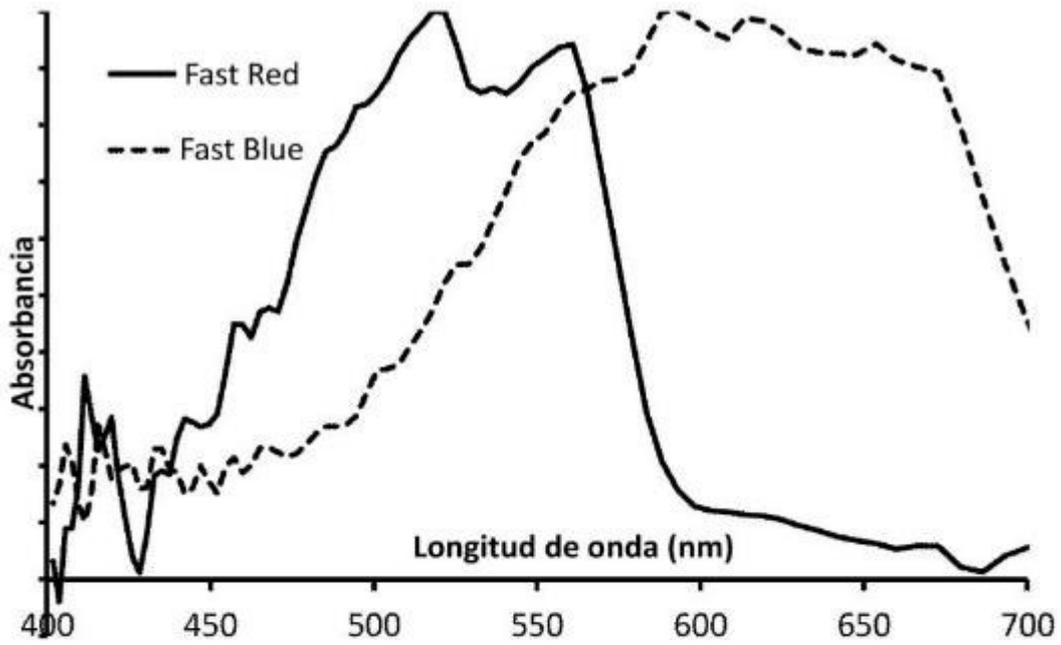


FIG. 17(A)

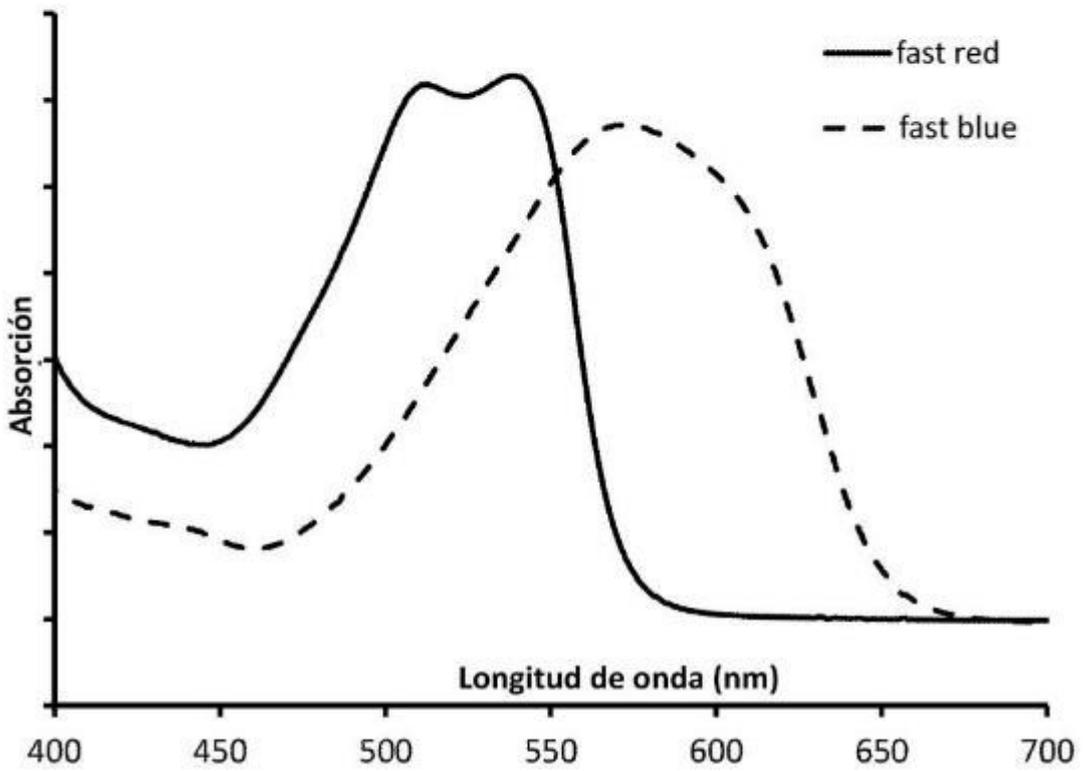


FIG. 17(B)

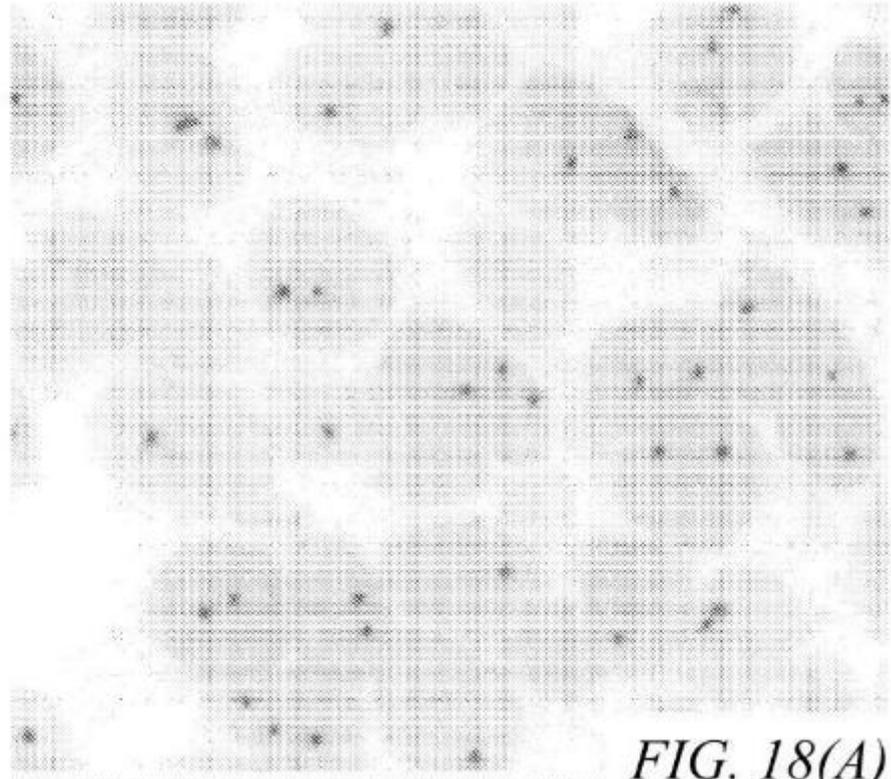


FIG. 18(A)

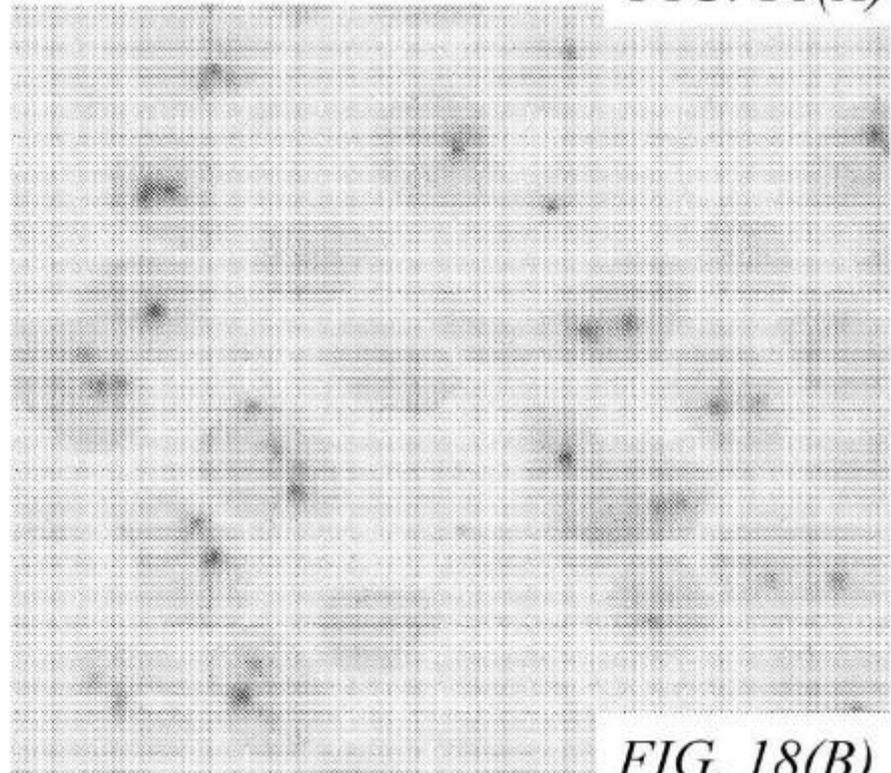
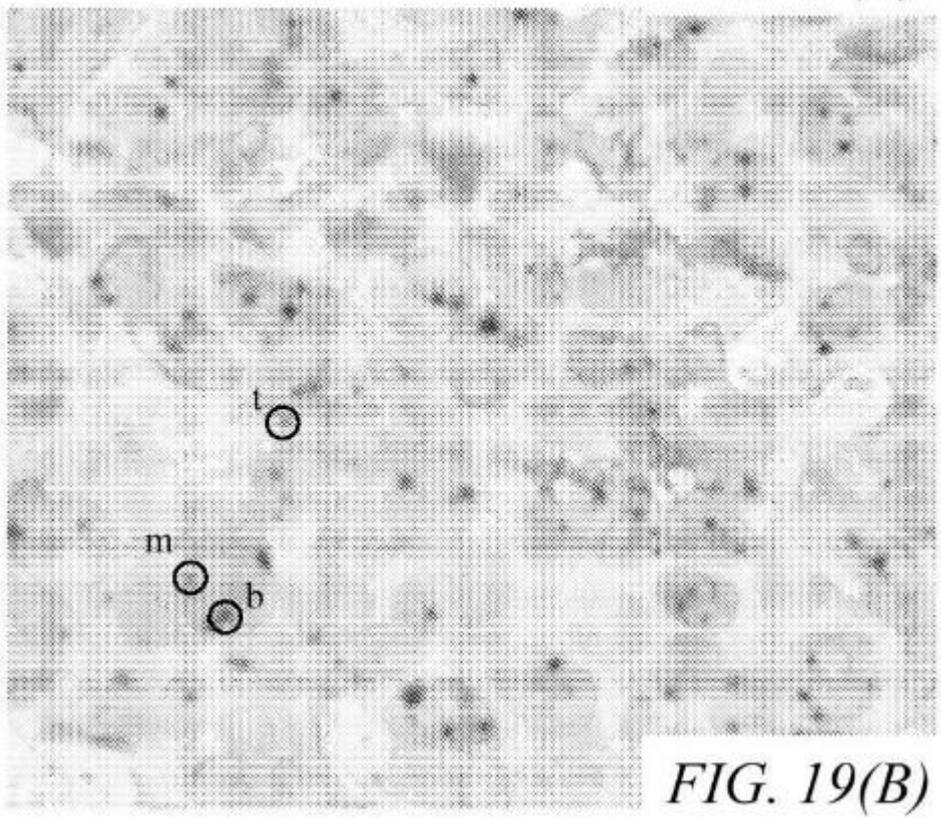
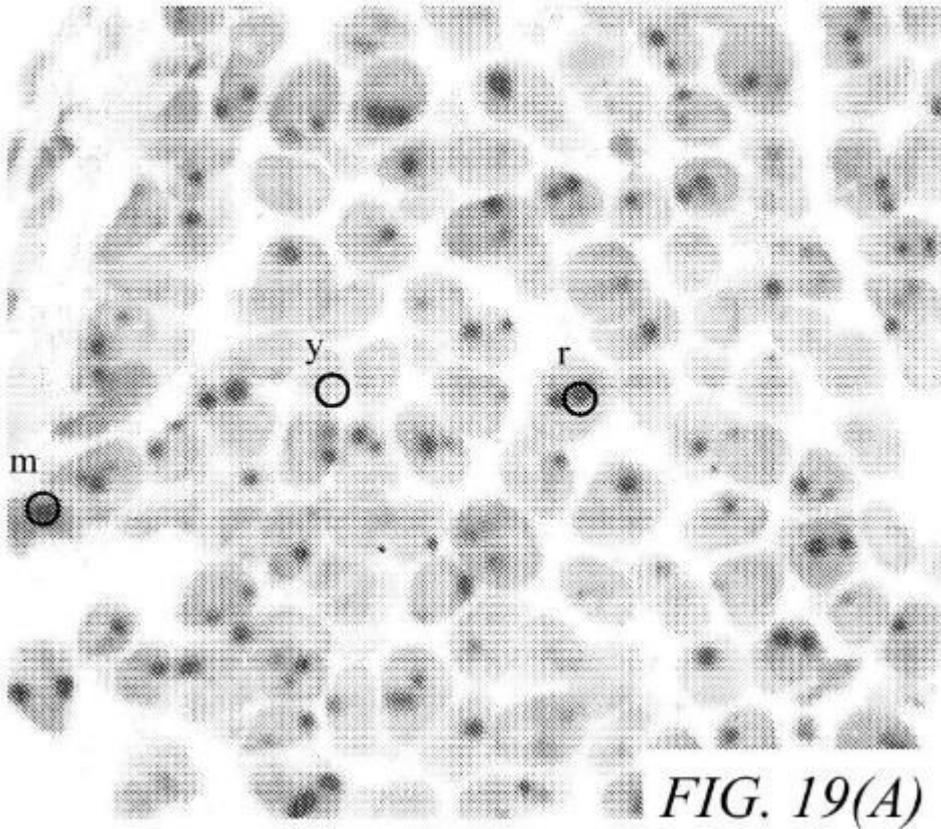


FIG. 18(B)



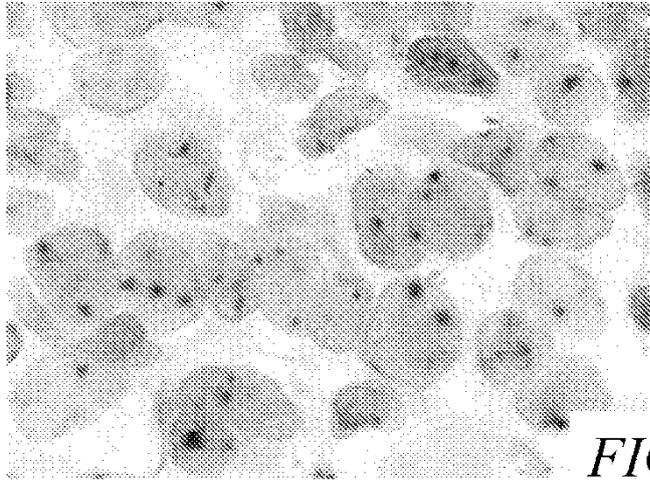


FIG. 20(A)

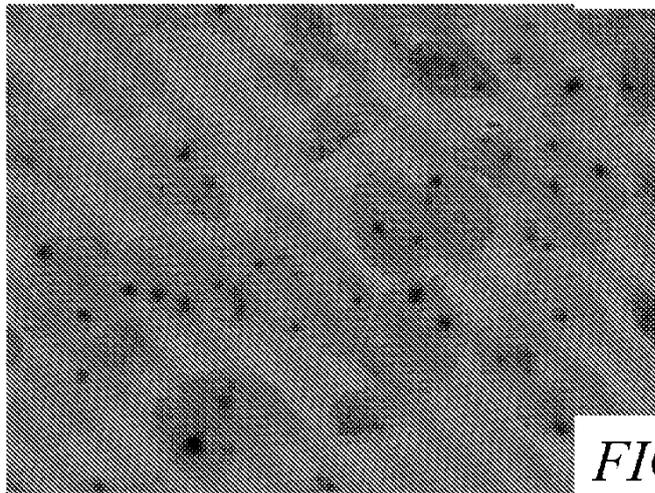


FIG. 20(B)

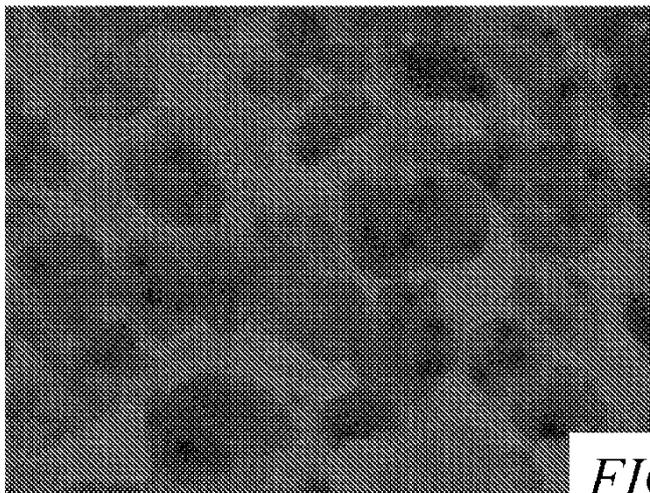


FIG. 20(C)

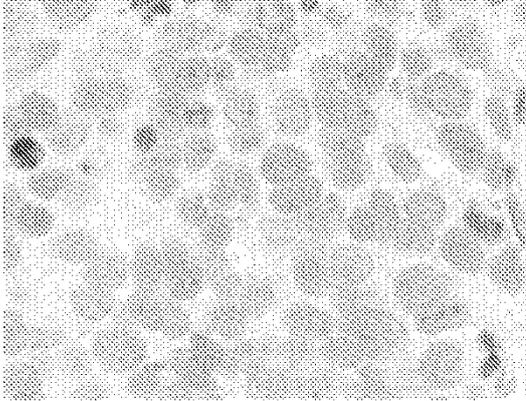


FIG. 21(A)

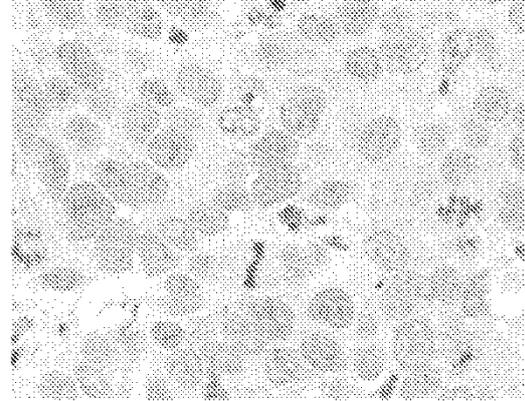


FIG. 21(B)

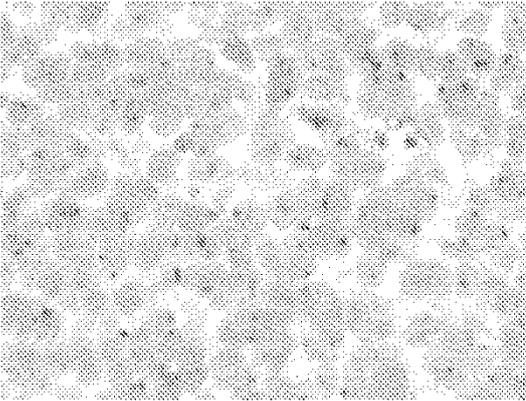


FIG. 22(A)

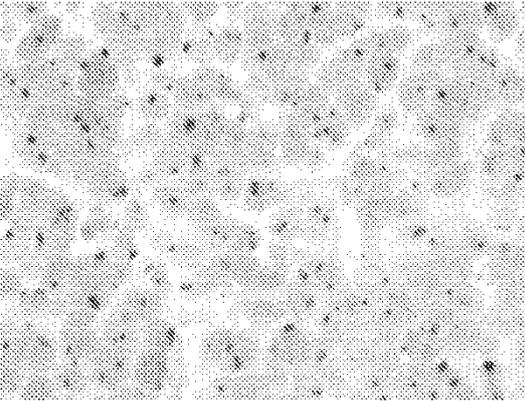


FIG. 22(B)

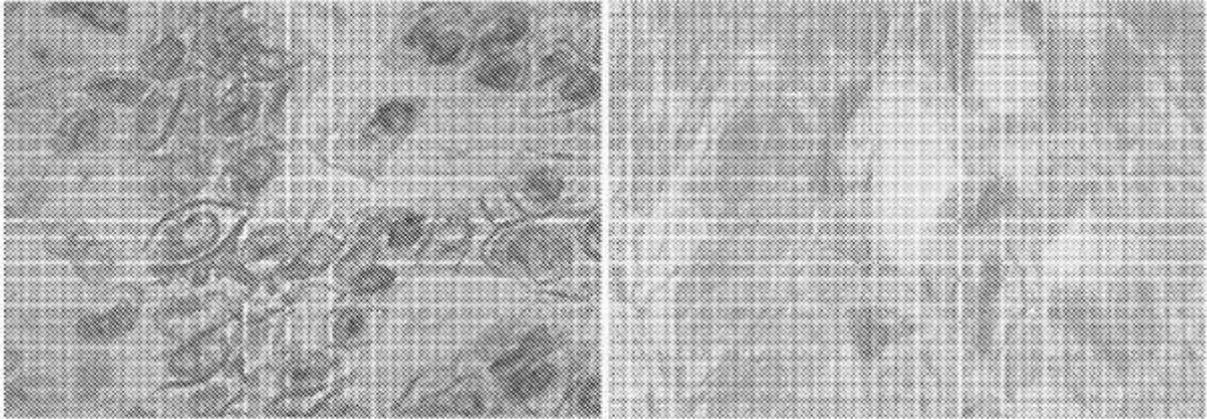


FIG. 23(A)

FIG. 23(B)

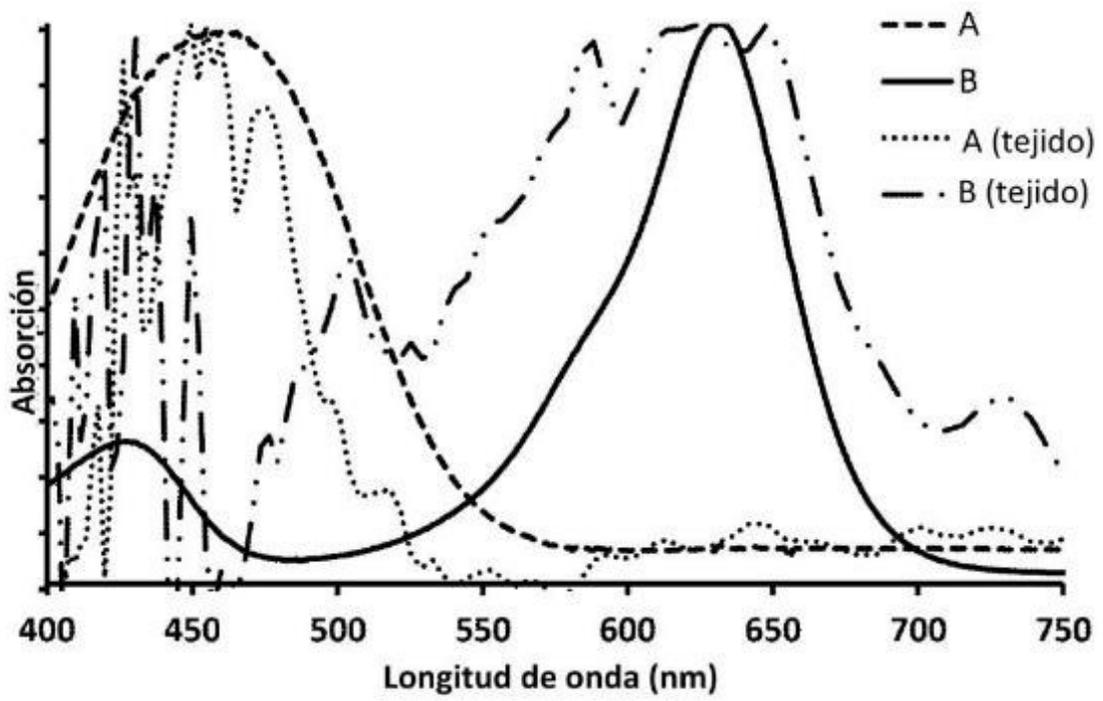


FIG. 24