

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 867**

51 Int. Cl.:

A61L 27/60 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/US2012/063183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12791608 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 2773390**

54 Título: **Métodos y composiciones para preparar muestras para inmunotinción**

30 Prioridad:

03.11.2011 US 201161555139 P

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

04.08.2021

73 Titular/es:

**TRIPATH IMAGING, INC. (100.0%)
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215, US**

72 Inventor/es:

**FISCHER, TIMOTHY, J.;
NELSON, RAMONA, R.;
TAYLOR, ADRIANN, J. y
WHITEHEAD, CLARK, M.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 847 867 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

Métodos y composiciones para preparar muestras para inmunotinción

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para potenciar la detección de proteínas haciendo los epítomos más accesibles para la unión de anticuerpos.

10 **Antecedentes de la invención**

La fijación de muestras de tejido y de células a menudo hace que los epítomos basados en proteínas sean inactivos o inaccesibles para la inmunotinción debido al entrecruzamiento de proteínas. La recuperación de antígenos (RA; en inglés, AR) es el proceso mediante el cual los epítomos diana se hacen accesibles para la inmunotinción. Superar el entrecruzamiento inducido por la fijación permite que los epítomos diana enterrados dentro de la estructura terciaria de las proteínas se vuelvan accesibles para unirse con anticuerpos primarios. La recuperación de antígenos también reduce ventajosamente el umbral para la detección de antígenos, reduciendo así la cantidad de anticuerpo necesaria para la detección, reduciendo la tinción de fondo y minimizando la aparición de resultados negativos falsos. Por tanto, los protocolos de inmunohistoquímica (IHC; del inglés, immunohistochemistry) e inmunocitoquímica (ICC; del inglés, immunocytochemistry) a menudo incluyen una etapa de pretratamiento para aumentar la intensidad de la inmunotinción y recuperar el antígeno de interés.

Muchas etapas de pretratamiento existentes para la inmunotinción implican la incubación de la muestra celular o tisular de interés a altas temperaturas de aproximadamente 80 °C o más en diversas soluciones (por ejemplo, tampones, EDTA, ácidos, bases, tensioactivos) para preparar la muestra para la inmunotinción. Estos tipos de métodos de pretratamiento de muestras se desarrollaron y optimizaron en gran medida para procesar muestras tisulares. Los tejidos pueden soportar la alta temperatura de procesamiento y mantener la morfología, porque estos tejidos a menudo se fijan en formalina y a continuación, se incluyen en parafina antes del corte y del procesamiento de IHC y porque las secciones de tejido mantienen el soporte de la arquitectura del tejido estromal circundante. Las muestras de citología no se fijan en el mismo grado que las muestras tisulares, normalmente no están incluidas en parafina y no contienen material de soporte estromal para mantener la morfología celular durante el pretratamiento a calor elevado. Por tanto, los métodos de pretratamiento a calor elevado que sirven para aumentar la exposición del epítomo y la accesibilidad al anticuerpo primario degradan la morfología celular de las muestras de citología.

Por tanto, se necesitan métodos de pretratamiento y composiciones que sean eficaces en la recuperación de antígenos, pero que mantengan la morfología celular, para el procesamiento de muestras de citología, en particular, en la preparación para la inmunotinción.

40 **Breve resumen de la invención**

En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos para preparar muestras para inmunotinción. Las composiciones desveladas en el presente documento incluyen kits que comprenden una primera solución que comprende un tensioactivo y una segunda solución que comprende un agente caotrópico. Las dos soluciones se utilizan en la recuperación de epítomos de proteínas al poner en contacto secuencialmente una muestra, como células o tejidos, con la primera solución y luego con la segunda solución. El antígeno expuesto está disponible a continuación, para unirse a un anticuerpo, que puede detectarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los métodos y composiciones desvelados en el presente documento permiten la recuperación de antígenos en ausencia de calor extremo, por tanto, manteniendo la morfología celular.

Estos y otros aspectos de la invención se desvelan en más detalle en la **Descripción de la invención** que se proporciona más adelante.

Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 proporciona una imagen de una muestra de citología cervical de lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL; del inglés, high-grade squamous intraepithelial lesion) de SurePath® (TriPath Imaging, Inc.) inmunoteñida con un anticuerpo antiKi67. Antes de la inmunotinción, la muestra se incubó a 50 °C durante 19 minutos en dodecilsulfato de sodio (SDS; del inglés, sodium dodecyl sulfate) al 0,1 %, se lavó en solución salina tamponada con Tris (TBS; del inglés, Tris-buffered saline) y a continuación, se incubó a 50 °C durante 19 minutos en perclorato de litio (LiClO₄) 3M/nonil fenoxipolietoxil etanol (NP-40) al 0,1 %. La muestra se tiñó por contraste con tinción de Papanicolau (Pap).

60 La Figura 2 proporciona una imagen de células SiHa (cáncer escamoso de cuello uterino humano) inmunoteñidas con un anticuerpo antiKi67. Antes de la inmunotinción, las células se incubaron a 50 °C durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavaron en TBS y a continuación, se incubaron a 50 °C durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %. Las células se tiñeron por contraste con tinción de Pap.

65 La Figura 3 proporciona una imagen de una muestra de citología cervical HSIL de SurePath® inmunoteñida con

un anticuerpo anti p16. Antes de la inmunotinción, la muestra se incubó a 50 °C durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavó en TBS y a continuación, se incubó a 50 °C durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %. La muestra se tiñó por contraste con tinción de Pap.

La Figura 4 proporciona una imagen de células SiHa inmunoteñidas con un anticuerpo anti p16. Antes de la inmunotinción, las células se incubaron a 50 °C durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavaron en TBS y a continuación, se incubaron a 50 °C durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %. Las células se tiñeron por contraste con tinción de Pap.

La Figura 5 proporciona una imagen de una sección histológica de tejido de amígdalas incluido en parafina inmunoteñido con dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7. El tejido de las amígdalas se fijó en formaldehído al 10 % durante al menos 24 horas y a continuación, se incluyó en parafina antes de seccionar. Antes de la inmunotinción, la sección se incubó a 50 °C durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavó en TBS y a continuación, se incubó a 50 °C durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %.

La Figura 6 proporciona una imagen de una sección histológica de tejido de neoplasia intraepitelial cervical 3 (CIN3) incluido en parafina inmunoteñido con dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7. El tejido de cuello uterino se fijó en formaldehído al 10 % durante al menos 24 horas y a continuación, se incluyó en parafina antes de seccionar. Antes de la inmunotinción, la sección se incubó a 50 °C durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavó en TBS y a continuación, se incubó a 50 °C durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %.

La Figura 7 proporciona una imagen de una muestra de citología cervical de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL; del inglés, low-grade squamous intraepithelial lesion) de SurePath® inmunoteñida con dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7. Antes de la inmunotinción, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavó en TBS y a continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %. La muestra se tiñó por contraste con tinción de Pap. La Figura 8 proporciona una imagen de una muestra de citología cervical de lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) de SurePath® inmunoteñida con dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7. Antes de la inmunotinción, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 19 minutos en SDS al 0,1 %, se lavó en TBS y a continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 19 minutos en LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %. La muestra se tiñó por contraste con tinción de Pap.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos que están dirigidos a preparar una muestra para tinción inmunológica mediante la exposición de epítomos de proteínas. Las composiciones incluyen kits que comprenden una primera solución que comprende un tensioactivo (solución de pretratamiento 1) y una segunda solución que comprende un agente caotrópico (solución de pretratamiento 2). Los métodos incluyen poner en contacto una muestra con una primera solución de pretratamiento que comprende un tensioactivo y a continuación, una segunda solución de pretratamiento que comprende un agente caotrópico. Una vez que se ha preparado la muestra y los epítomos se han expuesto, los antígenos pueden ponerse en contacto con anticuerpos y detectarse utilizando cualquier método de detección de unión antígeno-anticuerpo conocido en la técnica. El método de dos soluciones desvelado en el presente documento permite una recuperación de antígeno suficiente para la tinción inmunológica en ausencia de calor extremo, al tiempo que se mantiene la morfología celular. Esto es especialmente útil para muestras de citología que son más sensibles al calor extremo que a menudo es necesario para la recuperación de antígenos. El mantenimiento de la morfología celular durante el proceso de recuperación del antígeno es importante para las muestras para las que se evalúa posteriormente la morfología celular. Por ejemplo, las composiciones y métodos desvelados en el presente documento pueden utilizarse para detectar antígeno(s) en una muestra de citología cervical junto con la tinción de contraste de Papanicolau convencional.

Las composiciones y métodos desvelados en el presente documento están dirigidos a preparar una muestra para tinción inmunológica.

El kit de la presente invención se define en la reivindicación 1 y el método de la presente invención se define en la reivindicación 8. La tinción inmunológica o inmunotinción se refiere al proceso por el que una muestra se pone en contacto con al menos un anticuerpo y la unión del anticuerpo a su antígeno correspondiente dentro de la muestra se detecta utilizando cualquier método conocido en la técnica para detectar la unión antígeno-anticuerpo. Entre los ejemplos no limitantes de tinción inmunológica se incluyen la inmunohistoquímica, en donde se detecta un antígeno dentro de una muestra tisular y la inmunocitoquímica, en la que se detecta un antígeno dentro de una muestra celular. Las composiciones y métodos son eficaces para preparar muestras para tinción inmunológica, que se refiere a modificaciones de la muestra para permitir el acceso del anticuerpo utilizado en el proceso de tinción a su antígeno. Tales modificaciones incluyen la permeabilización de la membrana citoplasmática y en algunos casos, la membrana nuclear, la reversión de los entrecruzamientos de proteínas inducidos por fijadores (por ejemplo, puentes de metileno provocados por la fijación de aldehídos; véanse, por ejemplo, French y Edsall (1945) *Adv Protein Chem* 2:277; Pearse (1980) *Histochemistry: Theoretical and Applied* vol. 1; Fox et al. (1985) *J. Histochem. Cytochem.* 33:845) y la desnaturalización de los antígenos proteicos. El proceso de preparación de muestras para tinción inmunológica que permite el acceso del anticuerpo al antígeno también se denomina en el presente documento recuperación de antígenos o pretratamiento.

Como se usa en el presente documento, El término "antígeno" se refiere a un polipéptido que tiene actividad antigénica.

La "actividad antigénica" se refiere a la capacidad de un polipéptido para que se utilice en la producción de anticuerpos. Los métodos y composiciones desvelados en el presente documento pueden utilizarse para preparar muestras para la detección de cualquier tipo de antígeno, ya sea nuclear, citoplasmático, expresado sobre la superficie celular o extracelular. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos desvelados en el presente documento pueden utilizarse para mejorar la tinción inmunológica de antígenos nucleares y por tanto, son capaces de permeabilizar tanto las membranas citoplasmáticas como las nucleares. Entre los ejemplos no limitantes de antígenos nucleares que se pueden inmunotefñir utilizando los métodos desvelados en el presente documento se incluyen las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM; del inglés, minichromosome maintenance), tales como MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7 y MCM10 y topoisomerasa II. Entre los ejemplos no limitantes adicionales de antígenos que se pueden inmunotefñir utilizando los métodos desvelados en el presente documento se incluyen el receptor de estrógenos (ER; del inglés, estrogen receptor), el receptor de progesterona (PR; del inglés, progesterone receptor) y p53. En algunas de estas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento pueden utilizarse para inmunotefñir un panel de antígenos que incluyen ER, PR, p53 y Ki67. En otras realizaciones, las composiciones y los métodos desvelados en el presente documento son eficaces para mejorar la tinción inmunológica de p16 o Ki67.

Las composiciones y métodos desvelados en el presente documento utilizan dos soluciones para preparar una muestra para tinción inmunológica. Como se usa en el presente documento, el término "solución" se refiere a una mezcla de al menos dos sustancias. El término "solución" no se limita a una mezcla homogénea, sino que, como se utiliza en el presente documento, se refiere a mezclas que comprenden una fase ordenada así como a aquellas que comprenden una fase más desordenada. Por ejemplo, las soluciones que comprenden un tensioactivo en agua u otro líquido polar pueden contener una fase ordenada de micelas o una fase desordenada de moléculas libres de tensioactivo o iones en la solución o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la primera o la segunda solución de pretratamiento o ambas soluciones de pretratamiento son soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, el término "solución acuosa" se refiere a una mezcla que comprende agua. En estas realizaciones, el tensioactivo o el agente caotrópico o ambos, se dispersan o se disuelven en agua, que puede comprender o no componentes adicionales. En otras realizaciones, el tensioactivo o el agente caotrópico o ambos, se dispersan o se disuelven en un líquido polar distinto del agua.

Las composiciones y métodos desvelados en el presente documento implican una primera solución que comprende un tensioactivo (solución de pretratamiento 1) y en algunas realizaciones, la segunda solución (solución de pretratamiento 2) también comprende un tensioactivo. Como se usa en el presente documento, las expresiones "tensioactivo", "agente tensioactivo", y "detergente" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento y se refieren a moléculas que pueden reducir la tensión superficial de un líquido. Los tensioactivos tienen propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas y por tanto, pueden solubilizarse hasta cierto punto en agua o en disolventes no polares. Los tensioactivos se clasifican en cuatro grupos principales: catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se cree que la presencia de un tensioactivo en la primera solución de pretratamiento y en algunas realizaciones en la segunda solución de pretratamiento, contribuye a la permeabilización de las membranas citoplasmáticas y en algunos casos, las nucleares. Adicionalmente, tensioactivos, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), penetran también en el interior hidrófobo de las proteínas y equilibran la distribución de carga de las proteínas, desnaturalizando de este modo las proteínas y aumentando la exposición del epítipo y la accesibilidad al anticuerpo primario.

En algunas realizaciones de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento, la primera solución de pretratamiento comprende un tensioactivo aniónico. Los tensioactivos aniónicos son aquellos tensioactivos que tienen una carga neta negativa cuando se disuelven o se dispersan en soluciones acuosas. Entre los ejemplos representativos no limitantes de tensioactivos aniónicos se incluyen alquilsulfatos, tales como lauril sulfato de amonio y dodecilsulfato de sodio (SDS); alquil éter sulfatos, tales como lauril éter sulfato de sodio y miret sulfato de sodio; docusatos, tales como dioctil sulfosuccinato de sodio; sulfonatos fluorotensioactivos, tales como perfluorooctanosulfonato y perfluorobutanosulfonato; alquil benceno sulfonatos; alquil aril éter fosfatos; alquil éter fosfatos; carboxilatos de alquilo, tales como sales de ácidos grasos y estearato de sodio; lauroil sarcosinato de sodio; fluorotensioactivos de carboxilato, tales como perfluorononanoato y perfluorooctanoato; ésteres de alquil sulfato, tales como cetil sulfato sódico; alquil sulfonatos, tales como dodecil sulfonato de sodio y alquil alil sulfonatos; estearato de sodio; desoxicolato de sodio; y lauroil sarcosinato de sodio.

En otras realizaciones, el tensioactivo en la primera solución de pretratamiento es catiónico (es decir, tiene una carga neta positiva cuando se disuelve o se dispersa en soluciones acuosas), no iónico (es decir, no tiene carga cuando se disuelve o se dispersa en soluciones acuosas) o zwitteriónico (es decir, tiene una carga neta neutra cuando se disuelve o se dispersa en soluciones acuosas, pero tiene una carga eléctrica tanto negativa como positiva en diferentes emplazamientos dentro de la molécula de tensioactivo).

En ciertas realizaciones, la primera solución de pretratamiento comprende dodecilsulfato de sodio (SDS), que también se denomina laurilsulfato de sodio o lauril sulfato de sodio (SLS). El SDS consta de una cola de doce carbonos unida a un grupo sulfato y tiene la fórmula molecular $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$. En algunas de estas realizaciones, la primera solución de pretratamiento comprende aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 10 % de SDS, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente un 0,001 %, aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,01 %, aproximadamente un 0,02 %, aproximadamente un 0,03 %, aproximadamente un 0,04 %, aproximadamente un

0,05 %, aproximadamente un 0,06 %, aproximadamente un 0,07 %, aproximadamente un 0,08 %, aproximadamente un 0,09 %, aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 % y otros valores similares entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 10 % de SDS. En ciertas realizaciones, la primera solución de pretratamiento comprende aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1 % de SDS. En otras realizaciones, la primera solución de pretratamiento comprende aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 0,5 % de SDS.

La segunda solución de pretratamiento utilizada en las composiciones y métodos desvelados en el presente documento comprende un agente caotrópico. Como se usa en el presente documento, el término "agente caotrópico" se refiere a una sustancia que tiene la capacidad de desestabilizar interacciones intramoleculares mediadas por fuerzas no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrófobas, que permite que compuestos apolares, tales como proteínas, se disuelvan más fácilmente en soluciones acuosas. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se cree que el agente caotrópico en la segunda solución de pretratamiento contribuye a la disolución de las membranas biológicas y a la desnaturalización de las proteínas al permitir que las moléculas de agua penetren en el interior de las proteínas y solvatos cadenas laterales no polares, interrumpiendo así las interacciones hidrófobas que normalmente estabilizan la conformación nativa. Entre los ejemplos no limitantes de agentes caotrópicos adecuados para utilizar en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se incluyen sales caotrópicas, urea y tiourea.

En algunas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende una sal caotrópica. Como se usa en el presente documento, la expresión "sal caotrópica" se refiere a un compuesto iónico compuesto por cationes y aniones que puede funcionar como un agente caotrópico como se define en otra parte del presente documento. En general, es el anión de la sal el que contribuye a las propiedades caotrópicas de una sal caotrópica. La posición de un ion en la serie de Hofmeister (véanse, por ejemplo, Hofmeister (1888) Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 24:247-260; Zhang and Cremer (2006) Curr Opin Chem Biol 10:658-663, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento en su totalidad), que ordena los iones en función de su capacidad para solvatar proteínas, se puede utilizar para seleccionar una sal caotrópica para utilizar en las composiciones y métodos desvelados en el presente documento. Se esperaría que los iones que aparecen después en la serie de Hofmeister, tales como SCN^- , ClO_4^- , I^- , ClO_3^- y Br^- , tuvieran propiedades caotrópicas mayores. Por tanto, en algunas realizaciones, la sal caotrópica comprende un anión seleccionado del grupo que consiste en SCN^- (tiocianato), CNS^- , ClO_3^- , ClO_4^- (perclorato), I^- , Br^- , NO_3^- , Cl^- , CH_3CO_2^- (acetato). Entre los ejemplos no limitantes de sales caotrópicas adecuadas para utilizar en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se incluyen clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina y perclorato de litio.

En realizaciones particulares, la sal caotrópica es un tiocianato o un perclorato, que se refiere a una sal que comprende cationes y aniones, en donde el anión es tiocianato (SCN^-) o perclorato (ClO_4^-). En algunas de estas realizaciones, la sal caotrópica es un perclorato. Entre los ejemplos no limitantes de percloratos adecuados para utilizar en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se incluyen perclorato de amonio (NH_4ClO_4), perclorato de cesio (CsClO_4), perclorato de litio (LiClO_4), perclorato de magnesio ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$), perclorato potásico (KClO_4), perclorato de rubidio (RbClO_4), perclorato de plata (AgClO_4), ácido perclórico (HClO_4), perclorato de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$) y perclorato de sodio (NaClO_4). En ciertas realizaciones, la sal caotrópica en la segunda solución de pretratamiento es perclorato de litio (LiClO_4).

En algunas de las realizaciones en donde la segunda solución de pretratamiento comprende perclorato de litio, el perclorato de litio está presente dentro de la segunda solución de pretratamiento a una concentración de aproximadamente 0,3M a aproximadamente 30M, incluyendo, pero sin limitación, a aproximadamente 0,3M, aproximadamente 0,4M, aproximadamente 0,5M, aproximadamente 0,6M, aproximadamente 0,7M, aproximadamente 0,8M, aproximadamente 0,9M, aproximadamente 1M, aproximadamente 2M, aproximadamente 3M, aproximadamente 4M, aproximadamente 5M, aproximadamente 6M, aproximadamente 7M, aproximadamente 8M, aproximadamente 9M, aproximadamente 10M, aproximadamente 11M, aproximadamente 12M, aproximadamente 13M, aproximadamente 14M, aproximadamente 15M, aproximadamente 16M, aproximadamente 17M, aproximadamente 18M, aproximadamente 19M, aproximadamente 20M, aproximadamente 21M, aproximadamente 22M, aproximadamente 23M, aproximadamente 24M, aproximadamente 25M, aproximadamente 26M, aproximadamente 27M, aproximadamente 28M, aproximadamente 29M y aproximadamente 30M. En ciertas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende perclorato de litio aproximadamente 1M a aproximadamente 10M. En algunas de estas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende perclorato de litio aproximadamente 3M.

En otras realizaciones, la sal caotrópica presente en la segunda solución de pretratamiento es un tiocianato. Entre los ejemplos no limitantes de tiocianatos adecuados para utilizar en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se incluyen tiocianato de potasio (KSCN), tiocianato de sodio (NaSCN), tiocianato de amonio (NH_4SCN) y tiocianato de guanidina ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$; también denominado tiocianato de guanidinio). En ciertas

realizaciones, la sal caotrópica es tiocianato de guanidina, que está compuesta por el catión guanidinio (CH_6N_3^+) y el anión tiocianato (SCN^-).

5 En algunas de las realizaciones en donde la segunda solución de pretratamiento comprende tiocianato de guanidina, el tiocianato de guanidina está presente dentro de la segunda solución de pretratamiento a una concentración de aproximadamente 0,3M a aproximadamente 30M, incluyendo, pero sin limitación, a aproximadamente 0,3M, aproximadamente 0.4M, aproximadamente 0.5M, aproximadamente 0.6M, aproximadamente 0.7M, aproximadamente 0.8M, aproximadamente 0.9M, aproximadamente 1M, aproximadamente 2M, aproximadamente 3M, aproximadamente 4M, aproximadamente 5M, aproximadamente 6M, aproximadamente 7M, aproximadamente 8M, aproximadamente 10 9M, aproximadamente 10M, aproximadamente 11M, aproximadamente 12M, aproximadamente 13M, aproximadamente 14M, aproximadamente 15M, aproximadamente 16M, aproximadamente 17M, aproximadamente 18M, aproximadamente 19M, aproximadamente 20M, aproximadamente 21M, aproximadamente 22M, aproximadamente 23M, aproximadamente 24M, aproximadamente 25M, aproximadamente 26M, aproximadamente 27M, aproximadamente 28M, aproximadamente 29M, aproximadamente 30M y otros valores similares entre 15 aproximadamente 0.3M y aproximadamente 30M. En ciertas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende tiocianato de guanidina aproximadamente 1M a aproximadamente 10M. En algunas de estas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende tiocianato de guanidina aproximadamente 3M.

20 En ciertas realizaciones, además del agente caotrópico, la segunda solución de pretratamiento comprende un tensioactivo débil. Como se usa en el presente documento, la expresión "tensioactivo débil" se refiere a un tensioactivo o concentración de un tensioactivo que es capaz de lisar células de mamíferos, pero que mantiene o tiene un efecto mínimo sobre la morfología celular. Entre los ejemplos no limitantes de tensioactivos débiles se incluyen tensioactivos no iónicos o zwitteriónicos. Como alternativa, un tensioactivo débil puede ser una molécula de tensioactivo que es capaz de cambiar la morfología celular en algunas concentraciones (por ejemplo, tensioactivo aniónico), pero está 25 presente en la segunda solución de pretratamiento en una concentración lo suficientemente baja como para que el tensioactivo tenga un efecto mínimo sobre la morfología celular.

30 Los tensioactivos zwitteriónicos son aquellos tensioactivos que tienen una carga neta neutra cuando se disuelven o se dispersan en soluciones acuosas, pero tienen una carga eléctrica tanto negativa como positiva en diferentes emplazamientos dentro de la molécula de tensioactivo. Entre los ejemplos no limitantes de tensioactivos zwitteriónicos adecuados para utilizar en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se incluyen los que se basan en aminas primarias, secundarias o terciarias o cationes de amonio cuaternario emparejados con sulfonatos, tales como 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS); carboxilatos, tales como betaínas y aminoácidos; o fosfatos, tales como lecitina.

35 Los tensioactivos no iónicos son aquellos tensioactivos que no tienen carga cuando se disuelven o se dispersan en soluciones acuosas. Entre los ejemplos no limitantes representativos de tensioactivos no iónicos adecuados para utilizar en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se incluyen polisorbatos, incluyendo, aunque sin limitación, ésteres de ácido graso de sorbitano polietoxilados (por ejemplo, compuestos de Tween®), tales como monooleato de polioxietileno (POE) sorbitano (Tween® 80), monoestearato de POE sorbitano (Tween® 60), monolaurato de POE sorbitano (Tween® 20) y monopalmitato de POE sorbitano (Tween® 40); derivados de sorbitano (por ejemplo, compuestos de Span®); copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno (por ejemplo, compuestos Pluronic®, que también se conocen como poloxámeros); compuestos de polioxietileno éter, tales como los de la familia Brij®, que incluyen pero no se limitan a polioxietileno estearil éter (también conocido como polioxietileno (100) estearil 45 éter y por el nombre comercial Brij® 700); polioxietilenglicol octilfenol éteres, tales como polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-100®); polioxipropilenglicol alquil éteres; éteres de alquil glucósido, tales como octil glucósido; éteres de alquil glucósido; polioxietilenglicol alquilfenol éteres; nonil fenoxilpolietoxiletanol (NP-40; también conocido como Tergitol® tipo NP-40); y éteres de alcoholes grasos.

50 En algunas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende nonilfenol etoxilado (NP-40). En algunas de las realizaciones en donde la segunda solución de pretratamiento comprende NP-40, el NP-40 está presente dentro de la segunda solución de pretratamiento a una concentración de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 10 %, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente un 0,001 %, aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,01 %, aproximadamente un 0,02 %, aproximadamente un 0,03 %, aproximadamente un 0,04 %, aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,06 %, aproximadamente un 0,07 %, aproximadamente un 0,08 %, aproximadamente un 0,09 %, aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, 60 aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 % y otros valores similares entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 10 %. En ciertas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1 % de NP-40. En otras realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 0,5 % de NP-40. En algunas de estas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento 65 comprende aproximadamente un 0,1 % de NP-40.

Por tanto, en algunas realizaciones, la segunda solución de pretratamiento comprende una solución acuosa de perclorato de litio o de tiocianato de guanidina aproximadamente 3 M y aproximadamente un 0,1 % de NP-40. En algunas de estas realizaciones, esta segunda solución de pretratamiento se utiliza junto con una primera solución de pretratamiento que comprende una solución acuosa de aproximadamente 0,1 % de SDS para preparar muestras para tinción inmunológica.

Las dos soluciones de pretratamiento desveladas en el presente documento se utilizan en la preparación de muestras para tinción inmunológica. Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra biológica o a una muestra obtenida a partir de un material biológico en el que se puede detectar la expresión de una proteína. Entre los ejemplos no limitantes de muestras biológicas se incluyen células (incluidas muestras de citología y células cultivadas), tejidos, biopsias, frotis y fluidos corporales, tales como sangre, linfa, orina, saliva y fluidos ginecológicos. Las muestras biológicas se pueden obtener de un paciente mediante una diversidad de técnicas incluyendo, por ejemplo, mediante lavado, raspado o frotis de un área o mediante el uso de una aguja para aspirar fluidos corporales. Los métodos para recoger diversas muestras biológicas son bien conocidos en la técnica.

La muestra puede no fijarse o fijarse utilizando cualquier método o fijador conocido en la técnica. Entre los ejemplos no limitantes de fijadores adecuados para utilizar en las composiciones y métodos desvelados en el presente documento se incluyen fijadores de entrecruzamientos, tales como aldehídos (por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído, formalina), que crean enlaces químicos covalentes entre proteínas mediante la formación de puentes de metileno (véanse, por ejemplo, French y Edsall (1945) *Adv Protein Chem* 2:277; Pearse (1980) *Histochemistry: Theoretical and Applied* vol. 1; Fox et al. (1985) *J. Histochem. Cytochem.* 33:845); fijadores de precipitación, tales como alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol) y acetona; agentes de oxidación, tales como tetróxido de osmio, dicromato de potasio, ácido crómico y permanganato potásico; mercuriales, tales como B-5 y de Zenker; y picratos.

En algunas realizaciones, la muestra comprende una muestra de tejido. Las muestras de tejido se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo congelar o incluir el tejido en parafina o una resina epoxi o acrílica antes de seccionar. En ciertas realizaciones, la muestra de tejido se fija en una solución que comprende aproximadamente un 10 % de formaldehído durante aproximadamente 24 horas antes de seccionar.

En realizaciones particulares, la muestra comprende células de cuello uterino, como muestras de tejido de cuello uterino o como células de cuello uterino en suspensión, concretamente en una preparación de base líquida. En algunas realizaciones, las muestras de cuello uterino se recogen de acuerdo con las pautas de preparación de muestras de citología de base líquida tales como, por ejemplo, SurePath® (TriPath Imaging, Inc.) o la preparación ThinPrep® (CITYC, Inc.). Las muestras de cuello uterino pueden transferirse a un portaobjetos de vidrio para verlas con aumento.

En algunas de estas realizaciones, se recoge una muestra de cuello uterino de la paciente en un medio líquido, tal como, por ejemplo, en un vial de recogida de SurePath™ (TriPath Imaging, Inc.). Se utiliza un procesador automatizado tal como el sistema PrepStain™ (TriPath Imaging, Inc.) para recoger células del medio líquido y depositarlas en una monocapa sobre un portaobjetos de vidrio para su análisis adicional.

En una realización, la muestra de cuello uterino se recogerá y procesará para proporcionar una muestra de monocapa, como se establece en la patente de Estados Unidos N° 5.346.831, incorporada en el presente documento por referencia. El método de monocapa se refiere a un método para producir una monocapa de material citológico sobre un sustrato cargado catiónicamente. El método comprende los etapas de separar el material citológico por centrifugación sobre un gradiente de densidad, producir un sedimento empaquetado del material citológico, mezclar el sedimento del material citológico, retirar una alícuota de un volumen predeterminado del sedimento mezclado, depositar la alícuota y un volumen predeterminado de agua en un recipiente de sedimentación, que se fija de forma extraíble al sustrato cargado catiónicamente, permitiendo que el material citológico se asiente sobre el sustrato bajo la fuerza de la gravedad y después del asentamiento del material citológico, se elimina el agua del recipiente de sedimentación. Para un análisis automatizado, el recipiente de sedimentación puede desprenderse del sustrato. La disgregación puede realizarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tal como inyección con jeringa, tripsinización, ultrasonido, agitación, agitación con formación de vórtice o mediante el uso del dispositivo descrito en la patente de Estados Unidos N.º 5.316.814, cuyos contenidos se han incorporado como referencia en la presente documento.

Los especímenes de los portaobjetos pueden estar fijados o sin fijar y pueden analizarse inmediatamente después de la preparación o pueden almacenarse para un análisis posterior. En algunas realizaciones, los portaobjetos preparados se almacenan en etanol aproximadamente al 95 % durante un mínimo de 24 horas. Como alternativa, en otras realizaciones, los portaobjetos se almacenan en la primera solución de pretratamiento desvelada en el presente documento (es decir, una solución que comprende un tensioactivo).

De acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento para preparar una muestra para tinción inmunológica, la muestra primero se pone en contacto con la primera solución de pretratamiento que comprende un tensioactivo y a continuación, con la segunda solución de pretratamiento que comprende un agente caotrópico y en algunas realizaciones, un tensioactivo débil. La muestra puede ponerse en contacto con las soluciones de pretratamiento desveladas en el presente documento utilizando cualquier método que dé como resultado que la muestra entre en contacto con la solución. Por tanto, en algunas realizaciones, la solución de pretratamiento se puede

añadir a la muestra de tal manera que cubra la muestra con la solución. Como alternativa, la muestra se puede añadir a la solución de pretratamiento y en algunas realizaciones, la muestra se puede sumergir en la solución.

En algunas realizaciones, la muestra se incuba con la primera solución de pretratamiento durante al menos un minuto.
 5 En otras realizaciones, la muestra se incuba con la primera solución de pretratamiento durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 120 minutos, incluyendo, aunque sin limitación, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17,
 10 aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120 minutos y otros valores similares entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 120 minutos. En realizaciones particulares, la muestra se incuba con la primera solución de pretratamiento durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos. En algunas de estas realizaciones, la muestra se incuba con la primera solución de pretratamiento que comprende un tensioactivo durante aproximadamente 19 minutos.

En otras realizaciones, la primera solución de pretratamiento puede servir también como un tampón de almacenamiento para una muestra, concretamente una muestra que se ha fijado, en donde la muestra se almacena en la primera solución de pretratamiento durante al menos aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente un mes, aproximadamente 1 año o más.

La muestra se puede incubar en la primera solución de pretratamiento a temperatura ambiente o se puede aplicar calor. Por tanto, en algunas realizaciones, la temperatura de incubación de la muestra en la primera solución de pretratamiento es de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 46 °C, aproximadamente 47 °C, aproximadamente 48 °C, aproximadamente 49 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 51 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 57 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 59 °C, aproximadamente 60 °C y otros valores similares entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 60 °C. En ciertas realizaciones, la muestra se incuba con la primera solución de pretratamiento a una temperatura de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C. En algunas de estas realizaciones, la temperatura de incubación es de aproximadamente 50 °C.

En realizaciones particulares, la muestra se incuba con la primera solución de pretratamiento a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 19 minutos. En algunas de estas realizaciones, la primera solución de pretratamiento es una solución acuosa que comprende aproximadamente un 0,1 % de SDS.

Después de la incubación de la muestra en la primera solución de pretratamiento que comprende un tensioactivo, la muestra se pone en contacto con una segunda solución de pretratamiento que comprende un agente caotrópico y en algunas realizaciones, un tensioactivo débil. Esto se puede lograr eliminando la muestra de la primera solución de pretratamiento o eliminando la solución de la muestra y a continuación, transfiriendo la muestra a la segunda solución de pretratamiento o aplicando la segunda solución a la muestra. Después de retirar la primera solución de pretratamiento de la muestra o la muestra de la primera solución de pretratamiento, la muestra puede lavarse para eliminar la primera solución de pretratamiento residual antes de poner en contacto la muestra con la segunda solución de pretratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "lavar" en lo que respecta a una muestra se refiere a poner en contacto transitoriamente la muestra con otra solución, que no sea la primera o la segunda solución de pretratamiento para eliminar trazas del componente activo de la solución de pretratamiento (por ejemplo, tensioactivo, caotrópico agente). En algunas realizaciones, la solución de lavado es agua o una solución salina tamponada. Se conocen en la técnica diversas soluciones salinas tamponadas utilizadas para los métodos biológicos celulares y moleculares e incluyen, pero sin limitación, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con HEPES y solución salina tamponada con tris (TBS). En algunas realizaciones, la muestra se lava con solución salina tamponada con tris después de eliminar la primera solución de pretratamiento y antes de poner en contacto la muestra con la segunda solución de pretratamiento. La muestra puede lavarse una o más veces con la solución de lavado.

A continuación, la muestra se pone en contacto con la segunda solución de pretratamiento que comprende un agente

caotrópico y en algunas realizaciones, un tensioactivo débil. En algunas realizaciones, la muestra se incuba con la segunda solución de pretratamiento durante al menos un minuto. En otras realizaciones, la solución se incuba con la segunda solución de pretratamiento durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 120 minutos, incluyendo, aunque sin limitación, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120 minutos y otros valores similares entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 120 minutos. En realizaciones particulares, la muestra se incuba con la segunda solución de pretratamiento durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos. En algunas de estas realizaciones, la muestra se incuba con la segunda solución de pretratamiento durante aproximadamente 19 minutos.

La muestra se puede incubar en la segunda solución de pretratamiento a temperatura ambiente o se puede aplicar calor. Por tanto, en algunas realizaciones, la temperatura de incubación de la muestra en la segunda solución de pretratamiento es de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 46 °C, aproximadamente 47 °C, aproximadamente 48 °C, aproximadamente 49 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 51 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 57 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 59 °C, aproximadamente 60 °C y otros valores similares entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 60 °C. En ciertas realizaciones, la muestra se incuba con la segunda solución de pretratamiento a una temperatura de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C. En algunas de estas realizaciones, la temperatura de incubación es de aproximadamente 50 °C.

En realizaciones particulares, la muestra se incuba con la segunda solución de pretratamiento a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 19 minutos. En algunas de estas realizaciones, la muestra se ha incubado con la primera solución de pretratamiento a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 19 minutos antes de la incubación con la segunda solución de pretratamiento.

Un experto en la técnica reconocerá que la temperatura de incubación y el período de tiempo de la incubación con la primera, segunda o primera y segunda soluciones de pretratamiento variarán dependiendo del tipo de muestra que se esté preparando para la inmunotinción y del grado en que la muestra se haya fijado. Por ejemplo, las muestras que se han fijado con un fijador de entrecruzamiento podrían requerir una temperatura más alta o un período de incubación más largo con la primera, segunda o primera y segunda soluciones de pretratamiento en comparación con una muestra que se ha fijado con alcohol. Adicionalmente, una muestra de tejido incluida en parafina podría ser capaz de soportar mayores temperaturas de incubación y períodos de incubación más prolongados con la primera, segunda o primera y segunda soluciones de pretratamiento que una muestra de citología, sin afectar a la morfología celular.

Una vez que se ha preparado la muestra poniendo en contacto la muestra con la primera y segunda soluciones de pretratamiento, el método puede comprender además utilizar cualquier método conocido en la técnica para detectar un antígeno en la muestra preparada utilizando un anticuerpo. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" abarcan ampliamente formas de origen natural de anticuerpos y anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen al menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o un grupo funcional químico conjugado con el anticuerpo.

Los "anticuerpos" y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Si bien los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de este último tipo, por ejemplo, se producen a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles aumentados por mielomas.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos) y péptidos recombinantes que comprenden el anterior.

En el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la

población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente, la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar 35 con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión al antígeno. En una especie de Fv bicatenario, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En una especie de Fv monocatenario, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se pueden unir covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio C_{H1} de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en los que el resto (o los restos) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos.

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar inmunizando un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con un inmunógeno proteico. El título de anticuerpos en el sujeto inmunizado se puede controlar a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando proteína inmovilizada. En un momento adecuado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma del VEB (en inglés, EBV) (Cole *et al.* (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld and Sell (Alan R. Liss, Inc., Nueva York, Nueva York), págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase en términos generales, Coligan *et al.*, eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, Nueva York); Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Kenneth (1980) en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses* (Plenum Publishing Corp., Nueva York); y Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402).

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal mediante el cribado de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos) con una proteína de interés para aislar así los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen a la proteína de interés. Los kits para generar y seleccionar bibliotecas de presentación en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el *Recombinant Phage Antibody System* de Pharmacia, N.º de catálogo 27-9400-01; y el *SurfZAP & Phage Display Kit* de Stratagene, N.º de catálogo 240612). De manera adicional, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para utilizar en la generación y cribado de bibliotecas de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.223.409; las Publicaciones PCT N.º WO 92/18619; el documento WO 91/17271; documento WO 92/20791; el documento WO 92/15679; 93/01288; documento WO 92/01047; 92/09690; y 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734.

Tras la incubación de la muestra con la primera y segunda soluciones de pretratamiento y antes de la incubación con un anticuerpo, las muestras pueden bloquearse usando un agente de bloqueo apropiado, por ejemplo, un reactivo de bloqueo de peroxidasa tal como peróxido de hidrógeno. En algunas realizaciones, las muestras se bloquean utilizando un reactivo de bloqueo de proteínas para evitar la unión no específica del anticuerpo. El reactivo de bloqueo de proteínas puede comprender, por ejemplo, caseína purificada.

Un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, dirigido a un antígeno de interés se incuba, a continuación, con la muestra. Puede utilizarse más de un anticuerpo en el procedimiento de inmunotinción. Cuando se usa más de un anticuerpo, estos anticuerpos se pueden añadir a una sola muestra secuencialmente como reactivos de anticuerpos

individuales o simultáneamente como un cóctel de anticuerpos. Como alternativa, cada anticuerpo individual puede añadirse a una muestra separada del mismo paciente y los datos resultantes pueden combinarse.

5 Las técnicas para detectar la unión de anticuerpos son bien conocidas en la técnica. La unión de un anticuerpo a un antígeno de interés puede detectarse mediante el uso de reactivos químicos que generan una señal detectable que corresponde al nivel de unión del anticuerpo y en consecuencia, al nivel de expresión del antígeno. Entre los ejemplos no limitantes de sustancias detectables que pueden utilizarse para detectar la unión de antígeno-anticuerpo se incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen peroxidasa de rábano picante, 10 fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de complejos con grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; entre los ejemplos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y entre los ejemplos de un material radiactivo adecuado se incluyen I^{125} , I^{131} , ^{35}S o 3H .

En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo se detecta mediante el uso de un anticuerpo secundario que se conjuga con un polímero marcado. Entre los ejemplos de polímeros marcados se incluyen, pero sin limitación, 20 conjugados de polímero-enzima. Las enzimas en estos complejos se utilizan normalmente para catalizar la deposición de un cromógeno en el sitio de unión antígeno-anticuerpo, dando como resultado de este modo una tinción celular que corresponde al nivel de expresión del antígeno de interés. Las enzimas de interés particular incluyen la peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) y fosfatasa alcalina (FAL; en inglés, AP). Los sistemas comerciales de detección de anticuerpos, tales como, por ejemplo, el sistema Dako Envision+ y el sistema Mach 3 de Biocare Medical, pueden utilizarse para poner en práctica la presente invención.

25 En realizaciones particulares, la unión del anticuerpo a un antígeno se detecta mediante el uso de un polímero marcado con HRP que conjuga con un anticuerpo secundario. La unión de anticuerpos también se puede detectar mediante el uso de un reactivo de sonda de ratón, que se une a anticuerpos monoclonales de ratón y de un polímero conjugado con HRP, que se une al reactivo de sonda de ratón. En algunos aspectos de la invención, las muestras se revisan 30 microscópicamente por un citotecnólogo y/o un patólogo para evaluar la tinción celular. Como alternativa, las muestras pueden revisarse mediante microscopía automatizada o por personal con ayuda de un software informático que facilite la identificación de células de tinción positivas.

35 Con respecto a la detección de tinción de anticuerpos, también existen en la técnica, métodos de microscopía de vídeo y software para la determinación cuantitativa de una cantidad de múltiples especies moleculares en una muestra biológica en donde cada especie molecular presente está indicada por un marcador de colorante representativo que tiene un color específico. Tales métodos también se conocen en la técnica como métodos de análisis colorimétrico. En estos métodos, microscopía de vídeo se utiliza para proporcionar una imagen de la muestra después de que se haya teñido para indicar visualmente la presencia de un antígeno de interés concreto. Algunos de estos métodos, tales 40 como los desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 09/957.446 de Marcelpoil *et al.* y en la patente de Estados Unidos N.º 10/057.729 de Marcelpoil *et al.*, incorporadas por referencia en el presente documento, desvelan el uso de un sistema de formación de imágenes y un software asociado para determinar las cantidades relativas de cada especie molecular presente basándose en la presencia de marcadores de colorantes de colores representativos como se indica por la densidad óptica o el valor de transmitancia de esos marcadores de colorantes 45 de colores, respectivamente, según lo determinado por un sistema de formación de imágenes y software asociado. Estas técnicas proporcionan determinaciones cuantitativas de las cantidades relativas de cada especie molecular en una muestra biológica teñida utilizando una imagen de vídeo única que se "deconstruye" en partes de sus colores componentes.

50 Adicionalmente, el emplazamiento de antígenos dentro de la célula también es una consideración importante en los métodos de tinción inmunológica. Las proteínas que presentan patrones de tinción nuclear, citoplasmática o de membrana pueden confirmarse morfológicamente y son apropiadas para los métodos de inmunohistoquímica. La tinción citoplasmática y de membrana, sin embargo, hace difícil identificar las características morfológicas críticas de la enfermedad de cuello uterino (por ejemplo, relación entre nuclear y citoplasmática) en ensayos de 55 inmunocitoquímica. Por el contrario, las proteínas que se expresan en el núcleo y muestran un patrón de tinción nuclear facilitan la detección de la tinción de anticuerpos y permiten también el análisis morfológico. Por tanto, en algunas realizaciones, solo las proteínas que se expresan selectivamente en el núcleo se detectan utilizando los procedimientos de pretratamiento e inmunotinción desvelados en el presente documento.

60 Un experto en la técnica reconocerá que se necesita la optimización del título de anticuerpos y química de detección para maximizar la relación señal/ruido para un anticuerpo concreto. Se determinarán las concentraciones de anticuerpos que maximizan la unión específica a un antígeno de interés y minimizan la unión no específica (o "fondo"). El diseño de ensayos para optimizar el título de anticuerpos y las condiciones de detección es convencional y está dentro de las capacidades de rutina de los expertos en la técnica.

65 Adicionalmente, un experto en la técnica reconocerá que la concentración de un anticuerpo concreto utilizado para

practicar los métodos desvelados en el presente documento variará dependiendo de factores tales como el tiempo de unión y el nivel de especificidad del anticuerpo por su antígeno. Además, cuando se utilizan múltiples anticuerpos, la concentración requerida puede verse afectada por el orden en que los anticuerpos se aplican a la muestra, es decir, simultáneamente como un cóctel o secuencialmente como reactivos de anticuerpos individuales. Adicionalmente, la química de detección utilizada para visualizar la unión del anticuerpo a un antígeno de interés también debe optimizarse para producir la relación señal/ruido deseada.

Los métodos de pretratamiento desvelados en el presente documento permiten el mantenimiento de la morfología celular de las muestras. Por tanto, en algunas realizaciones, se pueden evaluar las características morfológicas de la muestra. Por ejemplo, la inmunotinción se puede combinar con la tinción de Pap convencional de modo que se conserve toda la información morfológica del método convencional. De esta manera, la detección de biomarcadores específicos, tales como los desvelados en la patente de Estados Unidos N.º 7.510.838, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, puede reducir la alta tasa de negativos falsos de la prueba de frotis de Pap y puede facilitar el cribado automatizado masivo. En algunas realizaciones, el procedimiento de inmunotinción se combina con la tinción de Pap convencional en un único método. Un método combinado de inmunocitoquímica y tinción de Pap permite la visualización tanto de biomarcadores que se sobreexpresan selectivamente en la enfermedad de cuello uterino de alto grado como de la morfología celular en una sola muestra (por ejemplo, un portaobjetos de microscopio que comprende una monocapa de células de cuello uterino). El método combinado de inmunocitoquímica y tinción de Pap puede permitir la identificación y el diagnóstico más precisos de la enfermedad de cuello uterino de alto grado, concretamente en casos clasificados erróneamente como normales, LSIL o ASCUS por la prueba de Pap convencional.

Un experto en la técnica reconocerá que los parámetros de tinción (por ejemplo, tiempos de incubación, condiciones de lavado, concentraciones de cromógeno/tinción, etc.) para esta metodología combinada deberán optimizarse de manera que se obtenga un contraste suficiente entre el resultado de la inmunotinción (por ejemplo, tinción cromógena) y la tinción de Pap. El diseño de ensayos para optimizar los parámetros de tinción es convencional y está dentro de las capacidades de rutina de los expertos en la técnica.

Un experto en la técnica apreciará adicionalmente que cualquiera o todas las etapas en los métodos de la invención podrían implementarse por el personal o como alternativa, realizarse de una forma automatizada utilizando, por ejemplo, el Autostainer Universal Staining System (Dako) o el Biocare Nemesis Autostainer (Biocare). Por tanto, las etapas de preparación de la muestra, tinción de la muestra y detección de la expresión del antígeno pueden automatizarse.

Las composiciones desveladas en el presente documento incluyen kits para practicar los métodos de pretratamiento de inmunotinción desvelados en el presente documento. Estos kits comprenden una primera solución que comprende un tensioactivo (que en algunas realizaciones es un tensioactivo aniónico, tal como SDS) y una segunda solución que comprende un agente caotrópico (que en algunas realizaciones es un tiocianato, como el tiocianato de guanidina o un perclorato, tal como perclorato de litio) y en algunas realizaciones, un tensioactivo débil (por ejemplo, NP-40).

En algunas realizaciones, los kits comprenden adicionalmente un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. En algunas de estas realizaciones, los kits comprenden adicionalmente más de un anticuerpo que detecta específicamente la expresión de al menos dos antígenos distintos. Cada anticuerpo puede proporcionarse en el kit como un reactivo individual o como alternativa, como un cóctel de anticuerpos que comprende todos los anticuerpos dirigidos a los diferentes antígenos de interés.

El kit puede comprender además productos químicos para la detección de la unión del anticuerpo al antígeno y en algunas realizaciones, una tinción de contraste y opcionalmente, un agente azulado para facilitar la identificación de células de tinción positiva. En una realización, el kit comprende un anticuerpo secundario que está conjugado con un polímero marcado con HRP. Pueden proporcionarse adicionalmente cromógenos compatibles con la enzima conjugada (por ejemplo, DAB en el caso de un anticuerpo secundario marcado con HRP) y soluciones, tales como peróxido de hidrógeno, para bloquear la tinción no específica. En otras realizaciones, la unión del anticuerpo a un antígeno se detecta mediante el uso de un reactivo de sonda de ratón que se une a anticuerpos monoclonales de ratón, seguido de la adición de un polímero de dextrano conjugado con HRP que se une al reactivo de sonda de ratón. Tales reactivos de detección están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Biocare Medical.

Puede proporcionarse adicionalmente un agente azulado (por ejemplo, hidróxido de amonio o TBS, pH 7,4, con Tween-20 y azida de sodio) en el kit para facilitar la detección de células de tinción positiva.

Se pueden incluir controles positivos y/o negativos en los kits para validar la actividad y el uso correcto de los reactivos empleados de acuerdo con la invención. Los controles pueden incluir muestras, tales como secciones de tejido, células fijadas en portaobjetos de vidrio, etc., que se sabe que son positivas o negativas para la presencia del antígeno de interés. En una realización particular, el control positivo comprende células SiHa. Ésta es una línea celular de cáncer escamoso de cuello uterino humano que es hipertriploide y positiva para la infección por VPH-16 (en inglés, HPV-16) y por tanto, sirve como control positivo para la sobreexpresión de biomarcadores en estadios de enfermedad

de cuello uterino de alto grado. Las células de control de SiHa se pueden proporcionar en los kits desvelados en el presente documento como portaobjetos preparados o como una suspensión de células que sea compatible con la preparación de portaobjetos. El diseño y uso de controles es convencional y está dentro de las capacidades de rutina de los expertos en la técnica.

5 Los kits para realizar los métodos de pretratamiento desvelados en el presente documento y el método combinado de inmunotinción y tinción de Pap también se abarcan en la presente invención. Tales kits comprenden los reactivos necesarios para la etapa de pretratamiento, el procedimiento de inmunotinción, como se ha descrito anteriormente en el presente documento y los reactivos para la tinción de Pap convencional, concretamente EA50 y Orange G.

10 Los kits desvelados en el presente documento son compatibles con técnicas de pretratamiento e inmunotinción tanto manuales como automatizadas. Cualquiera o todos los reactivos del kit se pueden proporcionar dentro de contenedores que los protegen del entorno externo, tales como en contenedores sellados.

15 Cabe señalar que el término "un" o "uno/a" se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo" representa uno o más anticuerpos. Como tal, las expresiones "un" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

20 A lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las palabras "comprenden", "comprende", y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario.

25 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor significa que abarca variaciones de, en algunas realizaciones $\pm 50\%$, en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$ y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ a partir de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos desvelados o emplear las composiciones desveladas.

30 Adicionalmente, cuando una cantidad, una concentración u otro valor o parámetro se da como intervalo, intervalo preferido o lista de valores preferibles superiores y valores preferibles inferiores, se ha de entender que se desvelan específicamente todos los intervalos formados a partir de cualquier par de cualquier límite de intervalo superior o valor preferido y cualquier límite de intervalo inferior o valor preferido, independientemente de si los intervalos se desvelan por separado. En los casos en los que se cita un intervalo de valores numéricos en el presente documento, salvo que se indique de otra forma, el intervalo está destinado a incluir los puntos finales del mismo y todos los números enteros y las fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la materia objeto desvelada en el presente documento se limite a los valores específicos citados cuando se define un intervalo.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden utilizarse cualesquier procedimientos y materiales similares a los que se describen en el presente documento en la puesta en práctica o en el ensayo de la presente invención, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferidos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

45 PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Análisis de soluciones de recuperación de antígenos y temperaturas de incubación.

50 Históricamente, la mayoría de las técnicas de recuperación de antígenos (RA) basadas en tejidos han utilizado altas temperaturas, $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y/o tratamiento con diversas soluciones. El procedimiento de RA para la detección de los antígenos MCM2 y MCM7 en muestras de citología cervical de SurePath® (TriPath Imaging, Inc.) utilizando un cóctel de tres anticuerpos desvelado en las patentes de Estados Unidos N.º 7.595.380 (anticuerpos antiMCM2 27C5.6 y 26H6.19) y N.º 7.632.498 (anticuerpo antiMCM7 2E6.2), las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad, se optimizó como se describe más adelante en el presente documento para mantener la morfología celular, al tiempo que se asegura la inmunotinción adecuada de los especímenes de la citología mediante la investigación de múltiples soluciones de RA y temperaturas de incubación.

60 Se probó una amplia gama de soluciones de RA (pretratamiento) potenciales ($n = 43$) en especímenes de citología de SurePath® para determinar cuáles tendrían un efecto positivo sobre la inmunotinción con un cóctel de anticuerpos triple (dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7) que la detecta enfermedad de cuello uterino de alto grado. Las soluciones de prueba y las observaciones iniciales se agrupan a continuación:

- Enzimas (por ejemplo, pepsina, tripsina) ($n=6$); morfología celular degradada sin ganancia sustancial de inmunorreactividad.
- 65 • Ácidos y bases ($n=4$); no se observó inmunorreactividad sustancial.
- Disolventes orgánicos/diversos ($n=9$); no se observó inmunorreactividad sustancial.

- Tampones (por ejemplo, EDTA, citrato) y sales caotrópicas (n=15); sales caotrópicas fuertes, especialmente el perclorato de litio (LiClO₄) solo y junto con algunos tensioactivos, conservaron la morfología y mostraron inmunorreactividad fuerte. Otros demostraron beneficios limitados en la inmunorreactividad.
- Tensioactivos (por ejemplo, Tween 20, Brij 35) (n=9); la mayoría no mostraron aumento sustancial en la inmunotinción. El dodecilsulfato de sodio (SDS) y el nonil fenoxipolietoxiletanol (NP-40) demostraron un aumento moderado en la inmunotinción solos y en combinación con la actividad de algunas soluciones de sales caotrópicas.

Las combinaciones de soluciones de pretratamiento que mostraron una actividad prometedora se analizaron adicionalmente. El proceso de pretratamiento que dio como resultado una inmunotinción de MCM2/MCM7 y una morfología celular óptimas para las muestras de SurePath® implica un procedimiento de dos etapas, en el que las células se trataron primero con SDS al 0,1 %, seguido de una incubación con LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %. Este proceso de dos etapas aprovecha dos mecanismos distintos de recuperación de antígenos para estimular la inmunorreactividad. Tanto SDS como NP-40 son tensioactivos y al tiempo que sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se cree que el mecanismo de acción principal de SDS y NP-40 es aumentar la permeabilidad tanto de la membrana citoplasmática como de la envoltura nuclear. Las dianas de proteínas del cóctel de anticuerpos triple (MCM2 y MCM7) residen dentro del núcleo celular; por tanto, el anticuerpo primario necesita cruzar tanto la membrana citoplasmática como la envoltura nuclear. El aumento de la permeabilidad de estas estructuras celulares ayuda a la capacidad del anticuerpo primario para atravesar ambas barreras y acceder a los antígenos diana. Al tiempo que sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se cree que el segundo mecanismo de acción del método de pretratamiento de dos soluciones es la desnaturalización de proteínas mediante el uso de desnaturalizantes de proteínas fuertes, específicamente de sales caotrópicas. Las sales caotrópicas ejercen esta acción al interrumpir los enlaces proteicos internos, abriendo por tanto la estructura terciaria de la proteína y aumentando la accesibilidad de los epítomos diana enmascarados.

En los experimentos restantes descritos más adelante en el presente documento en el Ejemplo 1, el proceso de recuperación de antígenos utilizó la Solución de pretratamiento 1 (SDS al 0,1 %) y la Solución de pretratamiento 2 (LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %). A continuación, se determinó la temperatura de incubación y el período de tiempo óptimos para las muestras con cada solución.

Las altas temperaturas (mayores o iguales a 80 °C) son comunes en la mayoría de los procedimientos de recuperación de antígenos para la inmunohistoquímica basada en tejidos (IHC; del inglés, tissue-based immunohistochemistry). El calor ayuda a romper los enlaces de entrecruzamiento provocados durante la fijación del tejido. Los métodos actuales de calentamiento en la mayoría de los procedimientos de IHC incluyen baños de agua, hornos microondas y/u ollas a presión. Los tejidos pueden resistir estos tratamientos severos de RA porque se fijan usando soluciones con formaldehído y porque los tejidos comprenden material celular estromal de soporte que ayuda en la conservación de la arquitectura tisular y de la morfología celular. Por el contrario, las muestras de citología habitualmente no se fijan o se fijan ligeramente y se componen de células discretas que no tienen soporte estromal acompañante, lo que hace que dichas muestras sean más sensibles a los tratamientos convencionales de RA a alta temperatura. Se probó un intervalo de temperaturas de RA y tiempos de incubación con soluciones de RA para determinar la temperatura y el período de tiempo que genera la inmunotinción adecuada en tanto que se mantiene una morfología celular óptima.

Se investigó un intervalo de temperaturas de RA utilizando el cóctel de anticuerpos triple (anticuerpos antiMCM2 27C5.6 y 26H6.19 y anticuerpo antiMCM7 2E6.2) en muestras de citología cervical de SurePath®. Se llevó a cabo un análisis de 90 muestras de citología cervical incubadas secuencialmente con la Solución de pretratamiento 1 y la Solución de pretratamiento 2 durante períodos de tiempo que varían de 10 a 30 minutos y en un intervalo de temperaturas de 30 °C a 80 °C. Todos los portaobjetos fueron evaluados por citotecnólogos certificados. Se registró el porcentaje de células de cuello uterino anormales que mostraban inmunotinción, así como la morfología celular de cada muestra. La morfología se registró en una escala de 1 - 3, con 1 siendo inaceptable (degradación morfológica presente) y 3 siendo óptima (sin diferencia respecto a los métodos de RA convencionales). Los métodos de RA convencionales que se utilizaron como comparación en cada uno de los ejemplos experimentales presentados en el presente documento y que también se denominan en el presente documento como el "método del vaporizador", consistieron en las siguientes etapas: 1) calentar un tarro de Coplin que comprende 0,5 % de Sandopan LS (lauril éter-13-carboxilato de sodio) en un vaporizador o un baño de agua a más de 95 °C; 2) sumergir el portaobjetos en la solución de Sandopan LS al 0,5 % calentada durante 20 minutos; y 3) retirar el tarro de Coplin de la fuente de calor y dejar que el tarro se enfríe durante 10 minutos antes de continuar con el procedimiento de inmunotinción.

Los datos indicaron que todas las muestras de cuello uterino tratadas con una temperatura de recuperación de antígenos de 55 °C o inferior mantuvieron la conservación óptima de la morfología celular de cuello uterino normal, mientras que una temperatura de recuperación de antígenos de 80 °C dio como resultado una morfología celular de cuello uterino degradada (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la morfología de las células de cuello uterino tras la incubación con la Solución de pretratamiento 1 y la Solución de pretratamiento 2 a diversas temperaturas.

Escala de calificación	Temperatura		
	30 °C	55 °C	80 °C
1 (morfología inaceptable)	0	0	30

(continuación)

Escala de calificación	Temperatura		
	30 °C	55 °C	80 °C
2 (morfología aceptable)	0	0	0
3 (morfología óptima)	30	30	0
Casos totales	30	30	30

Se llevaron a cabo estudios de temperatura de recuperación de antígenos adicionales para investigar un intervalo de temperaturas de RA focalizado de 37 °C a 60 °C. Estos estudios indicaron que las características celulares sutiles, tales como un rizado ligero de la periferia de las células escamosas, se manifiestan a una temperatura de incubación de 60 °C. La Tabla 2 contiene los datos de 12 especímenes de citología cervical emparejados que se trataron con temperaturas de RA de 37 °C o 60 °C durante una hora en total. Después de la incubación de las muestras durante 30 minutos a 60 °C en la Solución de RA 1 y 30 minutos a 60 °C en la Solución de RA 2, se manifiesta el plegamiento citoplasmático. Por tanto, se determinó que 60 °C es el límite superior de temperatura para la incubación con soluciones de recuperación de antígenos para muestras de SurePath®.

Tabla 2. Comparación de la temperatura de recuperación de antígenos utilizando especímenes de citología emparejados.

Morfología	Temperatura	
	37 °C	60 °C
Morfología óptima	11*	6*
Rizado citoplasmático observado	1	6
Total	12	12

* Un caso mostró glóbulos blancos degradados a ambas temperaturas debido a la mala conservación de la muestra. Esto se confirmó mediante la presencia de glóbulos blancos degradados en la Pap de SurePath® convencional para esta muestra.

El límite superior de temperatura de RA de 60 °C no depende de la duración de la incubación. Los especímenes de cuello uterino de alto grado agrupados incubados a 60 °C durante 15, 30 o 60 minutos en cada una de las Soluciones de pretratamiento 1 y de las Soluciones de pretratamiento 2 mostraron rizado citoplasmático, si bien los especímenes incubados a 37 °C o 42 °C durante los mismos periodos de tiempo no tuvieron degradación morfológica (véase la Tabla 3). Estos datos respaldan una restricción de diseño crítica de mantener una temperatura de RA por debajo de 60 °C con el fin de garantizar una morfología celular óptima que es equivalente a una Pap de SurePath® de base líquida convencional.

Tabla 3. Morfología de agrupaciones de cuello uterino de alto grado incubadas a diversas temperaturas y periodos de tiempo con soluciones de pretratamiento.

Tiempo de incubación (min)	Temperatura de RA (°C)	Morfología celular
15	37	Óptima
15	42	Óptima
15	60	Rizado citoplasmático
30	37	Óptima
30	42	Óptima
30	60	Rizado citoplasmático
60	37	Óptima
60	42	Óptima
60	60	Rizado citoplasmático

Los estudios de RA demuestran que la morfología celular se puede mantener entre el intervalo de temperaturas de 42 °C y 55 °C. Para los estudios adicionales utilizando el cóctel de anticuerpos triple de dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7 en muestras de SurePath®, se seleccionó una temperatura de RA de 50 °C puesto que dio como resultado una inmunotinción óptima y que estaba muy por debajo del límite superior de temperatura de 60 °C.

Ejemplo 2. Comparación de los efectos del método de pretratamiento de dos etapas con un método de pretratamiento de alta temperatura sobre la inmunotinción y la morfología en muestras de citología cervical.

Este estudio comparó el método de pretratamiento de dos etapas, que utiliza dos soluciones de sal caotrópica diferentes para la segunda etapa de incubación, entre sí y con un método de pretratamiento que utiliza alta temperatura (es decir, el método del vaporizador descrito en el Ejemplo 1).

En estos experimentos, los especímenes de citología cervical de SurePath® se procesaron utilizando el instrumento

de PrepStain Plus® desarrollado internamente (Tripath Imaging, Inc.) y se depositaron para la tinción. Para las muestras tratadas con el método de pretratamiento de dos etapas, los portaobjetos se calentaron a 50 °C sobre bandejas calefactoras de portaobjetos diseñadas especialmente y se aplicó la Solución de pretratamiento 1 (SDS al 0,1 %) y los portaobjetos se incubaron a 50 °C durante 19 minutos. Las células se lavaron con una solución salina tamponada con Tris (TBS) convencional. A continuación, se añadió la Solución de pretratamiento 2 (LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 % o tiocianato de guanidina 3M/NP-40 al 0,1 %) y las células se incubaron durante 19 minutos adicionales a 50 °C. La Solución de pretratamiento 2 (o las muestras que se incubaron con la Solución de pretratamiento 2) que comprende LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 % se denominan en el presente documento LiClO₄ y la Solución de pretratamiento 2 (o las muestras que se incubaron con la Solución 2) que comprenden tiocianato de guanidina 3M/NP-40 al 0,1 % se denomina en el presente documento TG. Después de esta incubación, los portaobjetos se lavaron nuevamente con TBS y se procesaron para inmunotinción con la combinación de anticuerpos triple de MCM2/MCM7 (anticuerpos antiMCM2 27C5.6 y 26H6.19 y anticuerpo antiMCM7 2E6.2) y tinción de contraste de PAP en el instrumento de PrepStain Plus®. Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se examinaron por un citólogo y/o un citopatólogo.

15 La Tabla 4 proporciona las características de las 481 muestras de citología cervical analizadas en estos estudios.

Tabla 4. Características de las muestras de citología cervical utilizadas en estos estudios.

PAP de SP	Biopsia		Total
	CIN 1-	CIN 2+	
NILM	160	0	160
ASCUS	53	12	65
ASCH/AGC	18	11	29
LSIL	57	36	93
HSIL	50	84	134
Total	338	143	481

PAP de SP: Pap de SurePath®; NILM: Negativo para la lesión intraepitelial o malignidad; ASCUS: células escamosas atípicas de significado incierto; ASCH/AGC: células escamosas atípicas; no puede excluirse una lesión intraepitelial escamosa de alto grado/células glandulares atípicas; LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado; CIN 1-: neoplasia intraepitelial cervical 1 o menos; CIN 2+: neoplasia intraepitelial cervical 2 o mayor

No hubo diferencias estadísticamente significativas en términos de sensibilidad o especificidad o de fondo para la respuesta inmune entre el LiClO₄ o la Solución 2 de TG en las muestras tratadas con el método de recuperación de antígenos de dos etapas. Las muestras tratadas con tiocianato de guanidina tuvieron un aumento del 2,11 % en la sensibilidad en comparación con el perclorato de litio, si bien los dos métodos de tratamiento dieron como resultado la misma especificidad (ver Tabla 5). Más muestras tratadas con tiocianato de guanidina tuvieron una ligera tinción de fondo que las que se habían tratado con perclorato de litio.

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad de la combinación de dos anticuerpos antiMCM2 y un anticuerpo antiMCM7 en muestras de citología cervical tratadas con un método de pretratamiento de dos etapas que comprende tiocianato de guanidina (TG; en inglés, GT) o perclorato de litio (LiClO₄).

	n	TG	LiClO ₄	Dif (TG-LiClO ₄)	IC del 95 %
Sensibilidad	142	84,51 %	82,39 %	2,11 %	(-2,72 %, 6,94 %)
Especificidad	320	64,39 %	64,39 %	0 %	(-2,62 %, 2,62 %)

Dif: diferencia; IC: intervalo de confianza

Cuando se comparan las muestras que se habían preparado utilizando el método del vaporizador frente al método de pretratamiento de dos etapas, no hubo diferencia estadística en aquellas muestras que fueron positivas o negativas para la inmunotinción en los casos de CIN2+. Los datos, sin embargo, mostraron una diferencia estadísticamente significativa en términos de la distribución del porcentaje de inmunopositividad celular. Específicamente, hubo un aumento en los casos con inmunotinción de más del 50 % de las células anormales con el método del vaporizador frente a TG (77 frente a 43) y con el método del vaporizador frente a LiClO₄ (77 frente a 36) (véanse las Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Porcentaje de inmunotinción de células anormales con la combinación de anticuerpos triple de MCM2/MCM7 en muestras de citología cervical de CIN2+ preparadas utilizando el método del vaporizador o tratadas con un método de pretratamiento de dos etapas que comprende tiocianato de guanidina (TG).

VAPORIZADOR	TG					Total
	Frecuencia	N/A	<25 %	25 %-50 %	50 %-75 %	
N/A	13	1	4	3	0	21
<25 %	2	6	4	0	0	12
25 %-50 %	4	11	13	4	0	32
50 %-75 %	0	20	12	25	4	61
> 75 %	2	4	3	5	2	16
Total	21	42	36	37	6	142

Tabla 7. Porcentaje de inmunotinción de células anormales con la combinación de anticuerpos triple de MCM2/MCM7 en muestras de citología cervical de CIN2+ preparadas utilizando el método del vaporizador o tratadas con un método de pretratamiento de dos etapas que comprende perclorato de litio (LiClO₄).

VAPORIZADOR	LiClO ₄					Total
	Frecuencia	N/A	<25 %	25 %-50 %	50 %-75 %	
N/A	14	3	2	2	0	21
<25 %	2	5	4	1	0	12
25 %-50 %	5	10	11	6	0	32
50 %-75 %	2	18	21	18	2	61
> 75 %	2	3	4	5	2	16
Total	25	39	42	32	4	142

5 No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas con tiocianato de guanidina y las muestras tratadas con perclorato de litio en términos de la distribución del porcentaje de inmunopositividad celular. Hubo más casos (121 frente a 117) con más del 25 por ciento de células positivas en las muestras tratadas con tiocianato de guanidina que en las muestras tratadas con perclorato de litio para los casos de CIN2+ (véase la Tabla 8). Hubo un aumento en los casos con >50 % de inmunotinción de las células anormales en las muestras tratadas con tiocianato de guanidina que en las muestras tratadas con perclorato de litio (28 frente a 23) para los casos de HSIL/CIN2+ (véase la Tabla 9). En comparación, el 14 % (12/84) de los casos de HSIL/CIN2+ tuvieron >75 % de positividad cuando se prepararon con el método del vaporizador (véase la Tabla 10).

15 Tabla 8. Porcentaje de inmunotinción de células anormales con la combinación de anticuerpos triple de MCM2/MCM7 en muestras de citología cervical de CIN2+ preparadas utilizando el método de pretratamiento de dos etapas que comprende perclorato de litio (LiClO₄) o tiocianato de guanidina (TG).

TG	LiClO ₄					Total
	N/A	<25 %	25 %-50 %	50 %-75 %	> 75 %	
N/A	20	2	0	0	0	22
<25 %	4	20	15	3	0	42
25 %-50 %	2	12	15	6	1	36
50 %-75 %	0	4	11	22	0	37
> 75 %	0	1	1	1	3	6
Total	26	39	42	32	4	143

20 Tabla 9. Porcentaje de inmunotinción de células anormales con la combinación de anticuerpos triple de MCM2/MCM7 en muestras de citología cervical de HSIL/CIN2+ preparadas utilizando el método de pretratamiento de dos etapas que comprende perclorato de litio (LiClO₄) o tiocianato de guanidina (TG).

TG	LiClO ₄					Total
	N/A	<25 %	25 %-50 %	50 %-75 %	> 75 %	
N/A	6	0	0	0	0	6
<25 %	3	11	14	1	0	29
25 %-50 %	0	8	8	4	1	21
50 %-75 %	0	2	9	14	0	25
> 75 %	0	0	0	0	3	3
Total	9	21	31	19	4	84

Tabla 10. Porcentaje de inmunotinción de células anormales con la combinación de anticuerpos triple de MCM2/MCM7 en muestras de citología cervical de HSIL/CIN2+ preparadas utilizando el método del vaporizador.

Vaporizador	Frecuencia
N/A	5
<25 %	6

(continuación)

Vaporizador	Frecuencia
25 %-50 %	20
50 %-75 %	41
> 75 %	12
Total	84

5 Cuando se examina la morfología de las muestras de citología cervical preparadas utilizando el método del vaporizador o el método de pretratamiento de dos etapas desvelado en el presente documento, los resultados mostraron que hubo una diferencia estadística ($p < 0,0001$) en términos de la distribución de la clasificación de citología. El tratamiento con tiocianato de guanidina clasificó 21 casos más de ASCUS+ y 39 casos más de HSIL que el método del vaporizador y el tratamiento con perclorato de litio clasificó 30 casos más de ASCUS+ y 52 casos más de HSIL que el método del vaporizador (véanse las tablas 11-14).

10 Tabla 11. Clasificación de muestras de citología cervical mediante análisis morfológico para muestras preparadas utilizando el método del vaporizador o el método de pretratamiento de dos etapas que comprende tiocianato de guanidina (TG).

Vaporizador	TG					Total
	Frecuencia	NILM	ASCUS	ASCH/ AGC	LSIL	
NILM	136	19	2	1	2	160
ASCUS	3	41	5	12	4	65
ASCH/AGC	0	5	11	2	11	29
LSIL	0	3	0	58	30	91
HSIL	0	0	6	2	126	134
Total	139	68	24	75	173	479

*2 muestras insatisfactorias en TG (es decir, número insuficiente de células presentes en el portaobjetos para realizar una determinación morfológica)

15 Tabla 12. Clasificación de muestras de citología cervical mediante análisis morfológico para muestras preparadas utilizando el método del vaporizador o el método de pretratamiento de dos etapas que comprende perclorato de litio (LiClO_4).

Vaporizador	LiClO_4					Total
Frecuencia	NILM	ASCUS	ASCH/ AGC	LSIL	HSIL	
NILM	128	24	2	3	3	160
ASCUS	2	34	4	21	4	65
ASCH/AGC	0	4	11	2	12	29
LSIL	0	3	2	49	38	92
HSIL	0	2	3	0	129	134
Total	130	67	22	75	186	480

* 1 muestra insatisfactoria en LiClO_4

20 Tabla 13. Clasificación de muestras de citología cervical de CIN2+ mediante análisis morfológico para muestras preparadas utilizando el método del vaporizador o el método de pretratamiento de dos etapas que comprende tiocianato de guanidina (TG) ($p = 0,0270$).

Vaporizador	TG				Total
Frecuencia	ASCUS	ASCH/AGC	LSIL	HSIL	
ASCUS	10	1	1	0	12
ASCH/AGC	1	4	0	6	11
LSIL	1	0	19	15	35
HSIL	0	2	1	81	84
Total	12	7	21	102	142

25 Tabla 14. Clasificación de muestras de citología cervical de CIN2+ mediante análisis morfológico para muestras preparadas utilizando el método del vaporizador o el método de pretratamiento de dos etapas que comprende perclorato de litio (LiClO_4) ($p = 0,0004$).

Vaporizador	LiClO_4				Total
Frecuencia	ASCUS	ASCH/AGC	LSIL	HSIL	
ASCUS	9	1	2	0	12
ASCH/AGC	1	4	0	6	11
LSIL	2	1	13	19	35
HSIL	1	1	0	82	84
Total	13	7	15	107	142

El tratamiento con perclorato de litio identificó ocho casos anormales citológicamente más que el tiocianato de

guanidina (32 frente a 24) en 160 casos que se clasificaron como NILM por el método del vaporizador (véase la Tabla 15). El tratamiento con tiocianato de guanidina clasificó seis ASCUS más que el tratamiento con perclorato de litio (49 frente a 43) en 319 casos que se clasificaron como ASCUS+ por el método del vaporizador (ver Tabla 16). Adicionalmente, entre 134 casos que se clasificaron como HSIL+ por el método del vaporizador, el tratamiento con perclorato de litio clasificó tres HSIL más que el tiocianato de guanidina (129 frente a 126).

Tabla 15. Clasificación de muestras de citología cervical clasificadas como NILM por el método del vaporizador utilizando el método de pretratamiento de dos etapas que comprende tiocianato de guanidina (TG) o perclorato de litio (LiClO₄).

TG	LiClO ₄					Total
Frecuencia	NILM	ASCUS	ASCH/ AGC	LSIL	HSIL	
NILM	126	9	0	1	0	136
ASCUS	2	15	0	2	0	19
ASCH/ AGC	0	0	2	0	0	2
LSIL	0	0	0	0	1	1
HSIL	0	0	0	0	2	2
Total	128	24	2	3	3	160

Tabla 16. Clasificación de muestras de citología cervical clasificadas como ASCUS+ por el método del vaporizador utilizando el método de pretratamiento de dos etapas que comprende tiocianato de guanidina (TG) o perclorato de litio (LiClO₄).

TG	LiClO ₄					Total
Frecuencia	NILM	ASCUS	ASCH/ AGC	LSIL	HSIL	
NILM	2	1	0	0	0	3
ASCUS	0	38	2	9	0	49
ASCH/ AGC	0	2	17	2	1	22
LSIL	0	2	1	58	13	74
HSIL	0	0	0	2	169	171
Total	2	43	20	71	183	319

* 2 muestras insatisfactorias en TG

En conjunto, el tratamiento con tiocianato de guanidina y perclorato de litio no degradó la morfología celular en comparación con el método de vapor. Adicionalmente, las células glandulares y las muestras atróficas tratadas con el método de pretratamiento de dos etapas muestran menos inmunotinción que las procesadas utilizando el método del vaporizador. El método de recuperación de antígenos en dos etapas no redujo el rendimiento inmunológico/clínico en comparación con el método del vaporizador, aunque hubo una reducción observada en el porcentaje de células que eran inmunopositivas en comparación con las muestras procesadas con el método del vaporizador. Para los casos confirmados de NILM y CIN2, el método de pretratamiento de dos etapas mejoró la clasificación citológica.

Ejemplo 3. Detección de antígenos Ki67 y p16 en muestras de citología cervical utilizando el proceso de pretratamiento de dos etapas.

En estos experimentos, los especímenes de citología cervical de SurePath® se procesaron utilizando el instrumento de PrepStain Plus® desarrollado internamente (Tripath Imaging, Inc.) y se depositaron para la tinción. Tras la deposición celular, los portaobjetos se calentaron a 50 °C sobre bandejas calefactoras de portaobjetos diseñadas especialmente y se aplicó la Solución 1 de RA (SDS al 0,1 %) y los portaobjetos se incubaron a 50 °C durante 19 minutos. Las células se lavaron con una solución salina tamponada con tris (TBS) convencional. A continuación, se añadió la Solución 2 de RA (LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %) y las células se incubaron durante 19 minutos más a 50 °C. Tras esta incubación, los portaobjetos se lavaron de nuevo con TBS y se procesaron para inmunotinción y tinción de contraste de PAP en el instrumento PrepStain Plus®. Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se examinaron por un citólogo y/o un citopatólogo. Los resultados representativos de las muestras de citología cervical inmunoteñidas con un anticuerpo antiKi67 o anti p16 se muestran en las Figuras 1 y 3, respectivamente. Las células SiHa se trataron de forma similar y se inmunotñieron con un anticuerpo antiKi67 (Figura 2) o anti p16 (Figura 4).

Ejemplo 4. Detección de MCM2 y MCM7 en tejidos de amígdalas y de cuello uterino utilizando el proceso de pretratamiento de dos etapas.

Las muestras de tejido de amígdalas y de cuello uterino se fijaron en formaldehído al 10 % durante al menos 24 horas y a continuación, se incluyeron en parafina antes de seccionar. Las secciones de tejido se incubaron con la Solución 1 (SDS al 0,1 %) a 50 °C durante 19 minutos. Las secciones se lavaron con TBS y a continuación, se incubaron a 50 °C durante 19 minutos en la Solución 2 (LiClO₄ 3M/NP-40 al 0,1 %). Después de esta incubación, las secciones tisulares se lavaron nuevamente con TBS y se procesaron para inmunotinción con un cóctel de anticuerpos triple (anticuerpos antiMCM2 27C5.6 y 26H6.19 y anticuerpo antiMCM7 2E6.2) y tinción de contraste de PAP en el instrumento de PrepStain Plus®. En las Figuras 5 y 6 se muestran tejidos de amígdalas y de cuello uterino inmunoteñidos representativos, respectivamente. Estos resultados demuestran que el proceso de pretratamiento de

dos etapas desvelado en el presente documento puede recuperar antígenos eficazmente de muestras histológicas, dando como resultado una inmunotinción eficaz.

Ejemplo 5. Detección de antígenos nucleares en células de cuello uterino utilizando el proceso de pretratamiento de dos etapas en la ausencia de calor.

5
10 Se procesaron especímenes de citología cervical de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y de lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) de SurePath® como se describe en el Ejemplo 3 para la recuperación de antígenos incubando las muestras en Solución de pretratamiento 1 (SDS al 0,1 %) durante 19 minutos, seguido de lavado con TBS e incubación en Solución de pretratamiento 2 (LiClO₄ 3M/SDS al 0,1 %) durante 19 minutos. En contraste con los experimentos descritos en el Ejemplo 3, sin embargo, no se aplicó calor exógeno a las muestras durante las etapas de incubación con las dos soluciones de pretratamiento. Por tanto, las etapas de incubación con las Soluciones de Pretratamiento 1 y 2 se realizaron a temperatura ambiente.

15 Después del pretratamiento, las muestras se inmunotifieron con un cóctel de anticuerpos triple (anticuerpos antiMCM2 27C5.6 y 26H6.19 y anticuerpo antiMCM7 2E6.2) y se tiñeron por contraste con PAP. Las muestras representativas se muestran en la Figura 7 (LSIL) y la Figura 8 (HSIL). Estos datos demuestran el efecto inesperado del método de pretratamiento en dos etapas desvelado en el presente documento para exponer eficazmente los epítomos mientras se mantiene la morfología celular de las muestras de citología, incluso en ausencia de calor aplicado.

20 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de aquellos expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida que si se indicara que cada publicación individual o solicitud de patente se incorporara específica e individualmente por referencia.

25 Muchas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en el presente documento se le ocurrirán a una persona experta en la materia a la que pertenecen estas invenciones que tenga el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por tanto, debe entenderse que las invenciones no deben limitarse a las realizaciones específicas desveladas y que se pretende que las modificaciones y otras realizaciones estén incluidas dentro del alcance de la lista precedente de realizaciones y reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean en el presente documento términos específicos, estos se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:
- 5 a) una primera solución acuosa que comprende un tensioactivo aniónico; y
b) una segunda solución acuosa que comprende una sal caotrópica y al menos uno de un tensioactivo no iónico o zwitteriónico;
- en donde dicho kit comprende adicionalmente:
- 10 c) un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno;
d) un reactivo de bloqueo de peroxidasa, un reactivo de bloqueo de proteínas y productos químicos para la detección de la unión de anticuerpos a dicho antígeno; y
e) reactivos para la tinción de contraste de Papanicolau (Pap), en donde los reactivos para la tinción de contraste de Pap comprenden EA50 u Orange G.
- 15 2. El kit de la reivindicación 1, en donde dicho tensioactivo aniónico es dodecilsulfato de sodio (SDS).
3. El kit de la reivindicación 1, en donde dicha sal caotrópica es un tiocianato o un perclorato.
- 20 4. El kit de la reivindicación 3, en donde dicho tiocianato es tiocianato de guanidina o dicho perclorato es perclorato de litio.
5. El kit de la reivindicación 1, en donde dicho tensioactivo no iónico es nonil fenoxipolietoxiletanol (NP-40).
- 25 6. El kit de la reivindicación 1, en donde dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en MCM2, MCM7, p16 y Ki67.
7. El kit de la reivindicación 1, en donde dichos productos químicos para la detección de la unión de anticuerpos comprenden un cromógeno y un anticuerpo secundario conjugado con un polímero marcado, en donde el cromógeno comprende 3',3'-diaminobencidina y en donde el polímero marcado comprende peroxidasa de rábano picante conjugada con un polímero de dextrano.
- 30 8. Un método para tinción inmunológica, comprendiendo dicho método:
- 35 a) poner en contacto una muestra con una primera solución acuosa que comprende un tensioactivo aniónico;
b) poner en contacto la muestra con una segunda solución acuosa que comprende una sal caotrópica y al menos uno de un tensioactivo no iónico o zwitteriónico; y
c) detectar un antígeno en dicha muestra utilizando un anticuerpo y la tinción de contraste de Papanicolau (Pap) de la muestra, en donde los reactivos para la tinción de contraste de Pap comprenden EA50 u Orange G.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en donde:
- 45 (a) dicha muestra se incuba con dicha primera solución durante al menos un minuto;
(b) dicha muestra se incuba en dicha primera solución a temperatura ambiente;
(c) dicha muestra se calienta en dicha primera solución;
(d) dicha muestra se incuba con dicha segunda solución durante al menos un minuto;
(e) dicha muestra se incuba en dicha segunda solución a temperatura ambiente;
(f) dicha muestra se calienta en dicha segunda solución;
- 50 (g) dicha muestra se lava antes de poner la muestra en contacto con la segunda solución y después de poner en contacto la muestra con la primera solución;
(h) dicha muestra es una muestra de cuello uterino;
(i) dicha muestra comprende células o tejido; y/o
(j) dicho método comprende adicionalmente realizar un análisis morfológico de dicha muestra.
- 55 10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde dicho tensioactivo aniónico es dodecilsulfato de sodio (SDS).
11. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde dicha sal caotrópica es un tiocianato o un perclorato.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho tiocianato es tiocianato de guanidina o dicho perclorato es perclorato de litio.
13. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde dicho tensioactivo no iónico es nonil fenoxipolietoxiletanol (NP-40).
- 65 14. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde dicha muestra se lava con solución salina tamponada.

15. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en MCM2, MCM7, p16 y Ki67.
- 5 16. El kit de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 8 o 9 en donde dicho antígeno es un antígeno nuclear.
17. El método de la reivindicación 9, en donde:
- 10 (i) la muestra se incuba con al menos una de dicha primera solución o dicha segunda solución o ambas dichas primera y segunda soluciones a aproximadamente 50 °C;
- (ii) la muestra se incuba con al menos una de dicha primera solución o dicha segunda solución o ambas dichas primera y segunda soluciones durante 19 minutos; o
- (iii) en donde la muestra se lava con solución salina tamponada con Tris.
- 15 18. El kit de la reivindicación 2 o el método de la reivindicación 10 en donde dicha primera solución comprende SDS al 0,1 %.
19. El kit de la reivindicación 4 o el método de la reivindicación 12 en donde dicha segunda solución comprende aproximadamente tiocianato de guanidina o perclorato de litio 3M.
- 20 20. El kit de la reivindicación 5 o el método de la reivindicación 13 en donde dicho tensioactivo no iónico es NP-40 al 0,1 %.
21. El kit de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un control positivo.

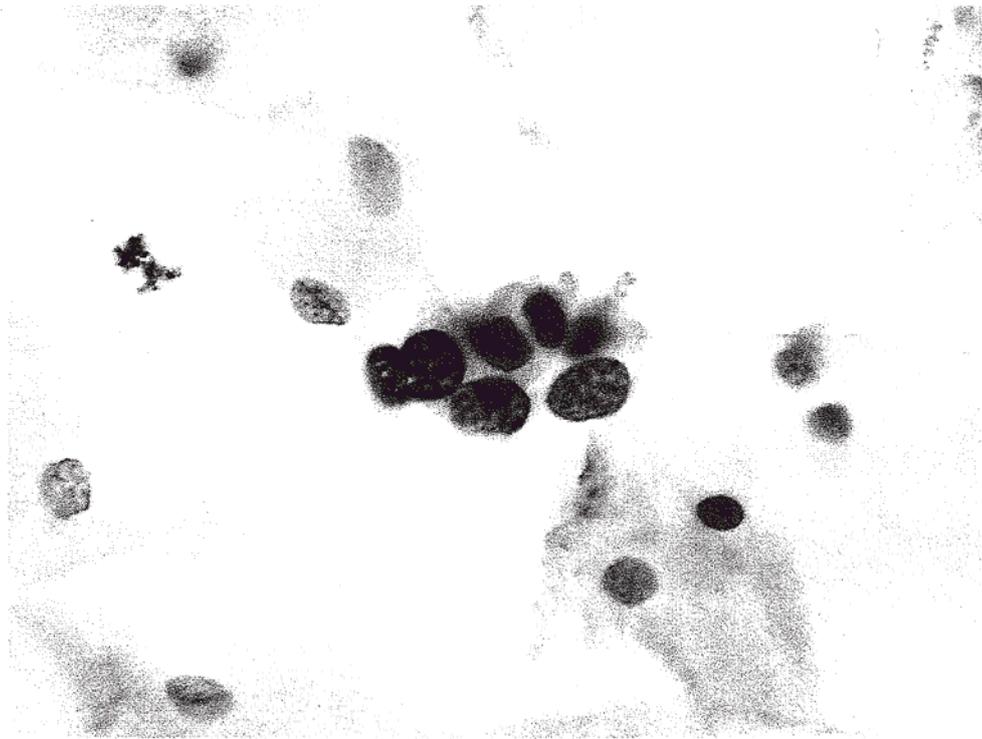


FIG. 1

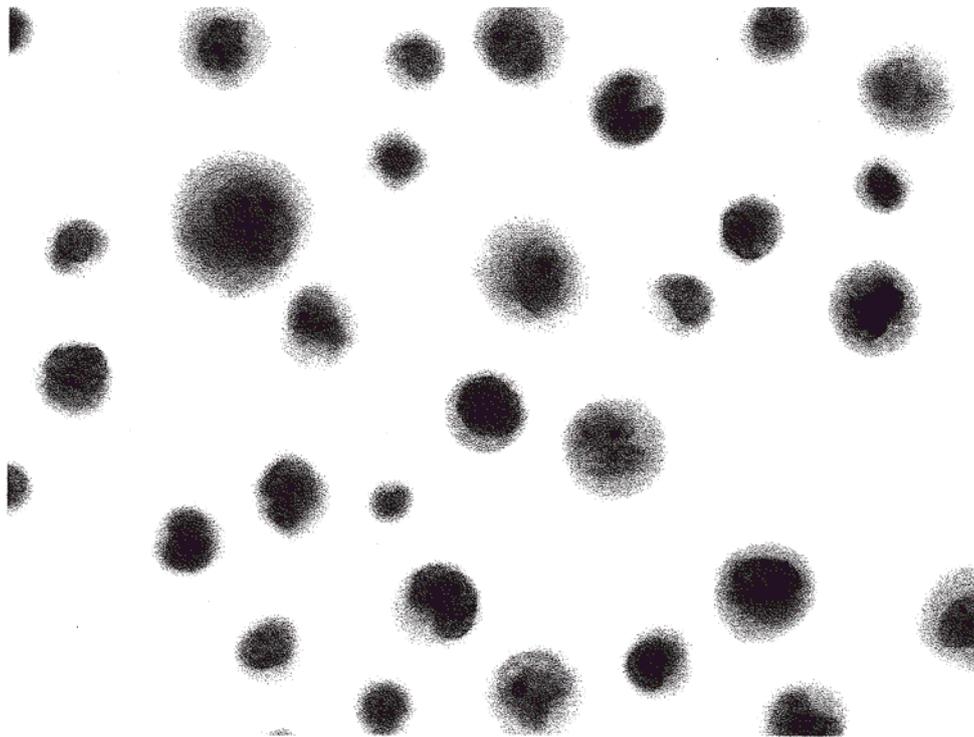


FIG. 2

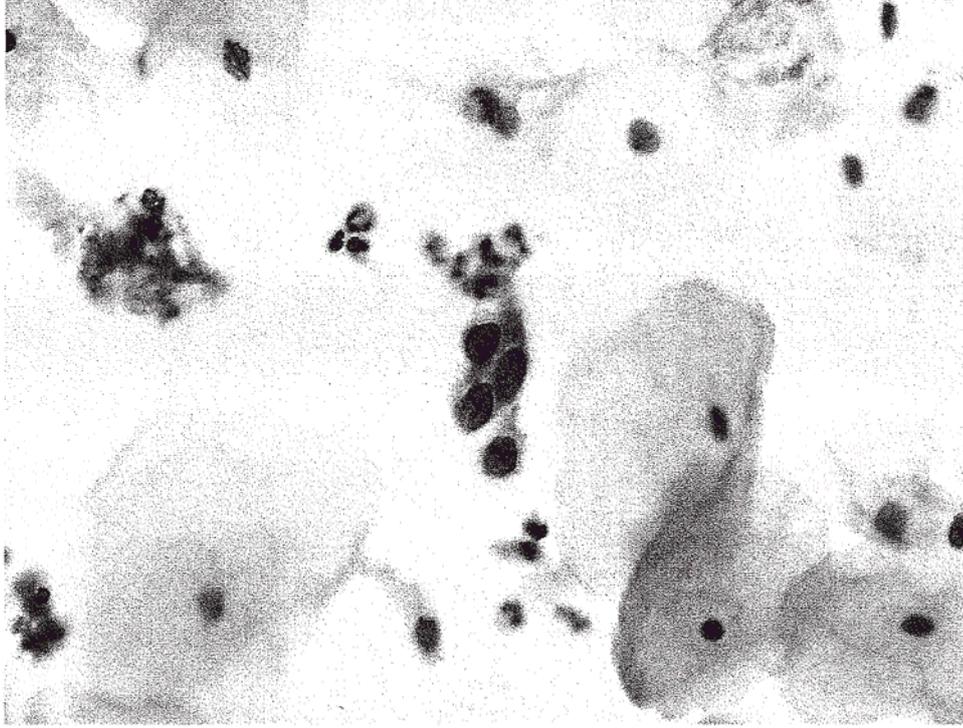


FIG. 3

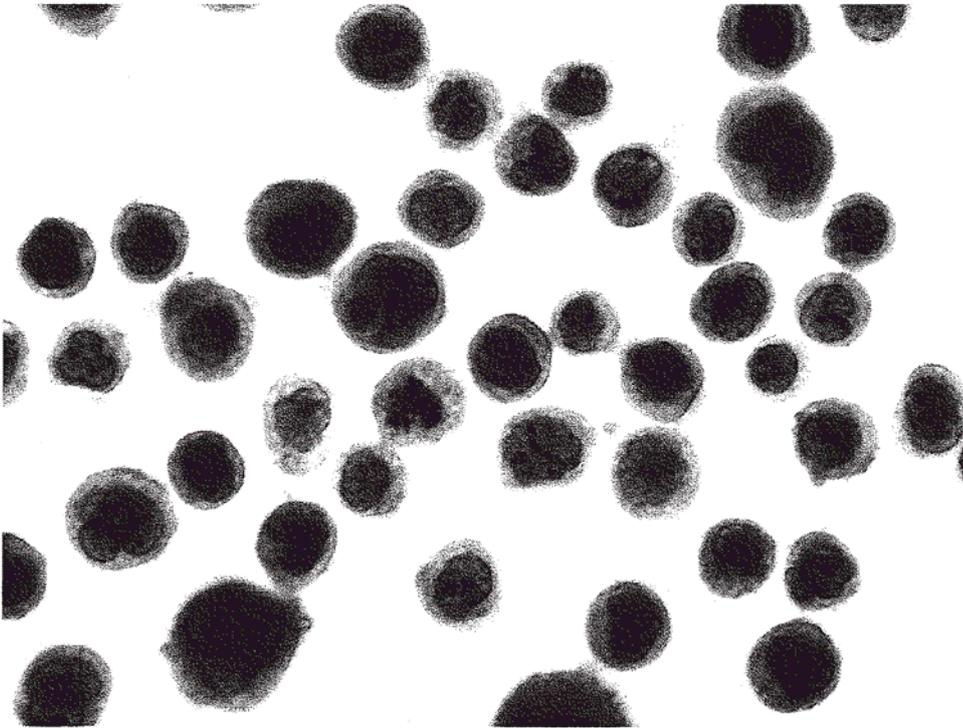


FIG. 4

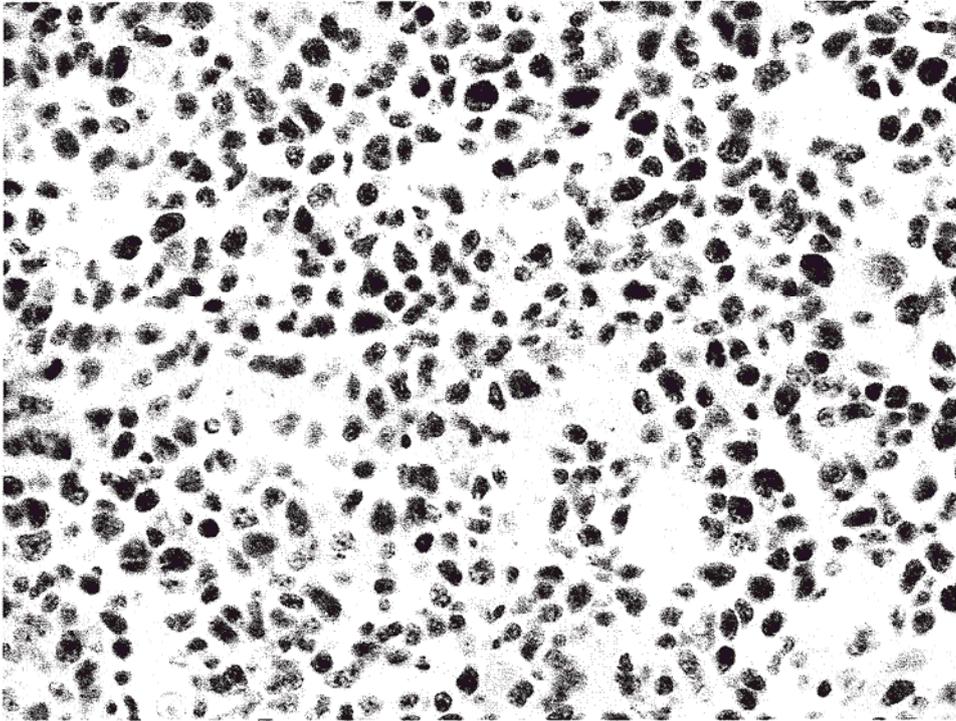


FIG. 5

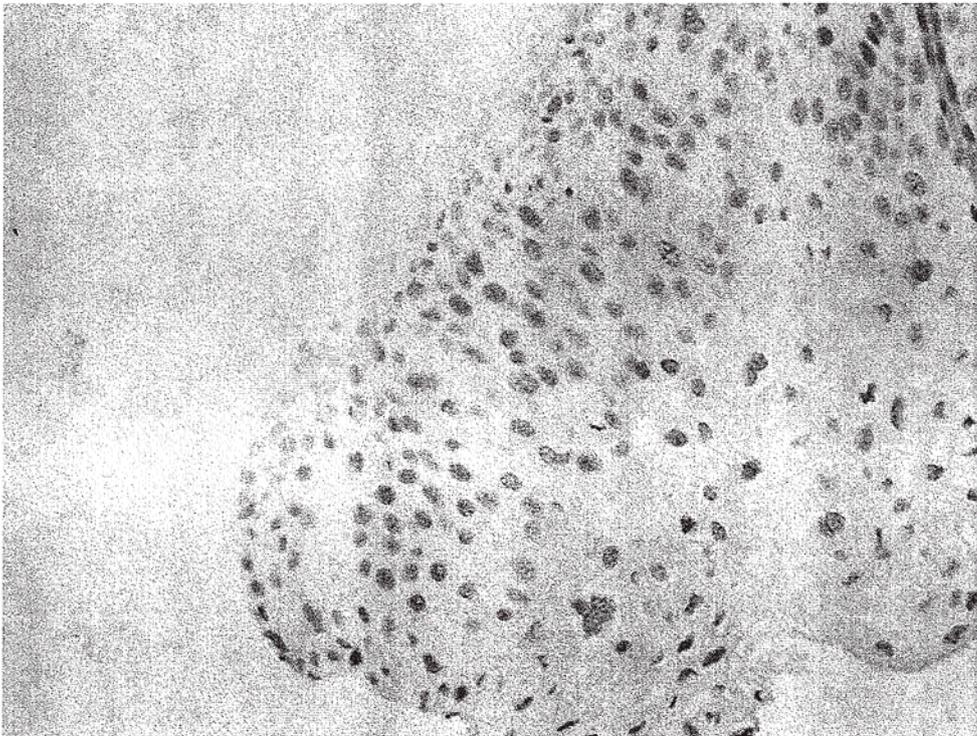


FIG. 6

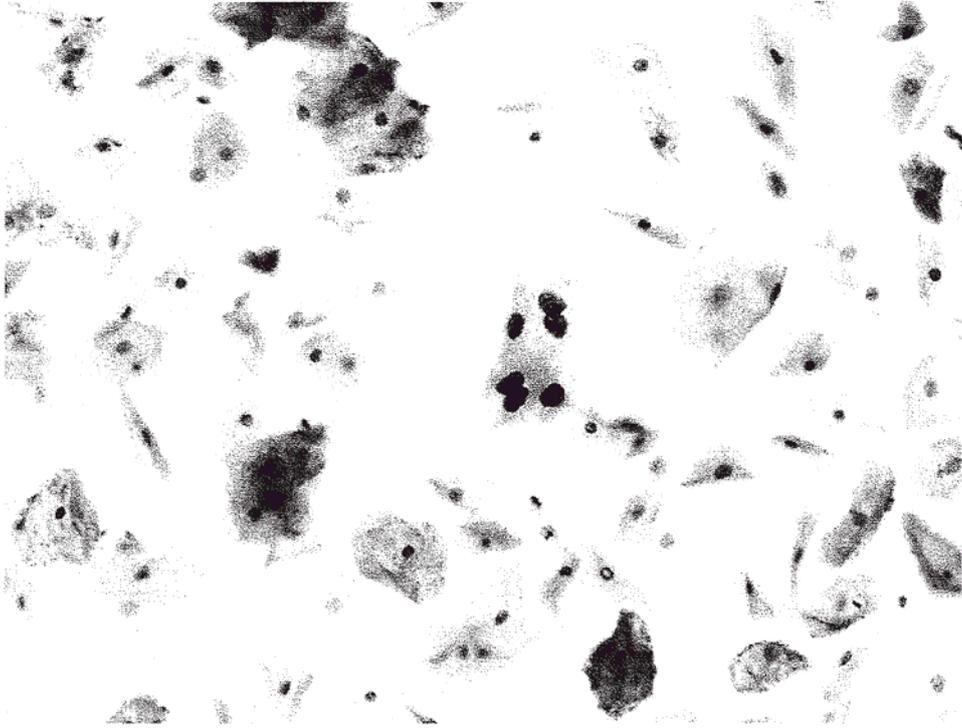


FIG. 7

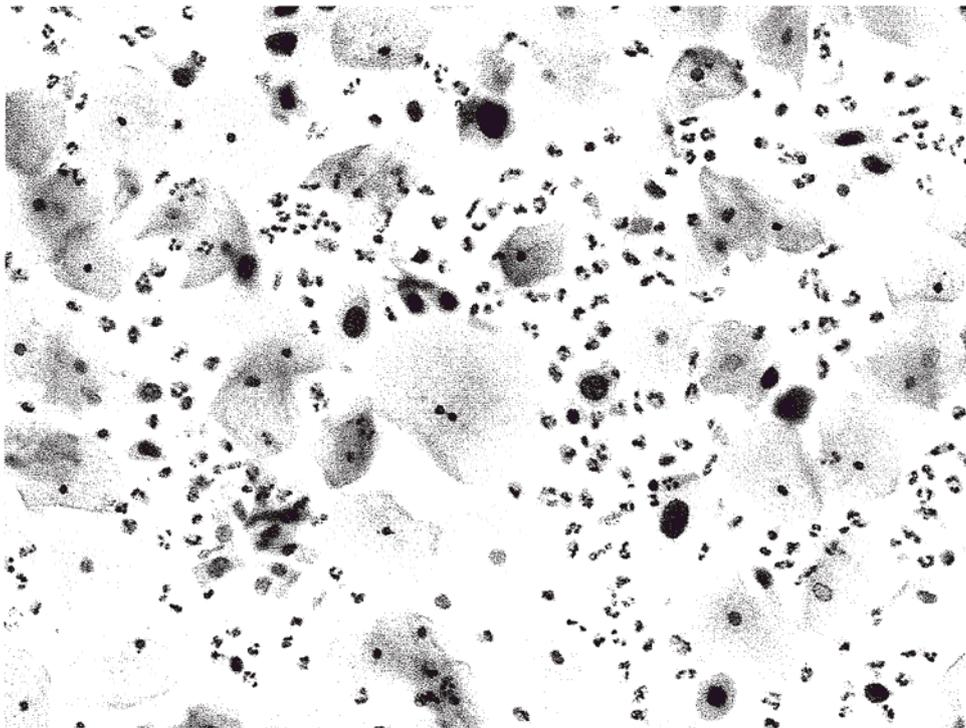


FIG. 8