



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 113**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04815264 .9**
96 Fecha de presentación : **21.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1699936**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **Amplificación universal de RNA fragmentado.**

30 Prioridad: **23.12.2003 US 532684 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

73 Titular/es: **GENOMIC HEALTH, Inc.**
301 Penobscot Drive
Redwood City, California 94063, US

72 Inventor/es: **Kiefer, Michael, C. y**
Hoyt, Kenneth, W.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 360 113 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).

DESCRIPCION

Amplificación universal de rna fragmentado.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de preparación de RNA para determinación del perfil de la expresión génica por una diversidad de métodos. Los métodos de la invención son particularmente útiles para amplificación universal de RNA, con inclusión de RNA en el cual una o más especies de RNA está(n) fragmentada(s) y/o bloqueada(s) en su término 3', tal como se obtiene a partir de tejido fijado incrustado en parafina (FPET). Los métodos son útiles también para detectar especies de RNA que carecen de poliadenilación. Adicionalmente, se proporcionan métodos RT-PCR mejorados para determinación del perfil útiles en la expresión génica.

Detección de la Técnica Afín

La determinación del perfil de la expresión génica está adquiriendo una importancia creciente tanto en investigación biológica como en la práctica clínica. La determinación del perfil de la expresión génica ha sido utilizada para clasificar diversos tipos de cáncer (véase v.g. Golub *et al.*, *Science* 286:531-537 (1999); Bhattacharjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiang *et al.*, *Bioinformatics* 17 (Suppl. 1):S316-S322 (2001); Ramaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154 (2001); Martin *et al.*, *Cancer Res.* 60:2232-2238 (2000); West *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11462-11467 (2001); Sorlie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874 (2001); Yan *et al.*, *Cancer Res.* 61:8375-8380 (2001)), y para predecir el desenlace clínico del cáncer, tal como cáncer de mama (Van't Veer *et al.*, *Nature* 415: 530-536 (2002)) y cáncer de pulmón (Beer *et al.*, *Nat. Med.* 8: 816-24 (2002)).

Los métodos utilizados más comúnmente conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de mRNA en una muestra incluyen transferencia Northern e hibridación *in situ* (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de RNAsas (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)); microrredes (Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2):106-149 (1996)), y reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) (Weis *et al.*, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, con inclusión de dúplex de DNA, dúplex de RNA, y dúplex híbridos DNA-RNA o dúplex DNA-proteína. De éstos, debido a su sensibilidad, reproducibilidad, e intervalo dinámico amplio, la RT-PCR en tiempo real está convirtiéndose en el método de elección para determinación del perfil con alta capacidad y expresión exacta.

En muchas situaciones en las que es potencialmente útil la determinación del perfil de la expresión génica, existe material insuficiente para análisis sin amplificación previa del RNA. Dado que el RNA no puede servir como molde para la PCR, el primer paso en la determinación del perfil de la expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa del molde de RNA en cDNA, seguida por su amplificación exponencial en una reacción PCR. La conversión de mRNA en cDNA se realiza típicamente por cebado con oligo dT del mRNA en presencia de la enzima transcriptasa inversa (RT). Este paso, sin embargo, no es eficaz si la fuente de mRNA es una muestra de tejido fijada incrustada en parafina, que puede haber estado archivada durante hasta 10-20 años, y en la cual el RNA está fuertemente degradado (Lewis *et al.*, *J. Pathol.* 195: 66-71 (2001)).

Adicionalmente, si bien Frolova L *et al.*, *Nucleic Acids Research*, enero 1978, vol. 5, no. 1, 10 enero 1978 (1978-01), páginas 285-295, describen "Enzymatic synthesis of DNA complementary to mitochondrial mRNA via reverse transcription", Emtage J S *et al.*, *Nucleic Acids Research*, abril 1979, vol. 6, no. 4, abril 1979 (1979-04), páginas 1221-1239, describen "Polyadenylation and reverse transcription of influenza viral RNA", Hell A *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 442, no. 1, 1976, páginas 37-49, describen "Synthesis of DNA complementary to human ribosomal RNA polyadenylated", y Amara Rama Rao *et al.*, *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, Surrey, GB, vol. 25, no. 17, 1997, páginas 3465-3470, describen "Specific polyadenylation and purification of total messenger RNA from *Escherichia coli*", ninguna de dichas referencias describe los métodos para preparación de RNA de la presente invención.

Dado que las muestras de FPET son la fuente más disponible generalmente de RNA para determinación del perfil de la expresión génica en oncología clínica y debido a que las muestras archivadas de FPET son una fuente importante de RNA para la determinación del perfil de la expresión génica en oncología de investigación, existe una necesidad clínica de métodos que hagan posible y mejoren la eficacia de determinación del perfil de la expresión génica utilizando tales muestras de tejido.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona un método de preparación de muestras que permite una amplificación global incluso de muestras de RNA muy pequeñas o muy fragmentadas. El método de la invención mejora la sensibilidad de los métodos de análisis de RNA, con inclusión de RT-PCR y redes de hibridación. Adicionalmente, los métodos de la invención permiten la medida de los niveles de mRNA de todos los genes expresados con inclusión de especies de mRNA fragmentadas y/o bloqueadas en muestras de tejido archivadas incrustadas en parafina. Este método permite también la medida de mRNA no-poliadenilado tales como histonas y RNAs no codificantes, tales como microRNAs (miRNAs). La invención puede incluir adicionalmente un paso de transcripción inversa mejorado y un paso de PCR

modificado que aumenta la sensibilidad de la RT-PCR utilizado para determinación del perfil de la expresión génica de las muestras de RNA fragmentadas.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de procesamiento de RNA fragmentado como se especifica en la reivindicación 1.

5 Típicamente, el tamaño de la especie de RNA en el RNA fragmentado está comprendido entre aproximadamente 20 bases y aproximadamente 2000 bases, de modo más frecuente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300 bases.

La poliadenilación puede, por ejemplo, realizarse con poliA-polimerasa de *E. coli*.

10 Dado que al menos algunas especies de RNA dentro del RNA fragmentado pueden estar bloqueadas en sus términos 3', el método de la invención puede incluir adicionalmente un paso de desbloqueo. El desbloqueo puede realizarse utilizando reactivos convencionales, tales como, por ejemplo, con una enzima fosfatasa, v.g. fosfatasa alcalina de ternero (CIP), fosfatasa alcalina bacteriana, fosfatasa alcalina de camarón, o variantes de las mismas, o con una polinucleótido-quinasa (PNK), v.g. polinucleótido-quinasa T4 (T4 PNK), o variantes de las mismas.

15 En una realización, el RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) anterior se convierte en cDNA por tratamiento con una transcriptasa inversa e iniciadores oligo-dT, donde los iniciadores oligo-dT pueden contener opcionalmente una secuencia promotora de RNA-polimerasa (v.g. el promotor de RNA-polimerasa T7).

En otra realización, antes de convertir en cDNA el RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) anterior, se elimina el agente de poliadenilación, tal como CIP o PNK.

20 En una realización adicional, el RNA poliadenilado fragmentado se convierte en cDNA sin eliminación previa del agente de poliadenilación, tal como CIP, o PNK.

En otra realización adicional, el RNA poliadenilado fragmentado se enriquece, v.g., por eliminación de secuencias de rRNA, antes de la conversión en cDNA y subsiguientemente en cDNA bicatenario.

En otra realización adicional, el RNA poliadenilado fragmentado se inmoviliza antes de la conversión en un cDNA.

25 En una realización particular, el RNA poliadenilado fragmentado se hibrida a un formato de perlas en fase sólida. Si se desea, el RNA poliadenilado fragmentado inmovilizado se enriquece antes de la conversión en cDNA. El enriquecimiento puede comprender la eliminación de secuencias de rRNA por hibridación a oligonucleótidos de rRNA complementarios inmovilizados en perlas.

30 En otra realización adicional, el RNA es un mRNA obtenido de una muestra de tumor, donde el tumor puede ser cáncer, tal como, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, o cáncer de cerebro.

El método de la invención puede comprender adicionalmente el paso de (c) amplificación por PCR utilizando una o más especies de cDNA presentes en el cDNA obtenido en el paso (b) anterior como molde.

35 En una realización particular, la amplificación por PCR comprende aproximadamente 40 ciclos, de los cuales los cinco primeros ciclos, o los primeros 2 a 5 ciclos, o los dos primeros ciclos se realizan a una temperatura de reasociación/extensión más baja, tal como una temperatura de aproximadamente 40°C a 58°C, v.g. aproximadamente 50°C.

En otra realización, el método de la invención comprende adicionalmente los pasos de:

(d) convertir el cDNA obtenido en el paso (b) en DNA bicatenario; y

40 (e) amplificar el RNA sometiendo en DNA bicatenario obtenido en el paso (d) a transcripción *in vitro* con una RNA-polimerasa para obtener RNA complementario (RNA) amplificado.

45 En otra realización del método de la invención, el RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) se convierte en cDNA por tratamiento con una transcriptasa inversa e iniciadores inversos extendidos, y el cDNA obtenido se amplifica por PCR utilizando un iniciador PCR directo y uno inverso y una sonda, diseñada sobre la base de un amplicón diana.

Adicionalmente, se describe un método para síntesis de cDNA mejorada, que comprende convertir RNA en cDNA por tratamiento con una transcriptasa inversa e iniciadores extendidos, y amplificar por PCR el cDNA obtenido utilizando un iniciador PCR directo y uno inverso y una sonda, diseñada sobre la base de un amplicón diana. El RNA puede estar fragmentado, al menos parte del cual puede estar no-poliadenilado.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de procesamiento de RNA que comprende una multiplicidad de especies de RNA como se especifican en la reivindicación 21.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de procesamiento de RNA que comprende una multiplicidad de especies de RNA como se especifican en la reivindicación 25.

Breve Descripción de los Dibujos

5

La Figura 1 es un gráfico que ilustra el flujo global de trabajo del proceso de amplificación en la invención utilizado para medida de la expresión génica. En esta Figura, FPET significa "tejido fijado incrustado en parafina", PNK significa "polinucleótido-quinasa", CIP significa "fosfatasa alcalina de intestino de ternero", EPAP significa "poliA-polimerasa de *E. coli*", TdT significa "transferasa terminal", IVT significa "transcripción *in vitro*", rNTP significa "ribonucleosido-5'-trifosfato", dNTP significa "2'-desoxirribonucleosido-5'-trifosfato", ATP significa "adenosina-5'-trifosfato". T7-(T₂₄) es un iniciador para síntesis de cDNA que utiliza transcriptasa inversa y representa la secuencia promotora de RNA-polimerasa T7 unida al extremo 5' de un polidesoxiadenucléico. T7-(N)₁₅ es un iniciador para la síntesis de cDNA que utiliza transcriptasa inversa y representa la secuencia promotora de RNA-polimerasa T7 unida al extremo 5' de un desoxipentadecámero aleatorio. En la Figura 1 se muestran tres protocolos representativos (A, B y C) de la invención. Los procesos A y B comienzan con FPET RNA e implican 1) desbloqueo directo o indirecto del 3'OH en el nucleótido terminal, 2) adición de colas poliA en el extremo 3', 3) síntesis de cDNA bicatenario cebado con oligo dT con la incorporación de un promotor de RNA-polimerasa T7, y 4) amplificación del RNA por transcripción *in vitro*. El proceso C (centro del diagrama) comienza con FPET RNA e implica 1) síntesis directa de cDNA bicatenario utilizando iniciadores T7-(N)₁₅ con un promotor de RNA-polimerasa T7, y 2) amplificación del RNA por transcripción *in vitro*.

10

15

20

La Figura 2 muestra una imagen en gel de FPET RNA aislado de 12 biopsias de pacientes de cáncer de mama diferentes. Las pistas M1 y M2 muestran marcadores de RNA con el tamaño de cada banda designado en bases. Las pistas 1-4, 5-8 y 9-12 proceden de biopsias de tumores que han estado archivadas durante 1, 6 y 17 años, respectivamente. Las muestras se analizaron por electroforesis capilar en un Bioanalizador Agilent 2100, utilizando un Nanochip de RNA 6000.

25

La Figura 3 muestra análisis de la expresión génica seleccionados de FPET RNA de tumores de mama, RNA de tumores de mama degradados aleatoriamente y RNA de tumores de mama intacto. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un equipo ABI Prism® 7700. La síntesis del cDNA se inició con iniciadores de genes específicos (GSP) u oligo (dT)₁₂₋₁₈. Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct).

30

La Figura 4 muestra un análisis seleccionado de la expresión génica de FPET RNA de tumores de mama. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un equipo ABI Prism® 7700. La síntesis del cDNA se inició con GSPs u oligo (dT)₁₂₋₁₈ utilizando RNA molde que no estaba poliadenilado (FPET/GSP y FPET/dT) o se inició la síntesis del cDNA con oligo (dT)₁₂₋₁₈ utilizando RNA molde que estaba poliadenilado (FPET-pA/dT). Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct).

35

La Figura 5 muestra un análisis de la expresión génica de cRNAs transcritos *in vitro*. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7700. La poliadenilación del RNA se realizó con 0,2 unidades de EPAP y la síntesis del cDNA se realizó como en la Figura 4. Véase Materiales y Métodos para la Generación del cRNA Molde. Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Recuadro: imagen de gel Agilent 2100' de cRNAs tratados con 0, 0,1 o 0,2 unidades de EPAP. La pista M muestra marcadores de RNA con el tamaño de cada banda expresado en bases.

40

La Figura 6A muestra una imagen de gel de FPET RNAs que han sido tratados con PNK (pista 1), control de PNK tampón (pista 2), CIP (pista 3) o control de CIP tampón (pista 4). La Figura 6B muestra una imagen en gel de FPET RNAs que han sido tratados con control de PNK tampón seguido por control de EPAP tampón (pista 1), PNK seguido por control de EPAP tampón (pista 2), control de PNK tampón seguido por EPAP, o PNK seguido por EPAP (pista 4). Las muestras se analizaron por electroforesis capilar en un Agilent 2100 utilizando un Nanochip RNA 6000. Las pistas M1 y M2 muestran marcadores de RNA, expresándose el tamaño de cada banda en bases.

45

La Figura 7 muestra un análisis de la expresión génica seleccionada de FPET RNA de tumores de mama. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7700. Antes del análisis de la expresión génica, el RNA se trató con PNK (+PNK) o control de tampón (-PNK), seguido de poliadenilación por EPAP. El RNA se convirtió luego en cDNA con transcriptasa inversa e iniciadores oligo dT (+PNK/oligo dT y -PNK/oligo dT) o iniciadores específicos de genes (+PNK/GSP y -PNK/GSP). Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Recuadro: imagen de gel Agilent 2100 de FPET RNA tratado con PNK o control de tampón, seguido por EPAP. La pista M muestra marcadores de RNA expresándose en bases el tamaño de cada banda.

50

La Figura 8 muestra el análisis de la expresión génica seleccionada de FPET RNA de tumores de mama. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7700. Antes del análisis de la expresión génica, el RNA se trató con CIP (+CIP) o control de tampón (-CIP), seguido de poliadenilación por EPAP. El RNA se convirtió luego en cDNA con transcriptasa inversa e iniciadores oligo dT (+CIP/oligo dT y -CIP/oligo dT) o iniciadores específicos de genes (+CIP/GSP y -CIP/GSP). Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct).

55

Recuadro: imagen de gel Agilent 2100 de FPET RNA tratado con CIP o control de tampón seguido por EPAP. La pista M muestra marcadores de RNA expresándose el tamaño de cada banda en bases.

La Figura 9 muestra un análisis de la expresión en panel de 96 genes de FPET RNA de tumores de mama. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7900. Antes del análisis de la expresión génica, el RNA se trató con PNK, seguido por tratamiento con EPAP. Los RNAs se convirtieron luego en cDNA con transcriptasa inversa e iniciadores oligo dT (pA_dT) o iniciadores específicos de genes (pA_GSP1). El RNA no poliadenilado se convirtió también en cDNA como anteriormente (dT_ sin tratar y GSP1 sin tratar). Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Los análisis estadísticos de los resultados se muestran en la Tabla 1.

Las Figuras 10 A-C muestran un análisis de la expresión en panel de 46 genes de FPET RNA amplificado y no amplificado. Se determinó el perfil de tres RNAs diferentes. En la Figura 10A se muestra RNA total intacto universal (Stratagene, La Jolla, CA), en la Figura 10B se muestra FPET RNA placentario (de placenta tratada durante 1,5-2 horas con formalina e incrustada en parafina por BioPathology Sciences Medical Corporation, South San Francisco, CA) y en la Figura 10C se muestra FPET RNA de tumor de mama (Clinomics BioSciences, Pittsfield, MA). La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7900. Antes del análisis de la expresión génica, se trataron dos muestras separadas de RNA con PNK seguido por EPAP y se convirtieron luego en cDNA con transcriptasa inversa e iniciadores oligo dT-T7. El cDNA se hizo bicatenario con DNA-polimerasa I y RNAsaH, se amplificó por IVT [IVT (con cola-1) y IVT (con cola-2)] y se analizó luego por (TaqMan®). Como control, FPET RNA sin tratar con PNK ni EPAP se convirtió en cDNA bicatenario y se amplificó por [IVT (sin cola)], como anteriormente, o se convirtió en cDNA por GSPs (GSP) antes del análisis por TaqMan®. Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Las tablas del recuadro muestran el Ct global medio de los 46 genes cuyo perfil se determinó para cada muestra de RNA. Se representan también los coeficientes de correlación de Pearson (R) entre las muestras de RNA sin amplificar (GSP) y amplificadas (IVT) para los 46 genes cuyo perfil se determinó.

La Figura 11 es un esquema que representa la estrategia para mejora del cebado específico de genes del FPET RNA fragmentado. En esta Figura, FPET significa "tejido fijado incrustado en parafina", ^{Me}Gppp hace referencia a la estructura del guanilato-CAP metilado en 5' del mRNA, A₁₀₀₋₃₀₀ se refiere al tramo 3' poliA de mRNA, RT significa transcriptasa inversa, PCR significa reacción en cadena de polimerasa, amplicón significa la región del mRNA amplificada por PCR, y GSP significa iniciador específico de genes. Los iniciadores extendidos inversos (10b, 20b y 30b) son idénticos al iniciador inverso pero se extienden aproximadamente 10, 20 y 30 bases más allá en el amplicón. El 3' del iniciador 30b RT y el extremo 3' del iniciador directo están separados por una sola base.

La Figura 12 muestra el análisis de la expresión génica seleccionada de FPET RNA de tumores de mama (Clinomics 168). La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7700. La síntesis del cDNA se inició con iniciadores específicos de genes (iniciadores Std) o iniciadores extendidos inversos (iniciadores 10b, 20b y 30b). Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct).

La Figura 13 es un diagrama esquemático que ilustra el flujo de trabajo global del proceso de amplificación de bases mejorado basado en perlas de la invención utilizado para medir la expresión génica. En esta Figura, FPET significa "tejido fijado incrustado en parafina", PNK significa "polinucleótido-quinasa", EPAP significa poliA-polimerasa de *E. coli*, O-T7-(TTT) es un iniciador de fase sólida inmovilizado para síntesis de cDNA constituido por una secuencia promotora de RNA-polimerasa T7 y una secuencia de oligodesoxitimidilato unida a una perla magnética de poliestireno, RT significa "transcriptasa inversa", RNAsaH significa "ribonucleasa H", DNA pol I significa la "DNA polimerasa I", IVT significa "transcripción in vitro", cRNA significa "RNA complementario generado por IVT, y O(-) rRNA se refiere a secuencias de RNA ribosómico complementarias inmovilizadas en perlas (sintetizadas como oligos de DNA cortos). El protocolo mejorado basado en perlas se muestra en la porción central del diagrama (flechas de trazo continuo). El proceso comienza con FPET RNA, generalmente 50-200 ng, e implica 1) desbloqueo del 3' OH en el nucleótido terminal con PNK, 2) adición directa de colas EPAP poliA del FPET RNA 3' sin depuración después del paso PNK, 3) hibridación de FPET RNA poliadenilado a secuencias promotoras de RNA-polimerasa oligo dT-T7 inmovilizadas a perlas, seguido por 4) síntesis de cDNA con RT, 5) degradación parcial del RNA por RNAsa H y síntesis de la segunda cadena de DNA con DNA-polimerasa I, y 6) amplificación del RNA por transcripción *in vitro*. Un procedimiento opcional para una segunda tanda de IVT se muestra en el paso 7 (flechas discontinuas). Otro paso opcional, representado en el paso 2' implica el empobrecimiento de los fragmentos ribosómicos de rRNA (flecha punteada).

La Figura 14 muestra los resultados de diversas modificaciones de depuración del PNK seguidas por poliadenilación mediante EPAP. El panel izquierdo muestra el tamaño del FPET RNA por electroforesis microcapilar utilizando el Bioanalizador Agilent 2100. Descripciones de las pistas: escalera, marcadores de peso molecular del RNA de 200 bases (mínimo) a 6000 bases; SN, FPET RNA sin modificar. 1-6, condiciones de depuración de PNK descritas en el panel derecho. P/C se refiere a fenol/cloroformo; la columna DEPC-30 se refiere a una columna CHROMA Spin™ DEPC-H₂O 30, y las condiciones de desactivación térmica eran 65°C, 20 min. El porcentaje de recuperación después de la depuración EPAP se refiere a FPET RNA de entrada (1000 ng).

La Figura 15 muestra un análisis de expresión de un panel de 47 genes de FPET RNA amplificado de tumores de mama (Clinomics BioSciences, Pittsfield, MA). La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7900. Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Las tablas de los re-

cuadros muestran el Ct global medio de los 47 genes cuyo perfil se determinó para cada condición de depuración y el rendimiento de cRNA para cada IVT. Las condiciones de depuración se describen más adelante en el Ejemplo 2.

La Figura 16 muestra un análisis de la expresión en panel de 47 genes de FPET RNA placentario amplificados por una IVT no basada en perlas (IVT libre) y una IVT basada en perlas (IVT en fase sólida) descrita en el Ejemplo 3. Para comparación, se muestra también el perfil de material de partida (SM) no amplificado. La placenta se trató durante 1,5-2 h con formalina y fue incrustada en parafina por BioPathology Sciences Medical Corporation, South San Francisco, CA. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7900. Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Las tablas de los recuadros muestran el Ct global medio de los 47 genes cuyo perfil se determinó para cada condición de depuración y el rendimiento de cRNA para cada IVT. Se muestran también los rendimientos después de normalización (rendimiento; Ct. adj.). La ecuación para normalización de los rendimientos es: $\text{rendimiento de cRNA}/2^{(\text{Ct}_{\text{Med.}} - \text{Ct}_{\text{SM}})}$

Las Figuras 17 A-C muestran un análisis de la expresión de un panel de 47 genes de FPET RNA placentario amplificado. La placenta se trató durante 1,5-2 h con formalina y fue incrustada en parafina por BioPathology Sciences Medical Corporation, South San Francisco, CA. La expresión se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en un ABI Prism® 7900. Los rendimientos relativos se miden por el ciclo umbral (Ct). Las tablas de los recuadros muestran el Ct global medio de los 47 genes cuyo perfil se determinó para cada condición FRA y el rendimiento de cRNA para cada IVT. Las tres condiciones FRA se describen más adelante en el Ejemplo 4. Las Figuras 17A y 17B muestran los resultados de la amplificación primaria y secundaria, respectivamente. La Figura 17C muestra una comparación de una IVT primaria y secundaria (Condición 3).

Descripción Detallada de la Realización Preferida

A. Definiciones

A no ser que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido generalmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que se refiere esta invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª edición, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), proporcionan a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

El término "poliadenilación o adición de colas poliA" se refiere a la adición de un tramo de moléculas de adenilato (poli(A)) al extremo 3' del RNA, v.g. mRNA.

"Eficiencia de poliadenilación" se refiere a la facilidad con la que ocurre la adición de poliA y depende de la disponibilidad del grupo 3'-hidroxilo (3' OH) libre en el resto ribosa 3'-terminal del RNA.

"Bloqueo de la poliadenilación" o "extremo 3' bloqueado" del RNA hace referencia al bloqueo de la disponibilidad del resto ribosa 3'-terminal del RNA para una reacción de poliadenilación. Esto puede ocurrir, por ejemplo, debido a que el término 3' del RNA contiene diversos ésteres fosfato, típicamente 2',3'-fosfatos cíclicos, 2'-monofosfatos y 3'-monofosfatos que tienen que ser eliminados para permitir la adición de una cola poliA al término 3' del RNA.

"Desfosforilación" se refiere a la eliminación de los ésteres fosfato (arriba descritos) por cualesquiera métodos con inclusión, pero sin carácter limitante, de técnicas enzimáticas, tales como la utilización de fosfatasa intestinal de ternero (CIP) o polinucleótido-quinasa (PNK) T4.

"Ciclo umbral (Ct)" se refiere a los rendimientos relativos de ácido nucleico amplificados en una reacción PCR. Durante la PCR TaqMan®, se utiliza la actividad de la 5'-nucleasa de la polimerasa Taq para escindir y liberar un tinte informador extinguido presente en un tercer iniciador oligonucleotídico (que no es extensible por la polimerasa Taq) que detecta una secuencia de nucleótidos localizada entre los dos iniciadores PCR. Se libera una molécula de tinte informador por cada molécula de ácido nucleico nuevamente sintetizada, y la detección de este tinte informador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de la amplificación o la cantidad de producto amplificada hasta dicho punto en la reacción de amplificación. El punto en el que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa es el ciclo umbral (Ct). Cuanto menor es el valor Ct, tanto más abundante es el mRNA, y mejor la eficiencia del ácido nucleico (cDNA o mRNA poliA o mRNA degradado) en la red de determinación del perfil de expresión.

El término "microrred" se refiere a una disposición ordenada de elementos de red hibridables, tales como sondas polinucleotídicas, en un sustrato.

El término "polinucleótido", cuando se utiliza en singular o plural, hace referencia generalmente a un polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA sin modificar o RNA o DNA modificado. Así, por ejemplo, polinucleótidos como se definen en esta memoria incluyen, sin limitación, DNA mono- y bicatenario, DNA con inclusión de regiones mono- y bicatenarias, RNA mono- y bicatenario, y RNA con inclusión de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o incluir regiones mono- y bicatenarias. Adicionalmente, el término "polinucleótido" como se utiliza en esta memoria hace referencia a regiones tricatenarias, que comprenden RNA o DNA o a la vez RNA y DNA. Las cadenas en

tales regiones pueden proceder de la misma molécula o corresponder a moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican sólo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente DNAs y RNAs que contienen una o más bases modificadas. Así, DNAs o RNAs con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" tal como dicho término se contempla en esta memoria. Además, DNAs o RNAs que comprenden bases no usuales, tales como inosina, o bases modificadas tales como bases tritiadas, se incluyen dentro del término "polinucleótidos" como se define en esta memoria. En general, el término "polinucleótido" abarca todas las formas modificadas química, enzimática y/o metabólicamente de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células, con inclusión de células simples y complejas.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono- o bicatenarios, híbridos RNA:DNA y DNAs bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos sonda de DNA monocatenario, se sintetizan a menudo por métodos químicos, por ejemplo utilizando sintetizadores automáticos de oligonucleótidos que están disponibles comercialmente. Sin embargo, pueden producirse oligonucleótidos por una diversidad de otros métodos, que incluyen técnicas *in vitro* mediadas por DNA recombinante y por expresión de DNAs en células y organismos.

Los términos "gen expresado diferencialmente", "expresión diferencial de genes" y sus sinónimos, que se utilizan de modo intercambiable, hacen referencia a un gen cuya expresión está activada a un nivel mayor o menor en un individuo que sufre una enfermedad, específicamente cáncer, tal como cáncer de mama, con relación a su expresión en un individuo normal o de control. Los términos incluyen también genes cuya expresión está activada a un nivel mayor o menor en diferentes fases de la misma enfermedad. Se entenderá también que un gen expresado diferencialmente puede estar activado o inhibido al nivel de ácido nucleico o al nivel de proteína, o puede estar sometido a corte y empalme alternativo dando como resultado un producto polipeptídico diferente. Tales diferencias pueden evidenciarse por un cambio en los niveles de mRNA, expresión superficial, secreción u otra partición de un polipéptido, por ejemplo. La expresión diferencial de genes puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes, o una comparación de las relaciones de la expresión entre dos o más genes, o incluso una comparación de dos productos procesados diferentemente del mismo gen, que difieren entre individuos normales e individuos que sufren una enfermedad, específicamente cáncer, o entre diversas fases de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o su producto de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas, o entre células que han sufrido sucesos de enfermedad o fases de enfermedad diferentes. Para el propósito de esta invención, se considera que existe "expresión diferencial de genes" cuando existe una diferencia de al menos aproximadamente dos veces, con preferencia al menos aproximadamente 4 veces, de modo más preferible al menos aproximadamente 6 veces, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 10 veces entre la expresión un gen dado en individuos normales y enfermos, o en diversas fases de desarrollo de la enfermedad en un individuo enfermo.

La frase "amplificación génica" se refiere a un proceso por el cual se forman copias múltiples de un gen o fragmento de gen en una célula o línea de células particular. La versión duplicada (un tramo de DNA amplificado) se designa a menudo como "amplicón". Usualmente, la cantidad del RNA mensajero (mRNA) producida, es decir, el nivel de expresión génica, aumenta también en la proporción del número de copias producidas del gen particular expresado.

Los términos "corte y empalme" y "corte y empalme de RNA" se utilizan intercambiabilmente y hacen referencia al procesamiento de RNA que elimina intrones y une exones para producir mRNA maduro con secuencia codificante continua que se mueve en el citoplasma de una célula eucariota.

En teoría, el término "exón" hace referencia a cualquier segmento de un gen interrumpido que está representado en el producto RNA maduro (B. Lewin. *Genes IV* Cell. Press Cambridge Mass. 1990). En teoría, el término "intrón" se refiere a cualquier segmento de DNA que se transcribe pero es eliminado del transcrito por corte y empalme de los exones que se encuentran a cada lado del mismo. Operativamente, las secuencias de exones ocurren en la secuencia de mRNA de un gen como se define por los números Ref. Seq. ID. Operativamente, las secuencias de intrón son las secuencias intercaladas dentro del DNA genómico de un gen, horquilladas por secuencias de exón y que tienen secuencias de consenso de corte y empalme GT y AG en sus límites 5' y 3'.

El término "tumor" como se utiliza en esta memoria, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásticas, sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" hacen referencia a o describen la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento descontrolado de células. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin carácter limitante, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, y cáncer de cerebro.

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que ponen en peligro el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de

las células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos de secreción a niveles anormales, supresión o agravación de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

B. Descripción Detallada

5 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, métodos convencionales de microbiología molecular (con inclusión de técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, y bioquímica, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichos métodos se explican detalladamente en la bibliografía, por ejemplo en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds, 1987); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994). Protocolos específicos se describen más adelante en la sección Materiales y Métodos de los ejemplos.

Como se ha expuesto anteriormente, la determinación del perfil de expresión génica se ha convertido en una herramienta importante de investigación biológica y práctica clínica.

15 PCR con Transcriptasa Inversa en Tiempo Real (RT-PCR)

De las técnicas de determinación del perfil de expresión génica, el método cuantitativo más sensible y más flexible es la RT-PCR, que puede utilizarse para comparar niveles de mRNA en poblaciones de muestras diferentes, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármacos, a fin de caracterizar los patrones de expresión génica, discriminar entre mRNAs estrechamente afines, y analizar la estructura del RNA.

20 El primer paso en la determinación del perfil de expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa del molde de RNA en cDNA, seguido por su amplificación exponencial en una reacción PCR. Las dos transcriptasas inversas más comúnmente utilizadas son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). El paso de transcripción inversa se realiza típicamente utilizando iniciadores específicos de genes, hexámeros aleatorios, o iniciadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y de la meta de determinación del perfil de expresión. Por ejemplo, el RNA extraído puede transcribirse inversamente utilizando un kit de RNA PCR GeneAmp (Perkin Elmer, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA derivado puede utilizarse luego como molde en la reacción PCR subsiguiente.

30 Aunque el paso PCR puede utilizar una diversidad de DNA-polimerasas termoestables dependientes de DNA, el mismo emplea típicamente la DNA-polimerasa Taq, que tiene una actividad de nucleasa 5'-3' pero carece de actividad de endonucleasa 3'-5' de lectura de pruebas. Así, TaqMan® PCR utiliza típicamente la actividad de nucleasa 5' de Taq o TH-polimerasa para hidrolizar una sonda de hibridación fijada a su amplicón diana, pero puede utilizarse cualquier enzima con actividad de nucleasa 5' equivalente. Se utilizan dos iniciadores oligonucleotídicos para generar un amplicón típico de una reacción PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, está diseñado para detectar secuencias nucleotídicas localizadas entre los dos iniciadores PCR. La sonda no es extensible por la enzima DNA-polimerasa Taq, y está marcada con un tinte informador fluorescente y un tinte de extinción fluorescente. Cualquier emisión del tinte informador inducida por láser es extinguida por el tinte de extinción cuando los dos tintes están localizados próximos tal como se encuentran en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima DNA-polimerasa Taq escinde la sonda de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución, y la señal procedente de tinte informador liberado está exenta del efecto de extinción del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de tinte informador por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del tinte informador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

45 La TaqMan® RT-PCR puede realizarse utilizando equipo disponible comercialmente, tal como, por ejemplo, el Sistema de Detección de Secuencias™ ABI Prism 7700™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de la nucleasa 5' se ejecuta en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como el Sistema de Detección de Secuencias™ ABI Prism 7700™. El sistema está constituido por un termociclador, láser, dispositivo acoplado a carga (CCD), cámara y computadora. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para cada uno de los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para hacer funcionar el instrumento y para análisis de los datos.

50 Los datos del ensayo de la nucleasa 5' se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Como se ha expuesto anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta dicho punto en la reacción de amplificación. El punto en que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativo es el ciclo umbral C_t .

55 Para minimizar errores y el efecto de variación de muestra a muestra, la RT-PCR se realiza usualmente utilizando un patrón interno. El patrón interno ideal se expresa a un nivel constante entre diferentes tejidos, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los RNAs utilizados más frecuentemente para normalizar patrones de expresión génica son mRNAs para los genes propios gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina.

Una variación más reciente de la técnica RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación de producto PCR a través de una sonda fluorígena de marcación dual (a saber, la sonda TaqMan®). La PCR en tiempo real es compatible con la PCR cuantitativa competitiva, en la que se utiliza un competidor interno para cada secuencia diana a fines de normalización, y con la PCR cuantitativa comparativa, utilizando un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen propio para la RT-PCR. Para detalles adicionales véase, v.g. Held *et al.*, *Genoma Research* 6:986-994 (1996).

Análisis de Microrredes

Otro método de adición utilizado frecuentemente para la determinación del perfil de expresión génica es la técnica de microrredes. En este método, secuencias de polinucleótidos de interés (con inclusión de cDNAs y oligonucleótidos) se extienden, o se disponen en red, sobre un sustrato de microchip. Las secuencias dispuestas en red se hibridan luego con sondas específicas de DNA de células o tejidos de interés. Del mismo modo que en el método RT-PCR, la fuente de mRNA es típicamente RNA total aislado de tumores humanos o líneas de células tumorales, así como tejidos o líneas de células normales correspondientes. Por tanto, el RNA puede aislarse de una diversidad de tumores primarios o líneas de células tumorales. Si la fuente de mRNA es un tumor primario, el mRNA puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejidos congeladas o archivadas incrustadas en parafina y muestras de tejido fijadas (v.g. fijadas en formalina), que se preparan rutinariamente y se conservan en la práctica clínica diaria.

En una realización específica de la técnica de microrredes, se aplican inserciones amplificadas por PCR de clones de cDNA a un sustrato en una red densa. Preferiblemente, se aplican al sustrato al menos 10.000 secuencias nucleotídicas. Los genes dispuestos en microrredes, inmovilizados en el microchip a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para hibridación en condiciones severas. Pueden generarse sondas de cDNA marcadas fluorescentemente por incorporación de nucleótidos fluorescentes mediante transcripción inversa de RNA extraído de tejidos de interés. Las sondas de cDNA marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada punto de DNA en la red. Después de lavado severo para eliminar las sondas no fijadas específicamente, el chip se escanea por microscopía láser confocal o por otro método de detección, tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento dispuesto en red permite la evaluación de la abundancia del mRNA correspondiente. Con la fluorescencia en color dual, sondas de cDNA marcadas por separado, generadas por dos fuentes de RNA, se hibridan por pares a la red. La abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina así simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una variación cómoda y rápida del patrón de expresión para grandes números de genes. Se ha demostrado que tales métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que se expresan a razón de un pequeño número de copias por célula, y para detectar de manera reproducible al menos aproximadamente diferencias de dos veces en los niveles de expresión (Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2): 106-149 (1996)). El análisis de microrredes puede realizarse mediante equipo disponible comercialmente, siguiendo los protocolos de los fabricantes, utilizando por ejemplo la tecnología Affymetrix GenChip, o la tecnología de microrredes de Incyte.

El desarrollo de métodos de microrredes para análisis en gran escala de la expresión génica hace posible buscar sistemáticamente marcadores moleculares de clasificación del cáncer y la predicción del desenlace en una diversidad de tipos de tumor.

Extracción y Amplificación del RNA para Determinación del Perfil de Expresión Génica

Un paso común en la determinación del perfil de expresión génica por las técnicas de RT-PCR y microrredes es la extracción de mRNA de muestras biológicas.

Los métodos generales para extracción de mRNA son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar de biología molecular, con inclusión de Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Métodos para extracción de DNA de tejidos incrustados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab Invest.* 56: A67 (1987), y De Andrés *et al.*, *Biotechniques* 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento del RNA puede realizarse utilizando kit de depuración, juego de tampones y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el RNA total de células en cultivo puede aislarse utilizando mini-columnas RNeasy de Qiagen. Otros kits de aislamiento de RNA disponibles comercialmente incluyen el Kit de Depuración Completa de DNA y RNA MasterPure™ (EPICENTRE®, Madison, WI), y el Kit de Aislamiento de RNA en bloques de parafina (Ambion, Inc.). El RNA total de muestras de tejidos puede aislarse utilizando RNA Stat-60 (Tel-Test). El RNA preparado a partir de tumores puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

En caso necesario, el DNA puede eliminarse en varias etapas de aislamiento del RNA, por DNasa u otros métodos bien conocidos en la técnica. Después del análisis de la concentración de RNA después de depuración, pueden ser necesarios pasos de reparación y/o amplificación del RNA antes de someter el RNA a cualesquiera métodos de determinación del perfil de expresión génica conocidos, con inclusión de RT-PCR acoplada con 5'-exonucleasa de sondas informadoras (ensayos de tipo TaqMan®), ensayos de endonucleasa de solapas (ensayos de tipo Cleavase e Invader), redes de hibridación de oligonucleótidos, redes de hibridación de cDNA, ensayos de ligación de oligonucleótidos, ensayos de extensión de nucleótidos 3' simples y otros ensayos diseñados para evaluar la abundancia de secuencias específicas de mRNA en una muestra biológica.

A pesar de la disponibilidad de productos comerciales, y del extenso conocimiento disponible concerniente al aislamiento de RNA de tejidos, el aislamiento de ácido nucleico (RNA) a partir de especímenes de tejidos fijados incrustados en parafina (FPET) y su uso para determinación del perfil de la expresión génica no carece de dificultades.

5 Es notoriamente difícil extraer mRNA y mantenerlo en su estado nativo; por consiguiente, el mRNA recuperado de diversas fuentes biológicas, y específicamente de tejido fijado incrustado en parafina (FPET) archivado está a menudo fragmentado y/o degradado. La Figura 2 muestra un ejemplo de RNA aislado de muestras de cáncer de mama incrustadas en parafina (PFE) y fijadas con formalina que estuvieron archivadas durante 1 a 17 años. La degradación del RNA progresa con el tiempo de almacenamiento del archivo y da como resultado un RNA que tiene un tamaño medio de aproximadamente 100 bases después de 17 años de almacenamiento. En comparación, el mRNA intacto tiene un tamaño medio de aproximadamente 1800-2000 bases.

Como se ha expuesto anteriormente, la extracción de mRNA va seguida típicamente por conversión en cDNA utilizando la enzima dependiente de iniciadores transcriptasa inversa (RT). La conversión universal de mRNA intacto en cDNA es realizada eficientemente por cebado con oligo dT del mRNA en presencia de RT.

15 El cebado efectivo con oligo dT durante la reacción PCR se hace posible por la presencia de un tramo poliA en el extremo 3' del mRNA. La Figura 3 muestra que puede determinarse eficientemente el perfil de mRNA intacto por análisis TaqMan® utilizando cDNA generado por RT y cebado con oligo dT. Como puede verse también, la determinación del perfil de RNA fijado incrustado en parafina (FPET) o degradado aleatoriamente (obtenido por hidrólisis alcalina) por síntesis de cDNA cebado con oligo dT es extremadamente ineficiente a juzgar por la señal TaqMan® más baja (mayor Ct) obtenida con relación al RNA intacto. Para los genes cuyo perfil se ha determinado, las señales del RNA intacto son por término medio 500-1000 veces mayores que las señales correspondientes del FPET RNA.

20 Los autores de la presente invención han considerado que la conversión ineficiente de FPET mRNA en cDNA por cebado con oligo dT podría ser resultado del hecho de que la mayor parte de los mRNAs degradados no contiene una cola poliA. Es importante que como demuestra la Figura 3, el perfil del RNA degradado puede determinarse eficientemente utilizando iniciadores específicos de genes (GSP). Esto indica que la mayoría de las regiones de los genes expresados están presentes en el RNA fragmentado aleatoriamente en las proporciones esperadas para el mRNA intacto. Este resultado sugiere que sería posible realizar la determinación efectiva del perfil universal de la expresión génica sobre extractos fragmentados, v.g. extractos de FPET mRNA.

25 A este fin, se ha intentado la transcripción inversa global de FPET RNA por poliadenilación inicial del RNA seguida por realización de RT cebada con oligo dT. Como se muestra en la Figura 4, la poliadenilación de FPET RNA antes del cebado con oligo dT aumentaba la conversión del RNA en cDNA aproximadamente 2-4 veces a juzgar por el análisis TaqMan de 3 mRNAs. Este resultado se ha interpretado como sugestión de que la poliadenilación puede ser un método útil para preparar RNA fragmentado, v.g. FPET RNA para transcripción global inversa y determinación subsiguiente del perfil de expresión génica. Sin embargo, esta amplificación de la señal era todavía solamente una pequeña fracción de la obtenida por cebado con iniciadores específicos de genes (GSP) que es el método de cebado más eficiente utilizado en la actualidad de la conversión de regiones seleccionadas de mRNA en cDNA por RT.

30 Un reconocimiento subyacente de la presente invención es que la conversión limitada de RNA fragmentado en cDNA se debe al hecho de que, en el RNA fragmentado, el extremo 3' de una gran proporción de los fragmentos de RNA está bloqueado y por consiguiente no está accesible a la poliadenilación.

35 Se ha desarrollado un sistema modelo para monitorizar el nivel de poliadenilación del RNA fragmentado, v.g. FPET RNA y determinar su efecto sobre la determinación del perfil de expresión génica cuando los extremos 3' del RNA no están bloqueados. Se generaron fragmentos de RNA (~ 100 bases) de tres genes por transcripción *in vitro* (IVT), a continuación de lo cual se agruparon y poliadenilaron. La poliadenilación se monitorizó por electroforesis capilar en el BioAnalyzer Agilent 2100. El recuadro de la Figura 5 demuestra que la adición de colas de RNA con 0,1 y 0,2 unidades de poliA polimerasa de *E. coli* (EPAP) añade entre 20 y 200 adenilatos al RNA. El RNA poliadenilado se transcribió luego inversamente en cDNA utilizando cebado con oligo dT y se ensayó por análisis TaqMan (Figura 5). Como puede verse, la poliadenilación del RNA (0,2 EPAP/oligo-dT) dio como resultado un aumento espectacular en la señal TaqMan con relación al RNA no adicionado de colas.

40 Basándose en el resultado anterior, se ha emitido la hipótesis de que la mayor parte de los extremos 3' en el FPET RNA fragmentado estaban bloqueados, debido probablemente a hidrólisis enzimática con RNAsas celulares que producen comúnmente 3' PO₄ o 2'-3' PO₄ cíclico. Estas modificaciones bloquearían eficazmente la poliadenilación del FPET RNA.

45 De acuerdo con una variación del método de la invención, la conversión eficaz de mRNA fragmentado en cDNA comienza con el desbloqueo del término 3' del RNA. Cualquier fosfatasa, como fosfatasa alcalina de ternero (CIP) o polinucleótido-quinasa (PNK) T4 puede utilizarse para eliminar los 2',3'-fosfatos cíclicos, 2'-monofosfatos y 3'-monofosfatos, generados típicamente en el resto ribosa 3'-terminal de los RNAs degradados. Esto asegura una adición eficiente de poliA por la poliA-polimerasa al término 3' del FPET RNA. La PNK, que es también una fosfatasa 3', cataliza la hidrólisis de los grupos 3'-fosforilo de los desoxinucleosido 3'-monofosfatos, desoxinucleosido 3',5'-difosfatos y de los 3'-fosforil-polinucleótidos. Otras fosfatasas como la fosfatasa alcalina bacteriana, la fosfatasa alcalina de camarón, y

derivados de las mismas, pueden utilizarse también para efectuar dichas reacciones de desfosforilación. El término 3' tiene ahora un 3' OH libre disponible.

La poliadenilación o "adición de colas poliA" de mRNA o FPET mRNA después de reacciones enzimáticas como la desfosforilación implica la adición de moléculas de adenilato o poli(A) al extremo 3' OH del RNA. En una realización, esto se realiza utilizando poliA-polimerasa de *E. coli*. Sin embargo, como será comprendido por los expertos en la técnica, pueden utilizarse también otras poliA-polimerasas.

Realizaciones Específicas

Tres protocolos representativos (A, B y C) de la invención se ilustran en la Figura 1. Los procesos A y B comienzan con FPET RNA e implican 1) desbloqueo directo o indirecto del 3'OH en el nucleótido terminal, 2) adición de colas poliA en el extremo 3', 3) síntesis de cDNA bicatenario cebado con poli dT con la incorporación de un promotor de RNA-polimerasa T7, y 4) amplificación del RNA por transcripción *in vitro*.

El proceso C (flecha central en el diagrama) comienza con FPET RNA e implica 1) síntesis de cDNA bicatenario cebada con T7-(N)15 con la incorporación de un promotor de RNA-polimerasa T7, y 2) amplificación del RNA por transcripción *in vitro*.

Específicamente, el Protocolo A implica una síntesis de cDNA cebada aleatoriamente (hexámeros) que genera cDNA con 3' OH libre en el nucleótido terminal del FPET cDNA. El FPET cDNA se adiciona luego de colas con Transferasa Terminal (TdT) y dATP. El cDNA adicionado de colas poli dA se convierte luego en DNA bicatenario con DNA-polimerasa I (Klenow) y el iniciador T7-(dT)₂₄. Este material se amplifica luego con RNA-polimerasa T7 y rNTPs para generar FPET RNA en (cadena +). Este material es adecuado para análisis de la expresión génica por TaqMan®. Para ser una diana adecuada para microrredes que contengan sondas de cadena (+) el FPET RNA precisa convertirse en cDNA de cadena (-) en presencia de dNTPs biotinilados, iniciadores aleatorios y RT. Este material es adecuado ahora para hibridación a microrredes a fin de realizar la determinación universal del perfil de expresión génica. Para microrredes que contengan sondas bicatenarias, este paso final no es necesario. En este caso, el paso IVT debería incluir biotina-rNTP's como en el protocolo B (a continuación).

El protocolo B implica un desbloqueo del 2' OH y/o 3' OH del nucleótido 3'-terminal del FPET RNA con polinucleótido quinasa (PNK) o [tratamiento a pH 2 (HCl 0,01M o ácido maleico)] seguido por fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP). Esto hace posible que el RNA pueda poliadenilarse eficientemente en el nucleótido 3' terminal con poliA-polimerasa de *E. coli* y ATP. A continuación de la poliadenilación, el RNA se convierte en cDNA mediante transcriptasa inversa utilizando o bien oligo dT u oligo dT-T7 como iniciadores. El cDNA cebado con oligo dT puede utilizarse directamente para análisis de la expresión génica por análisis TaqMan®. Este método se prefiere si la cantidad de FPET RNA no es limitante. Si la cantidad del FPET RNA es limitante, entonces el método preferido consiste en utilizar el cDNA cebado con oligo dT-T7, convertirlo en DNA bicatenario con DNA-polimerasa I y RNAsa H y amplificarlo subsiguientemente con RNA-polimerasa T7 y rNTPs. Si la muestra debe utilizarse para análisis de microrredes, entonces el cDNA cebado con oligo dT-T7 se convierte en DNA bicatenario como anteriormente, y se amplifica subsiguientemente con RNA-polimerasa T7 y rNTPs-biotinilados. De nuevo, este protocolo permite la determinación universal del perfil de expresión génica, utilizando FPET RNA o, en un sentido más general, RNA fragmentado de cualquier origen.

Un protocolo adicional de la invención se muestra en la Figura 11. En este protocolo, el paso RT se mejora por utilización de iniciadores inversos más largos como se muestra (10 bases, 20 bases y 30 bases) siendo normales las restantes condiciones de la RT. Los iniciadores más largos permiten un aumento en el cebado de los RNAs fragmentados dando como resultado más cDNA diana para el paso PCR. Adicionalmente, los iniciadores más largos pueden ayudar en la transcripción inversa por formación de puentes de bases modificadas con formalina que podrían bloquear en caso contrario la actividad enzimática. Una modificación adicional incluye la realización de los dos ciclos iniciales de la PCR a 50°C. Esto hace posible la amplificación de más cDNA diana debido a la menor temperatura de reasociación. Los dos pasos anteriores dan como resultado señales de expresión génica más fuertes.

Otras realizaciones proporcionan varias mejoras adicionales con respecto a la amplificación universal del protocolo del RNA fragmentado (FRA), como se ha expuesto anteriormente. Estos procedimientos mejorados hacen posible la transcripción inversa global y amplificación de cantidades menores (50 ng) de muestras de FPET RNA incluso muy fragmentadas en un formato automatizable de perlas en fase sólida. Las mejoras reducen también el número de depuraciones entre los pasos enzimáticos implicados en el FRA expuestos anteriormente, haciendo del proceso un procedimiento de mayor capacidad. Adicionalmente, las mejoras permiten el archivado de transcriptomas de RNA completos fragmentados en perlas. Aunque fragmentados, los RNAs archivados se reamplifican fácilmente, permitiendo así la medida reproducible de los niveles de mRNA de todos los genes expresados en muestras de tejido procedentes de biopsias o de tejidos tumorales resecaados y archivados incrustadas en parafina. Por último, el procedimiento puede incorporar también fácilmente un paso de enriquecimiento para mRNA que permite una sensibilidad incrementada del análisis de expresión génica.

Un procedimiento de amplificación de FPET RNA universal y rápido podría aumentar notablemente el número de genes cuyo perfil de expresión puede determinarse y el número de estudios que pueden realizarse con cantidades típicamente limitantes de muestras clínicas valiosas.

Las mejoras y cambios específicos en el protocolo básico que se incorporan para crear el protocolo mejorado basado en perlas son las siguientes:

(a) eliminación del paso de Depuración entre el desbloqueo de los términos 3' del FPET RNA con PNK y la poliadenilación del RNA con EPAP;

5 (b) hibridación del RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) a un formato de perlas en fase sólida; el paso permite fácilmente un paso opcional del enriquecimiento para mRNA por eliminación de las secuencias rRNA mediante hibridación con anterioridad al paso (c);

(c) conversión del RNA inmovilizado en perlas en el paso (b) en cDNA y subsiguientemente en DNA bicatenario;

10 (d) amplificación del RNA por sometimiento del DNA bicatenario obtenido en el paso (c) a transcripción *in vitro* con una RNA-polimerasa. La realización de los pasos (c) y (d) en perlas reduce también el tiempo de Depuración entre los pasos enzimáticos;

(e) reducción del tamaño de la muestra inicial de FPET RNA desde 200 ng a 50 ng;

(f) posibilidad de archivar las bibliotecas de FPET RNA como DNA bicatenario inmovilizado en perlas y reamplificar el material para producir RNA adicional.

15 Las mejoras se ilustran en la Figura 13. El proceso comienza con FPET RNA, generalmente 50-200 ng, e implica 1) desbloqueo del 3' OH en el nucleótido terminal con PNK, 2) adición directa de colas EPAP poliA del FPET RNA 3' sin Depuración desde el paso PNK, 3) hibridación de FPET RNA poliadenilado a secuencias promotoras de RNA-polimerasa dT-T7 inmovilizadas en perlas seguido por 4) síntesis del cDNA con RT, 5) degradación parcial del RNA por RNasa H y síntesis de la segunda cadena del DNA con DNA-polimerasa I, y 6) amplificación del RNA por transcripción *in vitro*. Un procedimiento opcional para una segunda tanda de IVT se muestra en el paso 7 (flechas discontinuas). Otro paso opcional, representado en el paso 2' implica el empobrecimiento de fragmentos de rRNA ribosómicos (flecha de puntos).

25 Las perlas utilizadas para hibridación de ácido nucleico pueden ser microperlas disponibles comercialmente, tales como, por ejemplo perlas magnéticas de estreptavidina Dynal de 2,8 μm (M-280) o Dynabeads® MyOne™ Streptavidin (Dynal Biotech, Oslo, Noruega). Las perlas de estreptavidina pueden fijarse fácilmente a ácidos nucleicos biotinilados 5' o 3'. El oligo dT inmovilizado basado en perlas ha sido muy útil en la depuración de mRNA (Hornes, E. y Korsnes, L. (1990), *Genet. Anal. Tech. Appl.* 7:145; Jacobsen, K., Breivold, E. y Hornes, E. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3669) y para amplificación subsiguiente de aRNA (Eberwine, J. (1995), *Biotechniques* 20:584).

30 Detalles adicionales de la invención, con inclusión de la desfosforilación del término 3' del RNA fragmentado, poliadenilación, transcripción inversa subsiguiente utilizando iniciadores extendidos, y PCR mejorada se ilustran por los ejemplos no limitantes siguientes.

Ejemplo de Referencia 1

En el Ejemplo 1 expuesto a continuación se utilizaron los métodos siguientes.

35 Procedimiento de extracción de FPET RNA

40 Se extrajo RNA de secciones de 3-10 μm (para cada paciente). Se eliminó la parafina por extracción con xileno seguida por lavado con etanol. Se aisló el RNA de los bloques de tejido seccionados utilizando el kit de Depuración MasterPure™ (Epicentre Technologies, Madison, WI) y se incluyó un paso de DNasa I. El FPET RNA se depuró ulteriormente por filtración a través de una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30 de acuerdo con la Descripción de los suministradores (Clontech, Palo Alto). Resumidamente, se cargaron en una columna 30 μl de FPET RNA de 50-300 ng/ μl (centrifugados previamente a 2500 rpm (664 x g) durante 5 min en una centrifuga Eppendorf 5417C), se centrifugaron en la columna (en las mismas condiciones de la pre-centrifugación) y se guardaron a -80°C. La Figura 2 muestra un ejemplo de RNA aislado de muestras de cáncer de mama fijadas con formalina e incrustadas en parafina (FPE) que estuvieron archivadas durante 1 a 17 años.

45 Síntesis del RNA Complementario (cRNA) de Control Positivo

50 Se generaron en dos pasos fragmentos pequeños de RNA complementarios a amplicones para los genes HER2, GAPDH, y CYP: 1) fragmentos de DNA monocatenario complementarios a los amplicones para estos genes y que contenían un sitio de RNA-polimerasa T7 en su extremo 5' se sintetizaron (IDT, Coralville, IA) y se amplificaron por PCR. 2) Los productos PCR se depuraron utilizando columnas CHROMA SPIN™ TE-30 y se generó cRNA mediante el kit de transcripción AmpliScribe™ T7 (Epicentre Technologies) y se depuró utilizando una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30.

Desfosforilación del término 3' del FPET RNA

El término 3' del FPET RNA se trató con polinucleótido-quinasa (PNK) T4 o HCl 0,01M y fosfatasa alcalina de ternero (CIP) para eliminar los 2',3'-fosfatos cíclicos, 2'-monofosfatos y 3'-monofosfatos. Estos diversos ésteres fosfato se encuentran típicamente en el resto de ribosa 3' terminal de los RNAs degradados y es necesario eliminarlos a fin de asegurar una adición eficiente de poliA al término 3' del FPET RNA.

Tratamiento con PNK

En un volumen de reacción de 20 µl, 100-5000 ng de FPET RNA se incuban a 37°C durante una hora con 20 unidades de PNK (NEBiolabs, Beverly, MA) en 1X tampón PNK (Tris-HCl 70 mM de pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 5 mM) y 40 unidades de RNasaOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se termina por adición de 20 µl de H₂O exenta de RNasa y extracción con 40 µl de fenol: CHCl₃:IAA (25:24:1) de pH 6,6 (Ambion, Inc., Austin, TX). Después de centrifugación a 14.000 x g durante 1-2 min, se elimina la fase acuosa, se pasa a través de una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30 y se reduce su volumen a 12,5 µl utilizando un vacío Savant-Speed.

Tratamiento con CIP

En un volumen de reacción de 20 µl, se incuban 100-5000 ng de FPET RNA durante 2 horas en HCl 10 mM a 25°C. El FPET RNA se pasa luego a través de una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30 como anteriormente y se incuba con 10 unidades de CIP (New England Biolabs, Beverly, MA) durante 30 min a 37°C en 1X NEBuffer 3 (NaCl 10 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7,9, MgCl₂ 1 mM, ditiotreitól 1 mM) y 40 unidades de RNasaOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se termina por adición de 20 µl de H₂O exenta de RNasa y extracción con 40 µl de fenol: CHCl₃:IAA (25:24:1), de pH 6,6 (Ambion, Inc., Austin, TX). Después de centrifugación a 14.000 x g durante 1-2 min, se elimina la fase acuosa, se pasa a través de una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30 y se reduce el volumen a 12,5 µl utilizando un vacío Savant-Speed.

Poliadenilación del FPET RNA

Se incubaron a 37°C 100-5000 ng de FPET RNA desfosforilado (20 µl de volumen rxn) con 1,0 unidades de poliA-polimerasa de E. coli (EPAP) en 1X tampón EPAP (Ambion, Inc., Austin, TX), ATP 1 mM y 40 unidades de RNasaOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 15 minutos. La reacción se terminó por adición de 20 µl de H₂O exenta de RNasas y extracción con 40 µl de fenol: CHCl₃:IAA (25:24:1), de pH 6,6 (Ambion, Inc., Austin, TX). Después de centrifugación a 14.000 x g durante 1-2 min, se eliminó la fase acuosa y se pasó a través de una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30.

Análisis del FPET RNA

El RNA se cuantificó utilizando el método de fluorescencia RiboGreen (Molecular Probes). El tamaño del RNA se analizó por electroforesis microcapilar utilizando el Bioanizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA).

Iniciador/sonda TaqMan®

Para cada gen, se identificó el número de acceso de la secuencia de referencia (REFSEQ) del mRNA apropiado para el gen y se accedió a las secuencias a través de la base de datos NCBI Entrez Nucleotide. Los iniciadores y las sondas se diseñaron utilizando los programas Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) y Primer 3 [Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000), Primer 3 en la WWW para usuarios generales y para programadores biólogos. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386]. Los oligonucleótidos fueron suministrados por Biosearch Technologies Inc. (Novato, CA) e Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Los tamaños de los amplicones se limitaron a 85 bases. Las sondas fluorógenas se marcaron de modo dual con 5'-FAM y 3'-BHQ1.

Transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó utilizando un Kit de Síntesis de la Primera Cadena SuperScript™ para RT-PCR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Las reacciones se llevaron a cabo con FPET RNA total (3-50 ng/µl) e iniciadores específicos de genes agrupados (100 nM de cada uno) o iniciadores oligo(dT) (25 ng/µl) o iniciadores oligo(dT)-T7 (0,25-5,0 µM). Para la transcripción inversa de iniciadores extendidos, la reacción se efectuó utilizando el kit OmniScript Reverse Transcriptase para síntesis del cDNA de la primera cadena (Qiagen, Valencia, CA) como se ha descrito. El FPET RNA total (3-50 ng/µl) y los iniciadores específicos de genes extendidos agrupados se utilizaron a concentraciones de 3-50 ng/µl y 100 nM (de cada iniciador), respectivamente.

Síntesis del DNA de la segunda cadena

Los productos de síntesis de cDNA de la primera cadena derivados de 100-5000 ng de FPET RNA se incubaron a 16°C (volumen de reacción 150 µl) en 1X tampón de la segunda cadena [Tris-HCl 20 mM, pH 6,9; MgCl₂ 4,6 mM; KCl 90 mM; β-NAD⁺ 0,15 mM; (NH₄)₂SO₄ 10 mM], mezcla de dNTP 0,2 mM, 10 unidades de DNA-ligasa, 40 unidades de DNA-polimerasa I, y 2 unidades de RNasa H (todos los reactivos de Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 horas. Se añaden

dieron luego 9 unidades de DNA-polimerasa T4 (NEBiolabs); la mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos más. Se precipitó el DNA con acetato de amonio 5M y etanol 100%, con 5 µg de glucógeno como portador.

Transcripción in vitro (IVT)

El ds-DNA precipitado (del paso anterior) se resuspendió en 8 µl de H₂O exenta de nucleasa y se llevó a cabo una reacción IVT (20 µl en total) utilizando el kit MEGAScript™ T7 (Ambion, Austin, TX), dejando que transcurriera la reacción durante 4 horas a 37°C. Subsiguientemente, se aumentó el volumen de reacción a 40 µl con H₂O exenta de nucleasa y se precipitó el cRNA con acetato de sodio 3M y etanol 100%. El cRNA precipitado se resuspendió en 20-40 µl de H₂O exenta de nucleasa.

Determinación del perfil de expresión génica TaqMan®

En el caso de las operaciones con ABI 7900®, las reacciones TaqMan® se efectuaron como reacciones duplicadas de 5 µl constituidas por 1X Universal PCR Master Mix y cDNA producido a partir de una cantidad equivalente de 1 ng de RNA total. Las concentraciones finales de iniciador y sonda eran 0,9 µM (de cada iniciador) y 0,2 µM, respectivamente. La ciclación de la PCR se llevó a cabo en el equipo ABI Prism® 7900 como sigue: 95°C 10 minutos x 1 ciclo, 95°C 20 segundos, 60°C 45 segundos x 40 ciclos. Para las operaciones 7700, las reacciones TaqMan® se efectuaron como reacciones triplicadas de 25 µl constituidas por 1X PCR tampón A, MgCl₂ 4 µM, dNTPs 0,2 µM, 0,025 U/µl de DNA-polimerasa AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA), y el cDNA producido a partir de un equivalente de 2,5 ng de RNA total. Las concentraciones finales de iniciador y sonda son como anteriormente. La ciclación PCR se llevó a cabo en un ABI Prism® 7700 como anteriormente. Para los experimentos de cebado PCR modificados, la ciclación PCR se realizó en el ABI Prism® 7700 como sigue: 95°C 10 minutos x 1 ciclo, 95°C 20 segundos, 50°C 2 minutos x 2 ciclos, 95°C 20 segundos, 60°C 45 segundos x 38 ciclos.

Ejemplo 1

Protocolo estándar

Se trató RNA con polinucleótido-quinasa (PNK) o fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP), enzimas con actividad de fosfatasa cíclica 2'-3' y actividad de fosfatasa 3', respectivamente. El análisis por electroforesis capilar [Agilent 2100] del FPET RNA tratado sugería que el tratamiento del FPET RNA con PNK o CIP eliminaba los fosfatos bloqueantes, a juzgar por una disminución sutil en la movilidad del RNA tratado con enzimas con relación a la del RNA sin tratar (fig. 6A). La movilidad electroforética reducida era de esperar debido a que la eliminación del grupo fosfato cargado podría haber reducido la relación carga/masa del FPET RNA.

Si los fosfatos bloqueantes del extremo 3' de los FPET RNAs se eliminaran eficazmente, entonces debería ser posible la poliadenilación del RNA. El tratamiento de FPET RNA con PNK seguido por tratamiento con EPAP (+PNK/+EPAP) dio como resultado una disminución significativa en la movilidad electroforética del FPET RNA (fig. 6B). Para confirmar que el cambio de movilidad era debido a poliadenilación y no debido simplemente a desfosforilación, se incluyeron controles de tratamiento con PNK solo (+PNK/-EPAP) y sin tratamiento alguno (-PNK/-EPAP). La única disminución significativa de movilidad se observó con ambos tratamientos de PNK y EPAP. Así pues, la combinación de un paso de desbloqueo y desfosforilación (tratamiento con PNK o CIP) seguido por un paso de poliadenilación con EPAP convertía muy verosímilmente el FPET RNA en una forma poliadenilada eficientemente. Este RNA poliadenilado debería ser adecuado para la síntesis universal de cDNA utilizando iniciadores oligo dT y RT.

Para testar la eficacia de la poliadenilación en la síntesis universal de cDNA, se poliadeniló FPET RNA por EPAP después de tratamiento con o sin PNK o CIP, y se midió la abundancia de cDNA por TaqMan® RT-PCR. El tratamiento con PNK (Figura 7) o CIP (Figura 8) seguido por poliadenilación y RT-PCR cebada con oligo-dT dio como resultado un aumento significativo en los rendimientos de cDNA con relación a las muestras sin tratar con PNK (4-32 veces) o sin tratar con CIP (8-16 veces). Esto indicaba que el desbloqueo del extremo 3' aumenta espectacularmente la eficiencia de la poliadenilación y la síntesis del cDNA cebada con oligo-dT. Como era de esperar, la poliadenilación tenía muy poco efecto sobre la síntesis de cDNA cebada con GSP. Es importante que los controles positivos GSP indicaban que este método de cebado universal amplificaba el cDNA con una eficiencia del 25-50% de la eficiencia alcanzada con el método de cebado más eficiente actualmente, el cebado GSP.

En un experimento ulterior, se sintetizó cDNA a partir de FPET RNA poliadenilado (tratado con PNK y EPAP) y FPET RNA no poliadenilado utilizando iniciadores oligo dT o iniciadores GSP, respectivamente. En este experimento, se utilizaron 96 iniciadores GSP agrupados y se realizó la expresión de los 96 genes por RT-PCR TaqMan® (utilizando 1 ng de FPET RNA/pocillo, 384 pocillos; instrumento ABI Prism® 7900). Los datos presentados en la Figura 9 demuestran que el FPET RNA poliadenilado se convertía eficientemente en cDNA (pA-dT) a juzgar por la semejanza en los valores Ct con el cDNA cebado con GSP (pA_GSP1). Para muchos genes, el FPET RNA poliadenilado daba una señal mejor con cebado oligo-dT que el cebado GSP. La tabla 1 muestra un sumario estadístico de los datos de la Figura 9. El panel izquierdo indica que la poliadenilación del FPET RNA antes de la RT con oligo dT da como resultado la detección del 77% de los genes (Ct < 38) mientras que el RNA no poliadenilado produce solamente 16% de genes detectables. Adicionalmente, existe una correlación significativa entre el perfil de expresión génica del cDNA generado por GSP y el cebado con oligo dT del RNA poliadenilado (R de Pearson = 0,77). No existía correlación alguna entre los perfiles de expresión génica del cDNA generado por GSP y la RT no poliadenilada, cebada con oligo dT (R = 0,11).

Otra mejora útil de este método fue la inclusión de un sitio de RNA-polimerasa T7 en el iniciador oligo dT de tal modo que el FPET RNA pudiera amplificarse universalmente después de la poliadenilación. La Figura 10 (A-C) demuestra el efecto de la poliadenilación y la transcripción in vitro (IVT) [amplificación con RNA-polimerasa T7 (Van Gelder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(5):1663-7 (1990))] sobre la expresión de 46 genes procedentes de tres fuentes de RNA diferentes. La Figura 10A muestra los perfiles de expresión del RNA intacto de alta calidad (Stratagene). La IVT aumentaba la señal media TaqMan® de la totalidad de los 46 genes (véase el recuadro) ~ 6 veces cuando se compararon cDNA generado por RT cebada con GSP (GSP; control no amplificado) y cDNA generado por RT cebada con oligo dT-T7 que se amplificó subsiguientemente por IVT (No EPAP IVT). La poliadenilación del RNA antes de la síntesis del cDNA e IVT no tenía efecto adicional alguno sobre la señal TaqMan® global (EPAP IVT-1 e IVT-2). Las Figuras 10B y 10C muestran perfiles de expresión génica generados a partir de FPET RNA degradado moderadamente (BioPath Placenta) y FPET RNA fuertemente degradado (Clinomics 168), respectivamente. En estos casos, la poliadenilación era un paso necesario para la amplificación IVT del RNA. Como se muestra, las señales TaqMan medias de experimentos duplicados (EPAP IVT med.) eran ~ 2,5 Cts más bajas (6 veces) que las señales generadas por IVT a partir de RNA no poliadenilado (No EPAP IVT). Es importante que los perfiles génicos se mantienen después de la IVT como se indica por el coeficiente de correlación de Pearson (R = 0,91-0,96). En suma, la poliadenilación del FPET RNA degradado es un método útil para sintetizar globalmente cDNA correspondiente a cada gen presente en la muestra. Este cDNA puede utilizarse para amplificar ulteriormente las señales génicas con exactitud y reproducibilidad por IVT.

Otra mejora para el aumento de las señales de expresión génica se muestra en la Figura 12. En este ejemplo, la detección de 6 genes aumentaba a medida que se alargaban los iniciadores. La extensión de las longitudes de los iniciadores a 20-30 bases más allá de la longitud del iniciador inverso estándar (GSP), incrementaba las señales de expresión génica de 10 a 15 veces. Adicionalmente, si los dos primeros ciclos de la PCR subsiguiente se realizaban a 50°C en vez de 60°C, las señales de expresión génica aumentaban aún varias veces más.

Ejemplo de referencia 2

A no ser que se indique otra cosa, en los ejemplos 2-5 siguientes, se utilizaron los materiales y métodos que siguen.

Materiales

Microesferas MyOne recubiertas con estreptavidina: *DynaI*, 2 ml @ 10 mg/ml.

Iniciador Biotina-Eberwine: *IDT*, 100 pmol/μl stock (100 μM). 5'-biotina-

GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

TTTTVN-3' (SEQ ID NO: 1)

Polinucleótido-quinasa (PNK) T4: *New England Biolabs*, 2500 unidades @ 10 U/μl. Se suministra con un tampón de reacción 10X.

Inhibidor de RNasa: *Applied Biosystems*, 20 U/μl.

H₂O exenta de nucleasas: *Ambion*.

Kit de Adición de Colas poli(A): *Ambion*. Artículos utilizados en el kit: enzima poli(A) polimerasa de *E. coli* (EPAP) (2 U/μl), 5X tampón de reacción, ATP 10 mM.

Sistema de la Primera Cadena SuperScript RT: *Invitrogen*. Artículos utilizados en el kit: 10X tampón RT, DTT 0,1M, mezcla de dNTP 10 mM (nota: la mezcla de dNTP se utiliza también en la síntesis de la segunda cadena), 2 U/μl de RNasaH (utilizada en la síntesis de la segunda cadena).

Enzima SuperScript II RT: *Invitrogen*, 200 U/μl. Se suministra con 5X tampón RT, que se utiliza para crear el 1X tampón RT para el paso de lavado pre-RT.

MgCl₂ 0,1M: *Ambion*. Se suministra como stock 1M y se diluye subsiguientemente 1:10.

5X tampón de la segunda cadena: *Invitrogen*. DNA-ligasa: *Invitrogen*, 10 U/μl.

DNA-polimerasa I: *Invitrogen*, 10 U/μl.

DNA-polimerasa T4: *Invitrogen*, 5 U/μl.

Glucógeno: *Ambion*, 5 mg/ml.

Acetato de amonio 5M: *Ambion*.

Etanol 100%: *Sigma*MEGAScript-Kit IVT T7: *Ambion*. Artículos utilizados en el kit: tampón 10X IVT, NTPs 75 mM, mezcla de enzimas.

Acetato de sodio 3M: *Ambion*.

Métodos

5 Tratamiento con PNK y EPAP

1.0 Para 210-200 ng de FPET RNA: Se incubó FEPT RNA en 1X tampón PNK (Tris-HCl 70 mM de pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ditioneitol 5 mM), 1 U/μl de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 1 U/μl de PNK (NEBiolabs, Beverly, MA) a 37°C durante 30 min en un volumen de reacción de 20 μl. Después de tratamiento con PNK, el FPET RNA se poliadeniló directamente por adición a la mezcla de reacción hasta una concentración final; y 1X tampón EPAP (Ambion. Austin, TX), ATP 1 mM, 1,5 U/μl de inhibidor de RNasa y 0,025 U/μl EPAP (Ambion. Austin, TX). La mezcla se incubó a 37°C durante 15 min en un volumen de reacción de 40 μl, y luego a 70°C durante 5 min.

Para 50 ng de FEPT RNA: Los tratamientos con PNK y EPAP fueron idénticos a los anteriores, excepto por los volúmenes de reacción, que se redujeron a escala hasta 5 μl y 10 μl (1/4 de volumen), respectivamente.

Transcripción Inversa del FPET RNA poliadenilado con complejo iniciador T7-oligo dT- perlas magnéticas

1.5 Preparación de los complejos iniciador T7-oligo dT-perlas magnéticas

2.0 Se retiró un recipiente de stock de perlas Dynabeads® MyOne™ Streptavidin (*Dynal*, Biotech, Oslo, Noruega) del almacenamiento a 4°C y se agitó energicamente para resuspender por completo las perlas. Se retiraron perlas de 40 μl (400 μg) a un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml; las perlas se centrifugan en una microcentrífuga de sobremesa (< 5 segundos) para recoger el líquido en el fondo del tubo. Debe evitarse una centrifugación excesiva de los tubos que contienen perlas paramagnéticas, dado que ello hará que las mismas se reduzcan a un sedimento y se agreguen, lo cual puede reducir la eficiencia de las perlas. Los tubos se pusieron en una bandeja magnética MPC-S (*Dynal*, Biotech, Oslo, Noruega) con las charnelas de los tubos orientadas hacia el imán y dejando que las perlas se recojan contra la pared del tubo (~ 2 min). Se abrieron los tubos sin retirarlos de la bandeja; y se pipeteó el sobrenadante. Se retiraron los tubos de la bandeja; se lavaron las perlas por resuspensión en 100 μl de 1X tampón B&W (Tris-HCl 5 mM de pH 7,3, EDTA 0,5 mM, NaCl 1M). Los tubos se centrifugaron brevemente para recoger el líquido, y se pusieron luego en una bandeja de tubos magnética. Se dejó que las perlas se agruparan contra la pared del tubo y se enfrió el sobrenadante como anteriormente; y se repitió el lavado con 1X tampón B&W durante un total de dos lavados. Se retiró el sobrenadante del lavado final, y las perlas se resuspendieron luego en 40 μl de 1X tampón B&W que contenían 25 μM de iniciador Eberwine T7 oligo dT (5'-biotina

GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGTTT

3.0 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'). (SEQ ID NO: 1) La incubación se efectuó a la tem-

peratura ambiente durante 15 min en un termomezclador Eppendorf (850 rpm). Las perlas se suspendieron sobre un imán (~ 2 min); se retiró el sobrenadante y se lavaron dos veces las perlas con 100 μl de 1X tampón B&W. Se resuspendieron las perlas en 80 μl de Tampón de Almacenamiento de Perlas (1X PBS, 70% EtOH) y se guardaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

3.5 Hibridación de perlas T7-oligo dT a FPET RNA poliadenilado

4.0 Para 200-300 ng de FPET RNA: Durante las incubaciones con PNK/EPAP, la solución iniciador-cuenta previamente preparada se retiró del almacenamiento a 4°C. Se sacudió el tubo para resuspender las perlas y se centrifugó brevemente para recoger el líquido. Se pasaron alícuotamente 20 μl (100 μg) de perlas a un tubo de 0,5 ml y el tubo se dispuso sobre un imán durante aproximadamente 2 minutos. Se retiró el sobrenadante; las perlas se lavaron dos veces con 100 μl de 1X tampón B&W. El sobrenadante del lavado final se retiró durante el paso de desactivación de EPAP a 70°C. Después que se hubo completado la incubación a 70°C, el tubo que contenía la reacción con EPAP se centrifugó concienzudamente para recoger el líquido, y los contenidos de la reacción se transfirieron luego a un tubo que contenía el complejo iniciador-perla. Se invirtió el tubo para resuspender las perlas y se centrifugó brevemente; se incubó a la temperatura ambiente en el termomezclador (850 rpm) durante 5 minutos. El tubo se dejó en una bandeja magnética durante aproximadamente 2 minutos; se retiró el sobrenadante.

Para 50 ng de FPET RNA: Lo mismo que anteriormente, excepto que se utilizaron partes alícuotas de 5 μl (25 μg) de perlas.

Síntesis del cDNA de la Primera Cadena

La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando un Kit de Síntesis de la Primera Cadena SuperScript™ para RT-PCR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

5 Para 200-300 ng de FPET RNA: Se lavaron las perlas una sola vez con 100 µl de 1X tampón RT (Tris-HCl 20 mM de pH 8,4, KCl 50 mM). Se resuspendieron las perlas en 20 µl de mezcla de reacción RT constituida por 1X tampón RT, MgCl₂ 5 mM, DTT 10 mM, dNTPs 0,5 mM, 1 U/µl de inhibidor de RNasas, y 10 U/µl de SuperScript II RT, y se incubaron a 42°C en el termomezclador (850 rpm) durante 50 min.

Para 50 ng de FPET RNA: Lo mismo que anteriormente, a excepción que las perlas se resuspendieron en 5 µl de 1X tampón RT.

1.0 Síntesis del cDNA de la Segunda Cadena

1.5 Para 200-300 ng de FPET RNA: La reacción del cDNA de la primera cadena se retiró del termomezclador y se añadieron 130 µl de la mezcla de reacción siguiente de la segunda cadena: 1,15X tampón de segunda cadena, mezcla de dNTP 0,23 mM, 0,077 U/µl de DNA-ligasa, 0,31 U/µl de DNA-polimerasa I y 0,015 U/µl de RNasa H. Se sacude el tubo para mezclar su contenido; y se centrifuga brevemente. Se incuba durante 2 horas a 16°C en el termomezclador (850 rpm).

Para 50 ng de FPET RNA: Lo mismo que anteriormente excepto que se añaden 32,5 µl de la mezcla de reacción de la segunda cadena.

Depuración del DNA de la Segunda Cadena/Transcripción in Vitro

2.0 Para 200-300 ng y para 50 ng de FPET RNA: El tubo de reacción de la segunda cadena se retiró del termomezclador; se centrifugó brevemente y se mantuvo en la bandeja magnética durante aproximadamente 2 minutos. Se retiró el sobrenadante y las perlas se lavaron dos veces con 100 µl de tampón de lavado 1X IVT (Tris 400 mM de pH 7,3, MgCl₂ 70 mM, NaCl 100 mM, espermidina 20 mM).

2.5 Se utilizó el kit MEGAScript-T7 IVT (Ambion, Austin, TX) para la transcripción in vitro. Se resuspenden las perlas en 20 µl de mezcla madre IVT (preparada como se describe por Ambion) y se invirtió el tubo para mezclar el contenido. Se centrifuga brevemente y se incuba a 37°C durante 4 horas en el termomezclador (1000 rpm).

Depuración IVT

Se retiró el tubo del termomezclador; se centrifugó brevemente y se dejó en la bandeja magnética durante aproximadamente 2 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se añadieron los reactivos siguientes por este orden:

3.0 H₂O exenta de nucleasas: 20 µl
 Glucógeno de 5 mg/ml (Ambion): 1 µl
 Acetato de sodio 3M (Ambion): 4 µl
 Etanol 100% (Sigma): 100 µl

3.5 El tubo se agitó enérgicamente y se incubó a -20°C desde 1 hora hasta toda la noche. Se centrifugó el tubo en una centrifuga Eppendorf refrigerada a 14.000 rpm durante 20 min (4°C) para reducir el cRNA a un sedimento. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 µl de solución de etanol al 70% para lavar el sedimento. El tubo se centrifugó en una centrifuga Eppendorf refrigerada a 14.000 rpm durante 3 minutos (4°C). Con una pipeta, se retiró del tubo tanto alcohol como fue posible, y a continuación se dejó el tubo (con el extremo superior abierto) en una vitrina de humos para permitir que se evaporara el alcohol restante (5-10 min). El sedimento de cRNA se resuspendió en 40 µl de H₂O exenta de nucleasas.
 4.0

Análisis del FPET RNA

El RNA se cuantificó utilizando el método de fluorescencia GriboGreen (Molecular Probes). El tamaño del RNA se analizó por electroforesis microcapilar utilizando el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA).

Determinación del perfil de expresión génica TaqMan®

4.5 Las reacciones TaqMan® se efectuaron en reacciones duplicadas de 5 µl constituidas por Mezcla Madre 1X Universal PCR y 1 ng de cRNA. Las concentraciones finales de iniciador y sonda eran 0,9 µM (de cada iniciador) y 0,2 µM, respectivamente. La ciclación PCR se realizó en el equipo ABI Prism® 7900 como sigue: 95°C 10 minutos x 1 ciclo, 95°C 20 segundos, 60°C 45 segundos x 40 ciclos.

Ejemplo 2Eliminación del paso de depuración entre la desfosforilación y la poliadenilación del término 3' del FPET RNA

El término 3' del FPET RNA se trata con polinucleotido-quinasa (PNK) T4 para eliminar los 2',3'-fosfatos cíclicos, los 2'-monofosfatos y 3'-monofosfatos. Estos diversos ésteres fosfato se encuentran típicamente en el resto ribosa 3'-terminal de los RNAs degradados y tienen que eliminarse para asegurar una adición eficiente de poliA al término 3' del FPET RNA.

Como se ha descrito previamente, el paso estándar de desfosforilación con PNK se termina por adición de 20 μ l de H₂O exenta de RNAsas y extracción con 40 μ l de fenol:CHCl₃:IAA (25:24:1), pH 6,6 (Ambion, Inc., Austin, TX). Después de centrifugación a 14.000 x g durante 1-2 min, se retira la fase acuosa, se pasa a través de una columna CHROMA SPIN™ DEPC-H₂O 30 y se reduce su volumen a 12,5 μ l utilizando un vacío Savant Speed. El RNA está ahora listo para la reacción estándar de poliadenilación con EPAP en un volumen de 20 μ l.

Para perfeccionar el método, los autores de la invención probaron varias modificaciones del procedimiento, como se muestra en la Figura 2. A continuación de la reacción PNK utilizando 1000 ng de FPET RNA de cáncer de mama (Clinomics), se testaron seis condiciones de depuración antes de la poliadenilación con EPAP. La condición de depuración 1 es esencialmente la misma que el protocolo estándar expuesto anteriormente, pero omitiendo el paso de reducción de volumen de la muestra (Speed-Vac). Esto da como resultado un mayor volumen de muestra y por tanto requería un aumento en el volumen de la reacción final EPAP (40 μ l). El volumen de reacción de 40 μ l se mantuvo constante para la totalidad de las cinco condiciones de depuración como se muestra en la Figura 14. El análisis por electroforesis microcapilar (Figura 14, panel izquierdo) de los RNAs poliadenilados en las cinco condiciones de depuración modificadas indicaba que, por término medio, se añadían 50-140 adenilatos a los RNAs con relación al material de partida (SM), que tenía un tamaño medio de 90 nucleótidos (nt). Por ejemplo, para la condición 1; 150-90 = 60 adenilatos. Estos resultados indican que la totalidad de las cinco condiciones producían FPET RNA poliadenilado de tamaño aceptable. Es interesante que el porcentaje de RNA recuperado después del paso de depuración EPAP indicaba que las cinco condiciones de depuración PNK eran mejores que el método estándar, condición 6 (Figura 14, lado inferior derecho). Adicionalmente, la condición exenta de depuración (5) proporcionaba el rendimiento máximo. El porcentaje de recuperación se refiere al RNA de entrada y en algunos casos es mayor que 100% debido a un aumento de peso por la poliadenilación. Para evaluar ulteriormente la calidad de los RNAs poliadenilados, se llevaron cuatro muestras a lo largo del resto del proceso IVT estándar y se determinó el perfil de expresión por TaqMan® RT-PCR como se reseña en la solicitud de patente anterior de los mismos inventores (39740.0003PR). La Figura 15 muestra un perfil de paneles de 47 genes de los RNAs amplificados para las condiciones 2-5. Todos los perfiles exhibían una concordancia alta ($R \geq 0,91$) con el RNA sin amplificar (SM) y el RNA estándar tratado (condición 6). La condición 5, exenta de depuración, daba el Ct mínimo medio (36,0) y el rendimiento IVT máximo (95,8 μ g), por lo que se adoptó como el procedimiento estándar para el tratamiento EPAP (paso 2, Figura 13).

Ejemplo 3Hibridación de FPET RNA poliadenilado a perlas promotor T7-oligo dT, síntesis del cDNA de la segunda cadena e IVT

Otra mejora del método estándar de la presente invención incluye la hibridación del FPET RNA poliadenilado a iniciadores promotor T7-oligo dT que están conjugados a perlas magnéticas de poliestireno. Esto permite que todos los pasos enzimáticos subsiguientes se realicen fácilmente sobre un soporte sólido con pasos de depuración mínimos. Por ejemplo, elimina la necesidad de extracciones con fenol-CHCl₃ y la cromatografía centrífuga en columna entre las reacciones. El uso de perlas se presta también por sí mismo a un proceso automático, lo que podría aumentar notablemente la capacidad. Adicionalmente, bibliotecas de cDNA archivadas y conjugadas a perlas pueden reamplificarse fácilmente para producir cRNA adicional. La Figura 16 muestra el perfil de expresión de 47 genes para cRNAs placentarios generados por la solución estándar, el método IVT no basado en perlas (IVT exenta) y el cRNA generado por el método IVT en fase sólida basado en perlas (IVT en fase sólida) reseñado en la Figura 13. Para comparación, se muestra también FPET RNA placentario no amplificado (SM). De nuevo, ambos procesos IVT proporcionaban cRNA que exhibía una concordancia alta con el RNA sin tratar ($R > 0,94$). Aunque el método IVT tradicional no basado en perlas producía 1,74 veces más cRNA que el método IVT basado en perlas, el Ct medio era 0,74 mayor. Cuando las cantidades de RNA se ajustan para proporcionar el mismo Ct medio como el material de partida RNA, los rendimientos relativos (Ct ajustado) son aproximadamente iguales (21,66 frente a 20,79). Por tanto, el método IVT basado en perlas es casi tan eficiente como el método no basado en perlas en términos de amplificación y fidelidad. Aunque ambos métodos IVT no alcanzan el mismo nivel de sensibilidad RT-PCR (Ct med./masa de RNA) como material de partida cuando se utilizan cantidades equivalentes de RNA (1 ng/pocillo), los mismos alcanzan todavía una amplificación de 100 veces del RNA después de ajuste por la pérdida de sensibilidad.

Ejemplo 4Una comparación de la amplificación de RNA utilizando 50 ng y 200 ng de FPET RNA

Las muestras de FPET archivadas con historias clínicas son extremadamente valiosas para estudios clínicos retrospectivos. Como tales, es difícil a menudo tener más de 1 ó 2 secciones FPET de 5 micrómetros por paciente pro-

cedentes de colaboradores clínicos para los estudios. Por tanto, existe la necesidad de optimizar la amplificación IVT del FPET RNA partiendo de menos de 1 microgramo de RNA y preferiblemente menos de 100 ng de RNA. La Figura 17 muestra el perfil de expresión de 200 ng de 47 genes (condición 1) y 50 ng (condiciones 2 y 3) de FPET RNA amplificado por el protocolo basado en perlas. Para la primera amplificación de RNA de 50 ng (condición 2), la relación de RNA a masa de perlas y los volúmenes de reacción de cada paso eran idénticos a la amplificación estándar de 200 ng de RNA. Para la segunda amplificación de RNA de 50 ng (condición 3), la relación de RNA a masa de perlas era idéntica, pero los volúmenes de reacción se redujeron proporcionalmente a escala hasta $\frac{1}{4}$ de su volumen. Ambas amplificaciones de 50 ng de RNA produjeron aproximadamente la misma cantidad de cRNA, aunque 10 veces menos que la amplificación de 200 ng de RNA. Si se esperara un rendimiento 4 veces menor a partir de las reacciones de 50 ng, dado que se partía con $\frac{1}{4}$ de la cantidad de FPET RNA, entonces se tiene todavía una pérdida de eficiencia de 2,5 veces no justificada cuando se reduce a escala nuestra amplificación desde 200 ng a 50 ng de FPET RNA. No obstante, ambos perfiles de expresión derivados de la amplificación de 50 ng exhiben todavía una fuerte correlación con la amplificación de 200 ng de RNA ($R \geq 0,97$). Asimismo, el Ct medio para la amplificación escalada en volumen de 50 ng (condición 3) era equivalente a la amplificación de 200 ng de RNA. Por esta razón, se adoptó la versión a escala reducida ($\frac{1}{4}$ vol) como el procedimiento de amplificación para 50 ng de FPET RNA.

Ejemplo 5

Una comparación de una amplificación secundaria utilizando 50 ng y 200 nanogramos de FPET RNA

Como se ha mencionado previamente, una ventaja adicional del archivo de bibliotecas de cDNA FPET en perlas es que las mismas pueden reamplificarse fácilmente. Como ejemplo de una IVT secundaria, perlas archivadas que contenían cDNA conjugado procedente del experimento anterior se lavaron una sola vez, se resuspendieron en tampón IVT y se amplificaron de acuerdo con el protocolo IVT original. La Figura 17B muestra los resultados de este experimento. Una vez más, ambas amplificaciones de 50 ng de RNA proporcionaron aproximadamente la misma cantidad de cRNA, aunque 10 veces menos que la amplificación de 200 ng de RNA. Adicionalmente, las tres amplificaciones secundarias proporcionaban aproximadamente $\frac{1}{3}$ del RNA proporcionado por sus correspondientes amplificaciones primarias. Se mantuvo un alto nivel de fidelidad entre las tres amplificaciones secundarias ($R \geq 0,95$). Las amplificaciones primaria y secundaria para cada condición individual mantenían también un alto nivel de concordancia ($R \geq 0,97$). Los perfiles de expresión para las IVTs primarias y secundarias de la condición 3 (FRA- $\frac{1}{4}$ vol: 50 ng/25 μ g) se muestran en la Figura 17C.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de procesamiento de RNA fragmentado que comprende una multiplicidad de especies de RNA obtenidas de una muestra de tejido fijada e incrustada en parafina para análisis de la expresión génica, que comprende los pasos de:
- 5 (a) poliadenilación del RNA fragmentado, y
- (b) conversión del RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) en cDNA.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que el tamaño de las especies de RNA en el RNA fragmentado está comprendido entre aproximadamente 20 bases y aproximadamente 2000 bases; en particular, en el que el tamaño medio de las especies de RNA contenidas en el RNA fragmentado está comprendido entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300 bases.
- 10 3.- El método de la reivindicación 1, en el que la poliadenilación se efectúa con poliA-polimerasa de *E. coli*.
- 4.- El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente el paso de desbloquear los términos 3' de las especies de RNA fragmentado antes del paso (a) con un agente desbloqueante.
- 15 5.- El método de la reivindicación 4, en el que dicho agente desbloqueante es una enzima fosfatasa, en particular, en el que dicha fosfatasa se selecciona del grupo constituido por fosfatasa alcalina de ternero (CIP), fosfatasa alcalina bacteriana, fosfatasa alcalina de camarón, y variantes de las mismas; o, en el que dicho agente desbloqueante es una polinucleotido-quinasa (PNK), o una variante de la misma, en particular, en el que dicha polinucleotido-quinasa es polinucleotido-quinasa T4 (T4 PNK), o una variante de la misma.
- 20 6.- El método de la reivindicación 4, en el que dicho agente desbloqueante se elimina antes de realizar el paso de poliadenilación (a); o, en el que el paso de poliadenilación (a) se realiza sin eliminación previa del agente desbloqueante, en particular, en el que dicho agente desbloqueante es una polinucleotido-quinasa (PNK).
- 7.- El método de la reivindicación 1, en el que el RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) se convierte en cDNA por tratamiento con una transcriptasa inversa e iniciadores oligo-dT.
- 25 8.- El método de la reivindicación 7, en el que dicha transcriptasa inversa se selecciona del grupo constituido por transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT), transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), y transcriptasas inversas recombinantes heterodímeras expresadas en *E. coli*.
- 9.- El método de la reivindicación 8, en el que dichos iniciadores oligo-dT contienen una secuencia promotora de RNA-polimerasa, en particular, en el que dicho promotor es un promotor de RNA-polimerasa T7.
- 30 10.- El método de la reivindicación 7, en el que dicho RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) se inmoviliza antes de la conversión en cDNA; en particular, en el que dicha inmovilización se realiza sobre perlas; más particularmente, en el que el RNA poliadenilado fragmentado inmovilizado se enriquece antes de la conversión en cDNA; de modo muy particular, en el que el enriquecimiento comprende eliminación de secuencias de rRNA por hibridación a oligonucleótidos de rRNA complementario inmovilizados en perlas.
- 35 11.- El método de la reivindicación 7, en el que dicha muestra de tejido procede de un tumor, más particularmente, en el que dicho tumor es cáncer; muy particularmente, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, y cáncer de cerebro.
- 40 12.- El método de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente el paso de (c) amplificación por PCR utilizando una o más especies de cDNA presentes en el cDNA obtenido en el paso (b) como molde; particularmente, en el que la amplificación PCR comprende 40 ciclos, y los cinco primeros ciclos se llevan a cabo a una temperatura de reasociación/extensión más baja, en particular, en el que los dos primeros ciclos se realizan a una temperatura de reasociación/extensión más baja; o, en el que la amplificación PCR comprende 40 ciclos, y los primeros dos a cinco ciclos se realizan a una temperatura de aproximadamente 40°C a 58°C, en particular, en el que dichos ciclos iniciales se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 50°C.
- 45 13.- El método de la reivindicación 9 que comprende adicionalmente los pasos de:
- (d) conversión del cDNA obtenido en el paso (b) en DNA bicatenario; y
- (e) amplificación del RNA por sometimiento del DNA bicatenario obtenido en el paso (d) a transcripción in vitro con una RNA-polimerasa para obtener RNA complementario (cRNA) amplificado.
- 50 14.- El método de la reivindicación 13, en el que en el paso (d) cDNA se convierte en DNA bicatenario utilizando RNasa H y DNA-polimerasa I.

15.- El método de la reivindicación 13, en el que el cRNA amplificado del paso (e) se utiliza directamente como molde en un ensayo de determinación del perfil de expresión génica por RT-PCR.

16.- El método de la reivindicación 13, en el que el paso (e) incluye marcación del cRNA amplificado con un marcador detectable; en particular, en el que el marcador detectable es biotina o un marcador fluorescente.

5 17.- El método de la reivindicación 13, que comprende someter el cRNA amplificado obtenido en el paso (e) a hibridación en una microrred.

18.- El método de la reivindicación 1, en el que el RNA poliadenilado fragmentado obtenido en el paso (a) se convierte en cDNA por tratamiento con una transcriptasa inversa e iniciadores inversos extendidos, y el cDNA obtenido se amplifica por PCR utilizando iniciadores PCR directos e inversos no extendidos y sondas, diseñados sobre la base de amplicones diana.

10

19.- El método de la reivindicación 18, en el que los iniciadores inversos extendidos se extienden 10, en particular 20, más particularmente 30 bases adicionales en el amplicón que el iniciador PCR inverso específico del gen.

20.- El método de la reivindicación 18, en el que los iniciadores inversos extendidos se extienden en el amplicón dentro de una base del iniciador PCR directo.

15 21.- Un método de procesamiento RNA que comprende una multiplicidad de especies de RNA obtenidas de una muestra de tejido fijada e incrustada en parafina para análisis de la expresión génica, que comprende los pasos de:

(a) poliadenilación de dicho RNA; y

(b) conversión del RNA poliadenilado en cDNA por transcriptasa inversa e iniciadores oligo dT u oligo dT-T7.

22.- El método de la reivindicación 21, en el que dicho RNA comprende especies de RNA con términos 3' bloqueados; comprendiendo en particular desbloquear dichas especies de RNA bloqueadas antes del paso (a).

20

23.- El método de la reivindicación 21 que comprende adicionalmente el paso de utilizar el cDNA cebado con oligo dT directamente para análisis de la expresión génica; en particular, en el que dicho análisis de la expresión génica se efectúa por TaqMan®.

24.- El método de la reivindicación 21 que comprende adicionalmente el paso de conversión del cDNA cebado con oligo dT-T7 en DNA bicatenario con DNA-polimerasa I y RNAsa H, y amplificación del DNA bicatenario con RNA-polimerasa T7 y rNTPs; o que comprende adicionalmente el paso de conversión del cDNA cebado con oligo dT-T7 en DNA bicatenario, y amplificación del DNA bicatenario con RNA-polimerasa T7 y rNTPs biotinilados.

25

25.- Un método de procesamiento de RNA que comprende una multiplicidad de especies de RNA obtenidas de una muestra de tejido fijada e incrustada en parafina para análisis de la expresión génica, que comprende los pasos de:

30 (a) poliadenilación de dicho RNA; y

(b) conversión del RNA poliadenilado en cDNA por medio de transcriptasa inversa e iniciadores oligo dT-T7 que contienen un promotor de RNA-polimerasa T7; y

(c) sometimiento del DNA bicatenario obtenido en el paso (b) a transcripción *in vitro* con una RNA-polimerasa T7 para obtener RNA complementario (cRNA) amplificado.

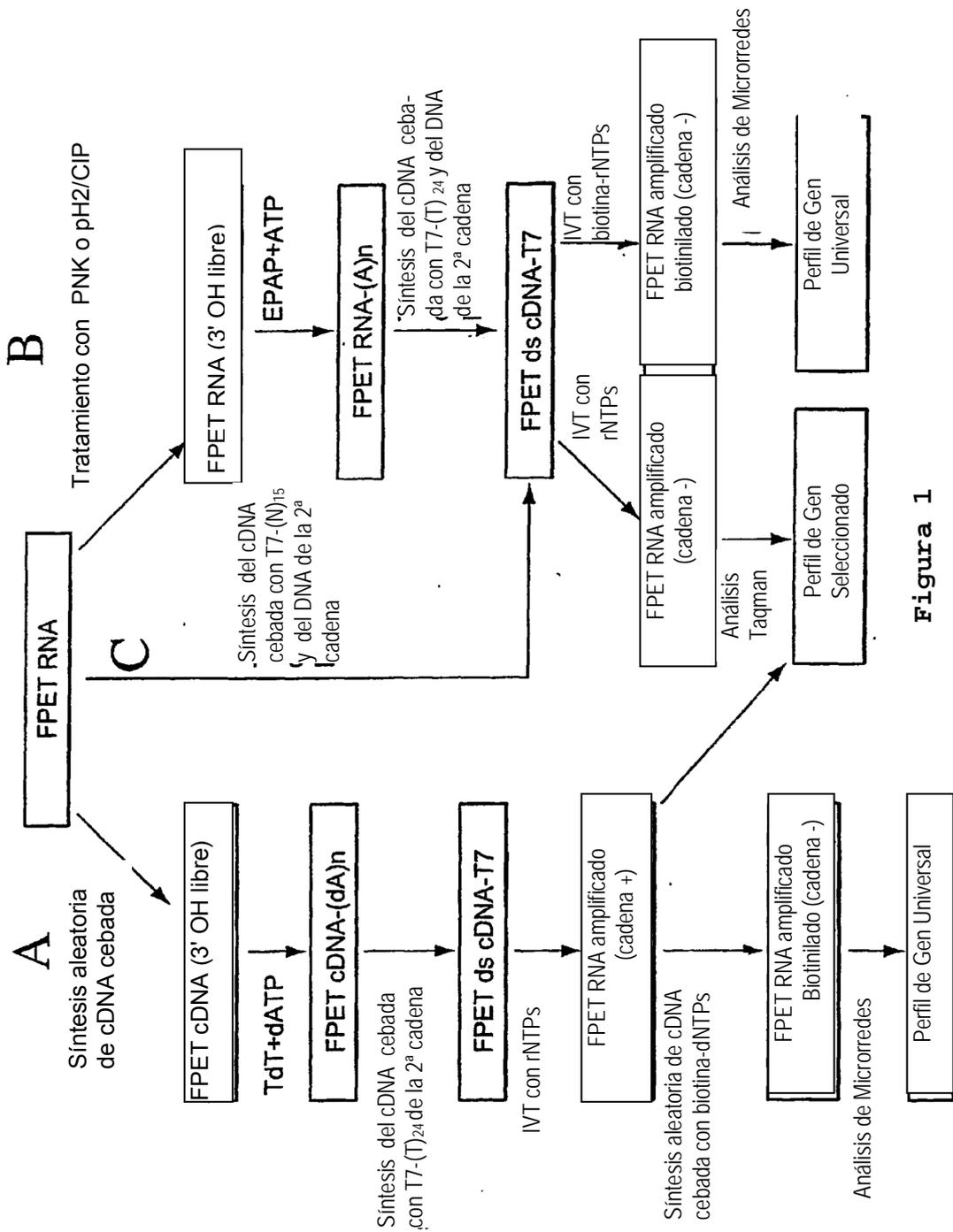


Figura 1

FPE RNA de 12 Pacientes de Cáncer de Mama

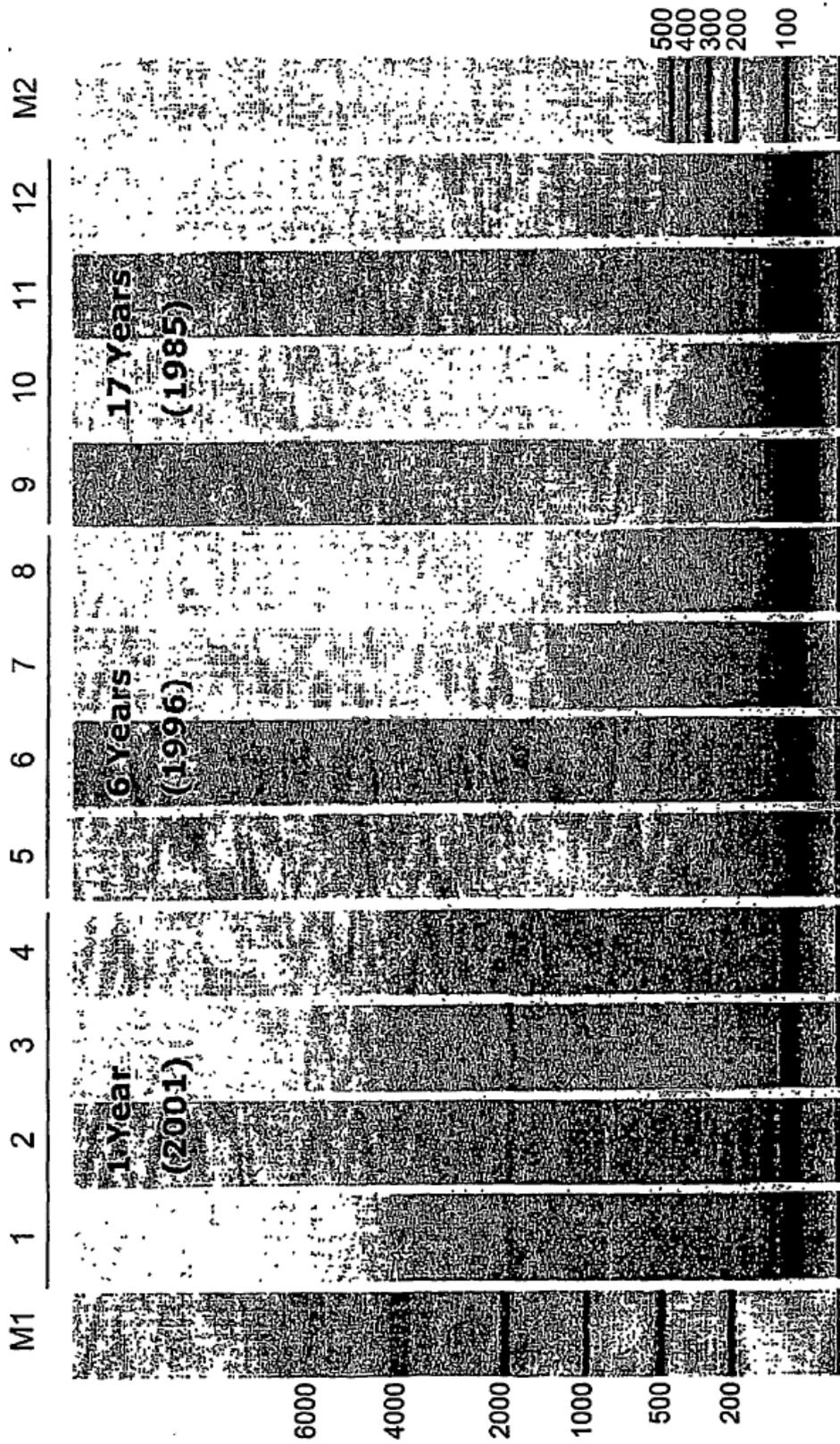


Figura 2

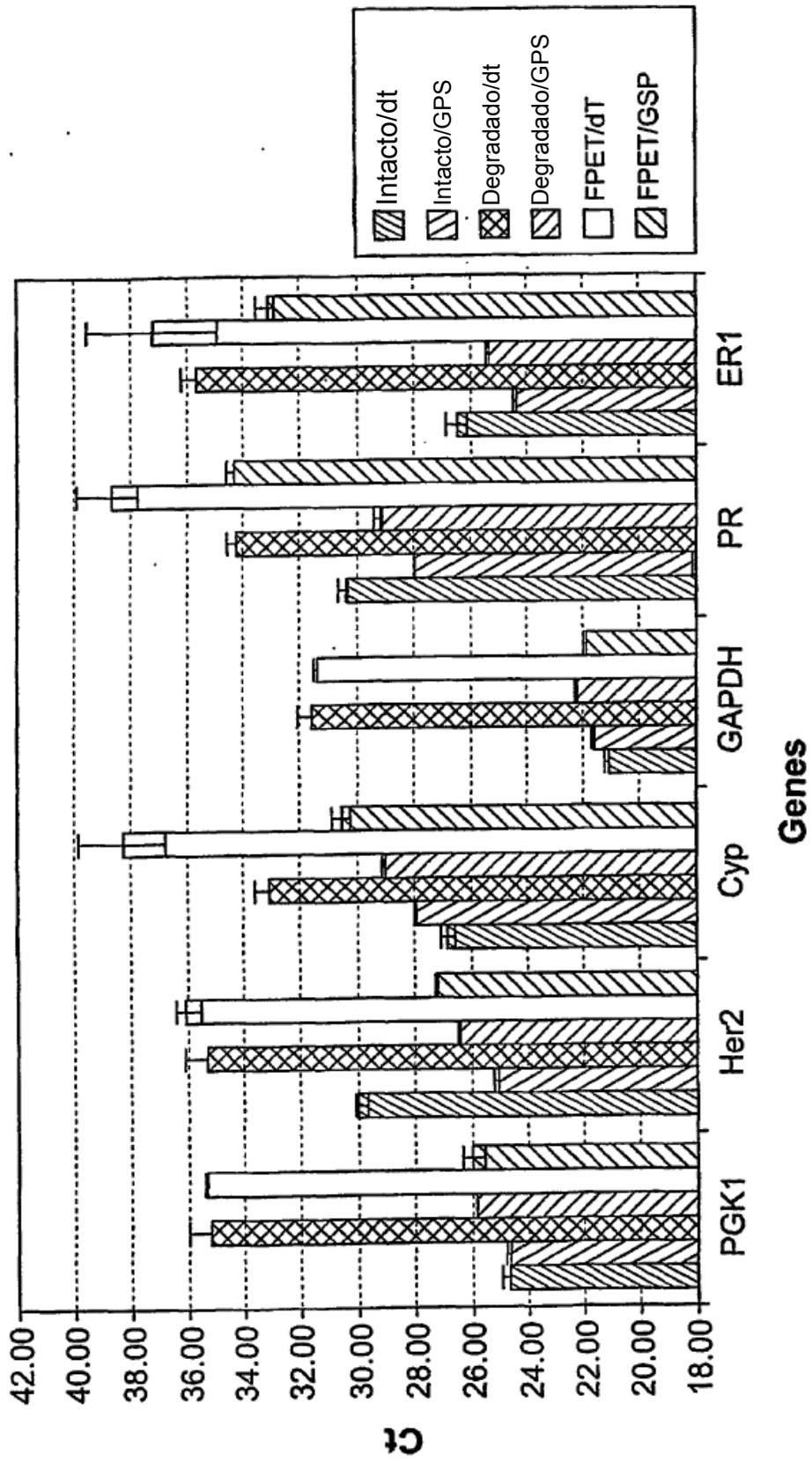


Figura 3

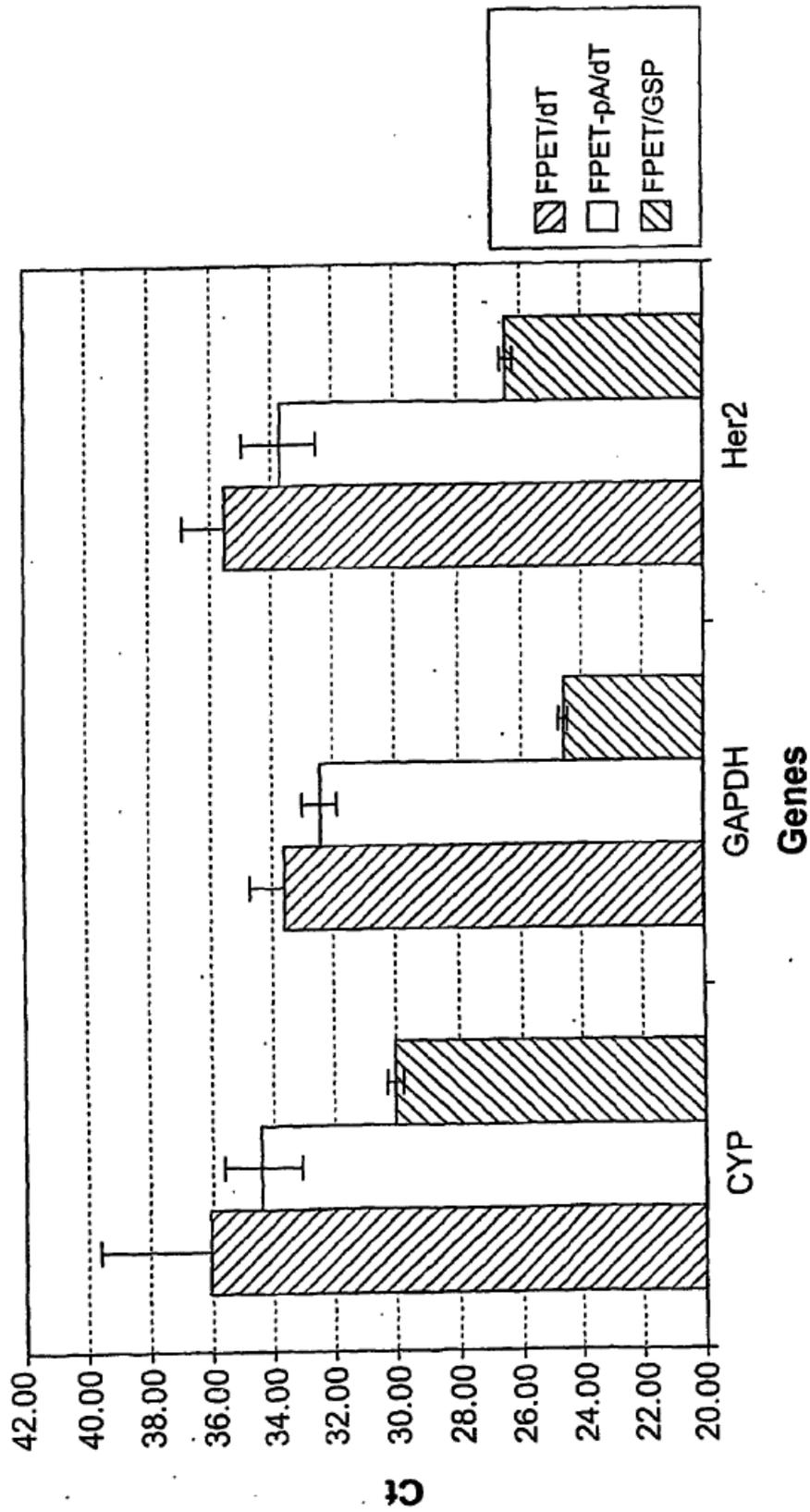


Figura 4

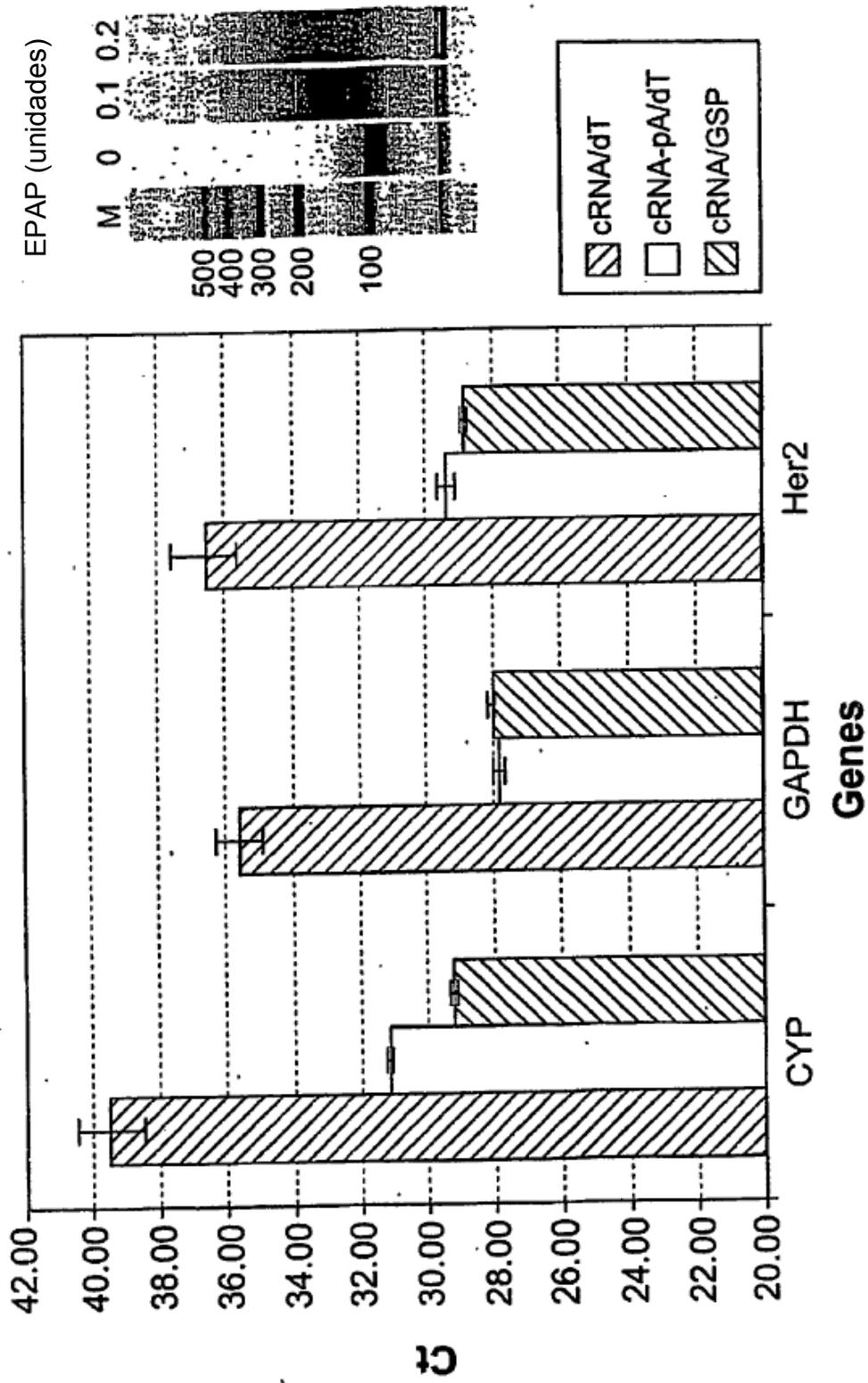


Figura 5

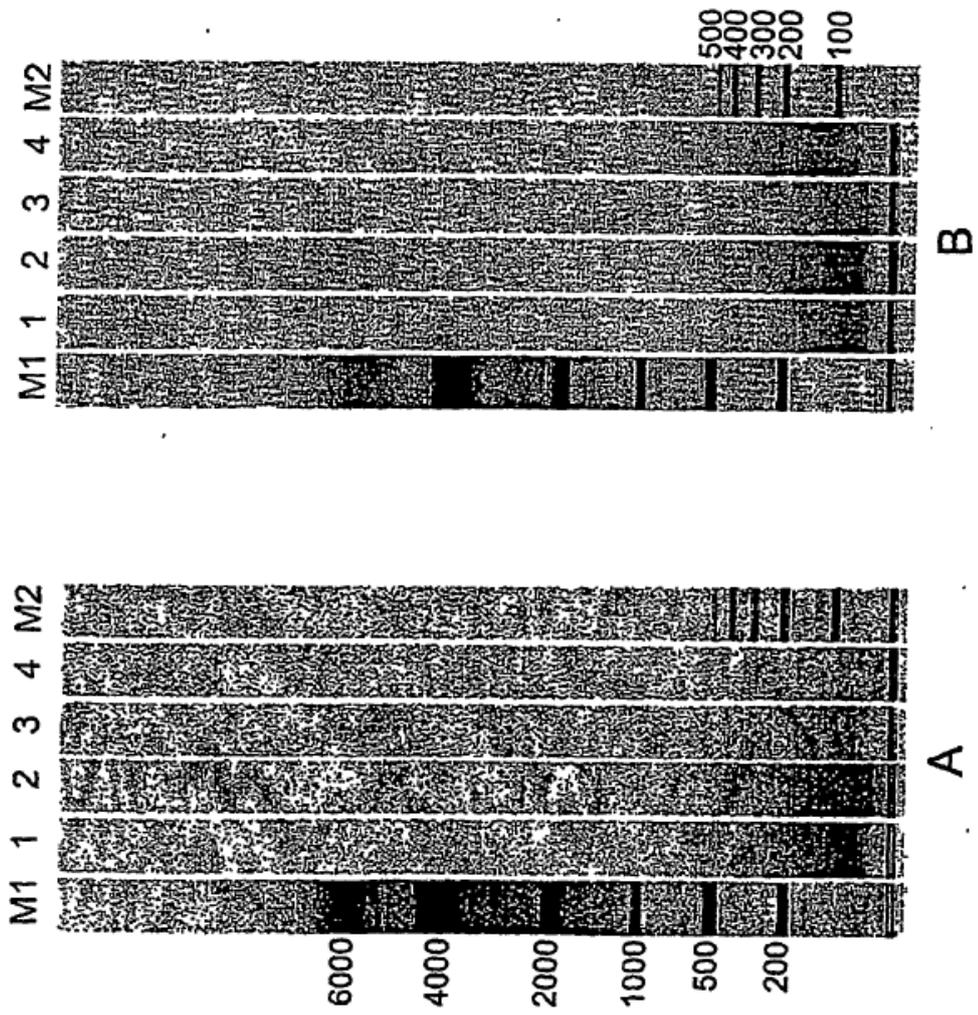


Figura 6

Cebado de la Primera Cadena con Oligo-dT vs.
GSP del FPET RNA Tratado con PNK/EPAP

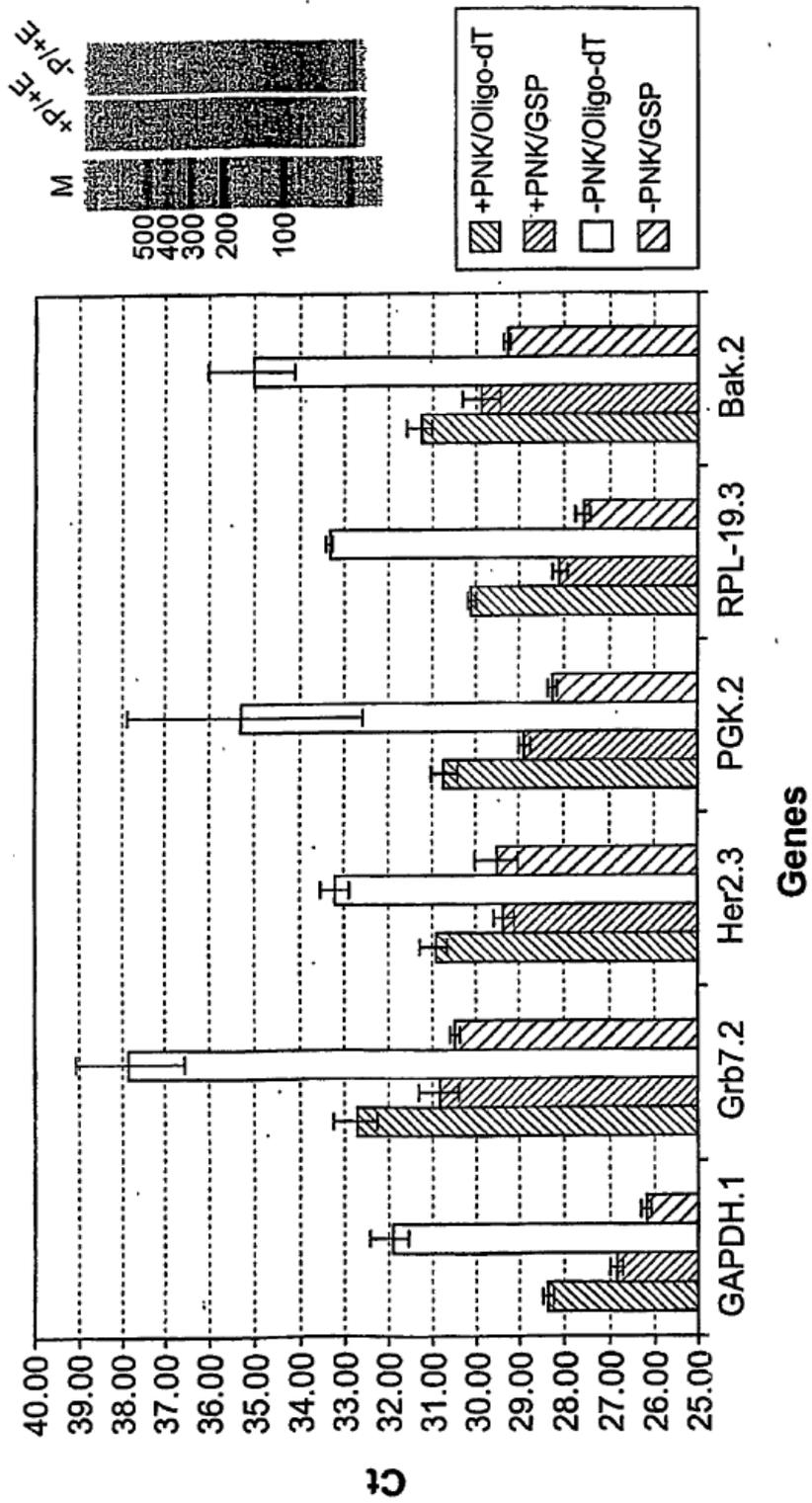


Figura 7

Cebado de la Primera Cadena con Oligo-dT vs. GSP del
FPET RNA Tratado con CIP/EPAP

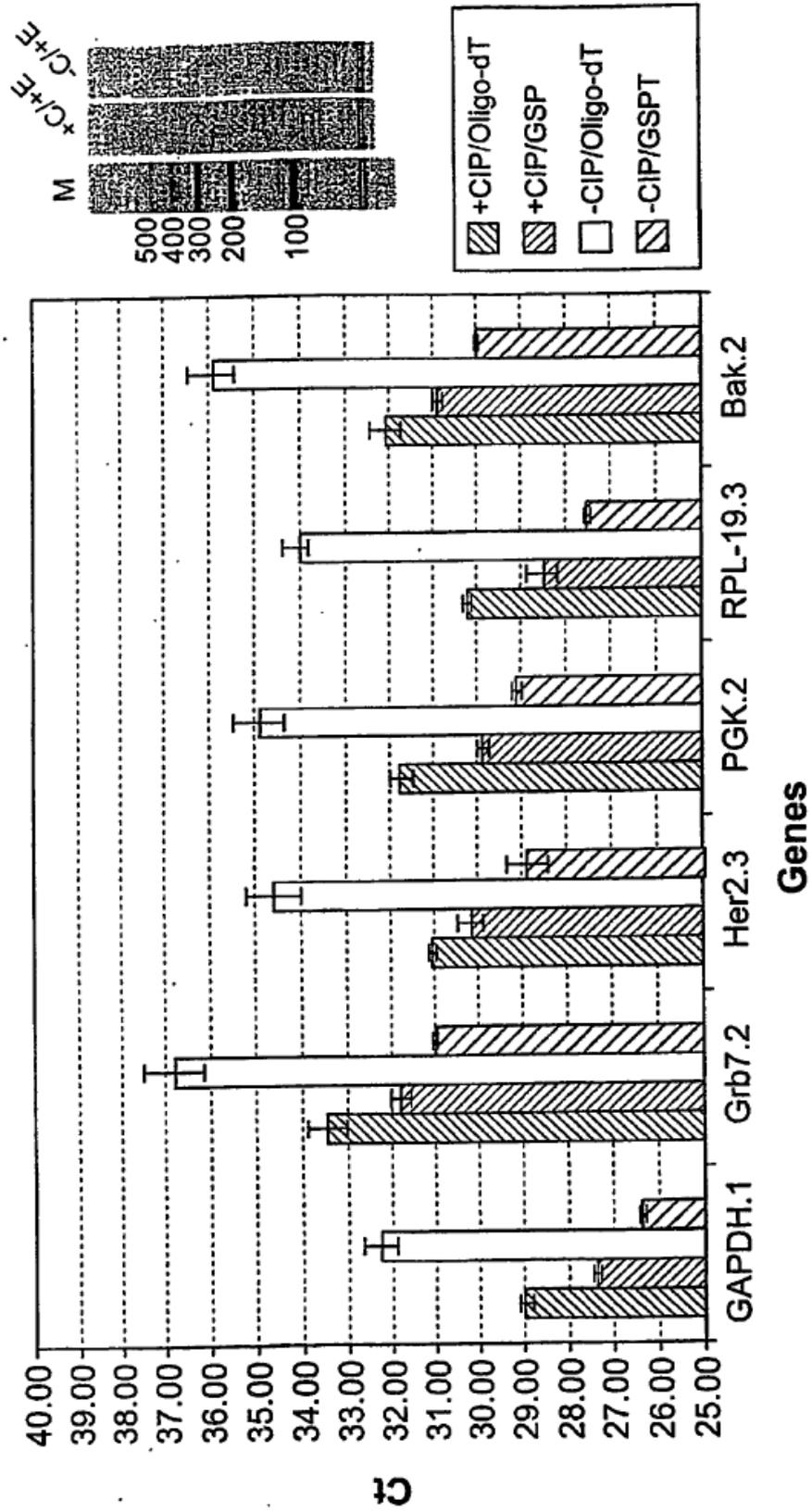


Figura 8

FPET RNA con o sin Poli-Adenilación. Fase Providence II (Genes 1-24)

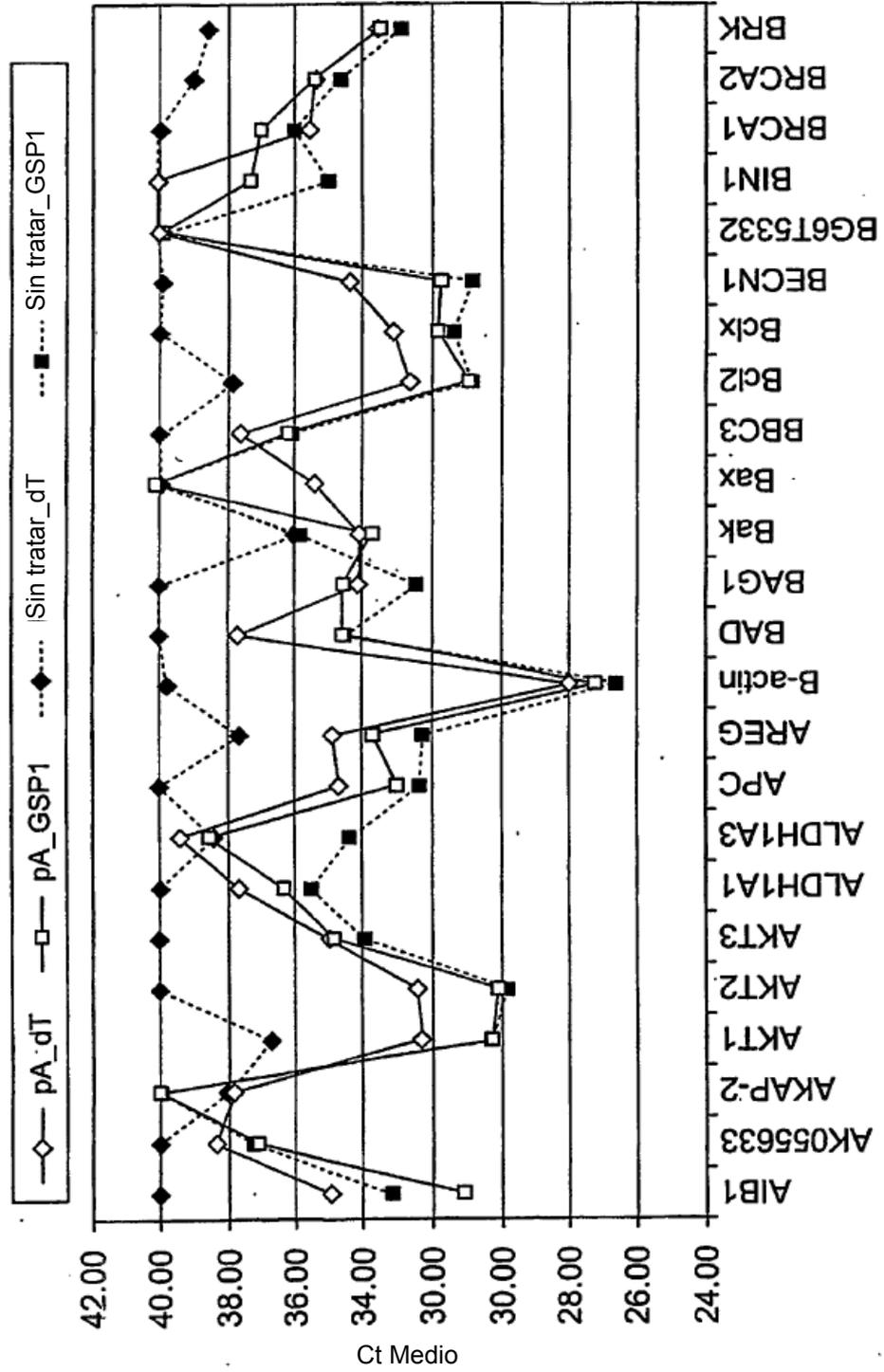


Figura 9A

FPET RNA con o sin Poli-Adenilación. Fase Providence II (Genes 25-48)

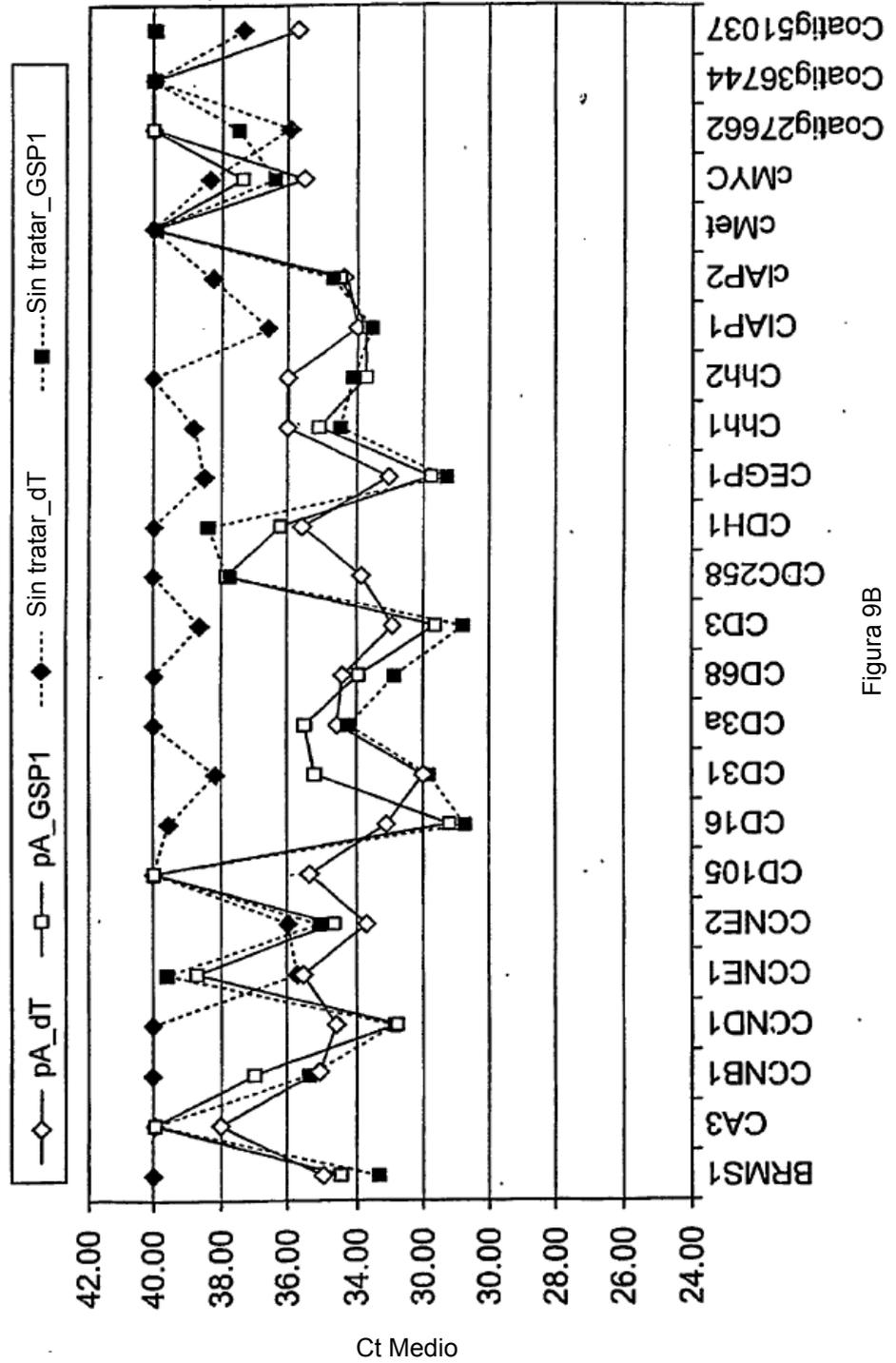


Figura 9B

FPET RNA con o sin Poli-Adenilación. Fase Providence II (Genes 49-72)

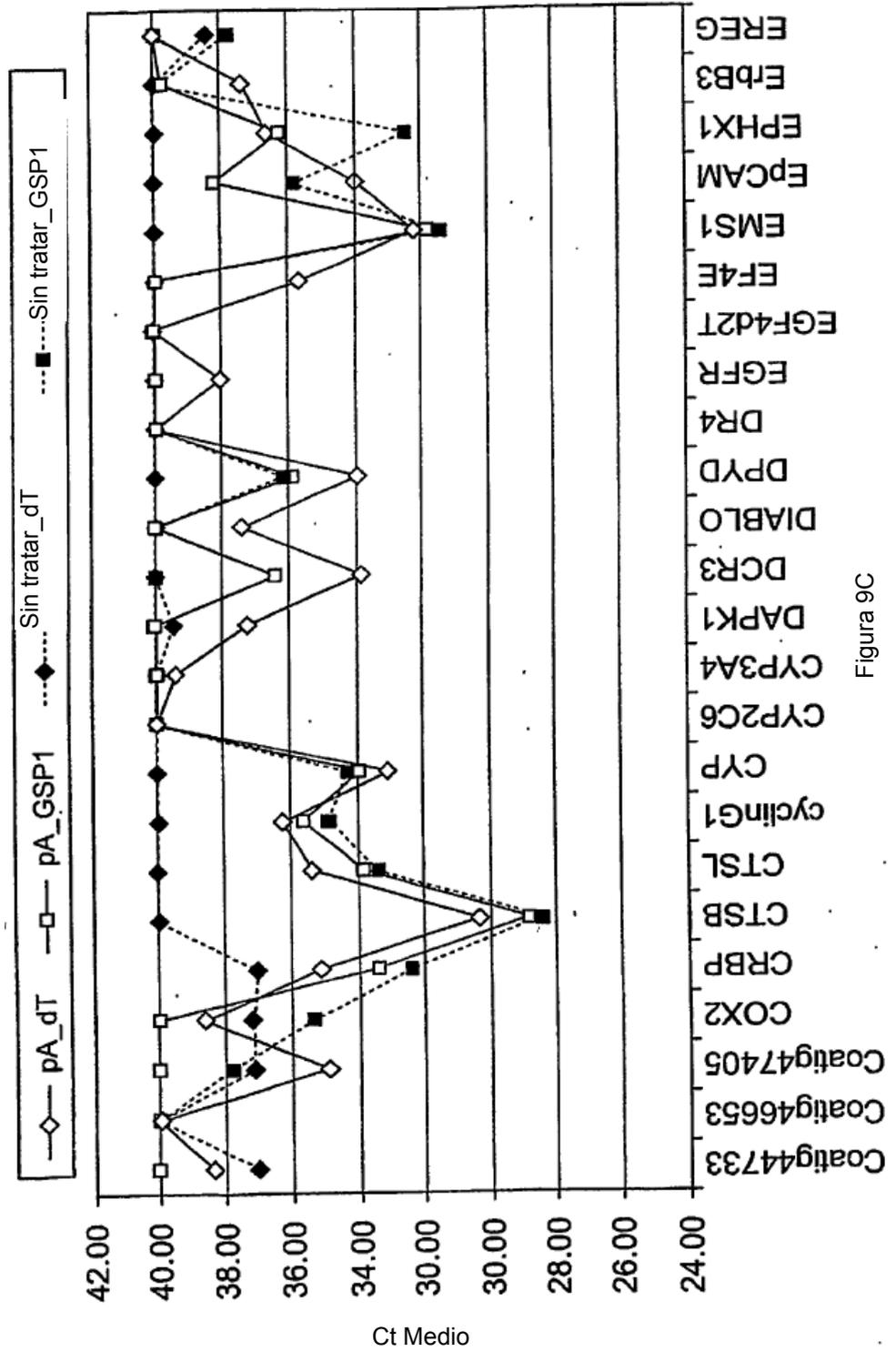


Figura 9C

FPET RNA con o sin Poli-Adenilación. Fase Providence II (Genes 73-96)

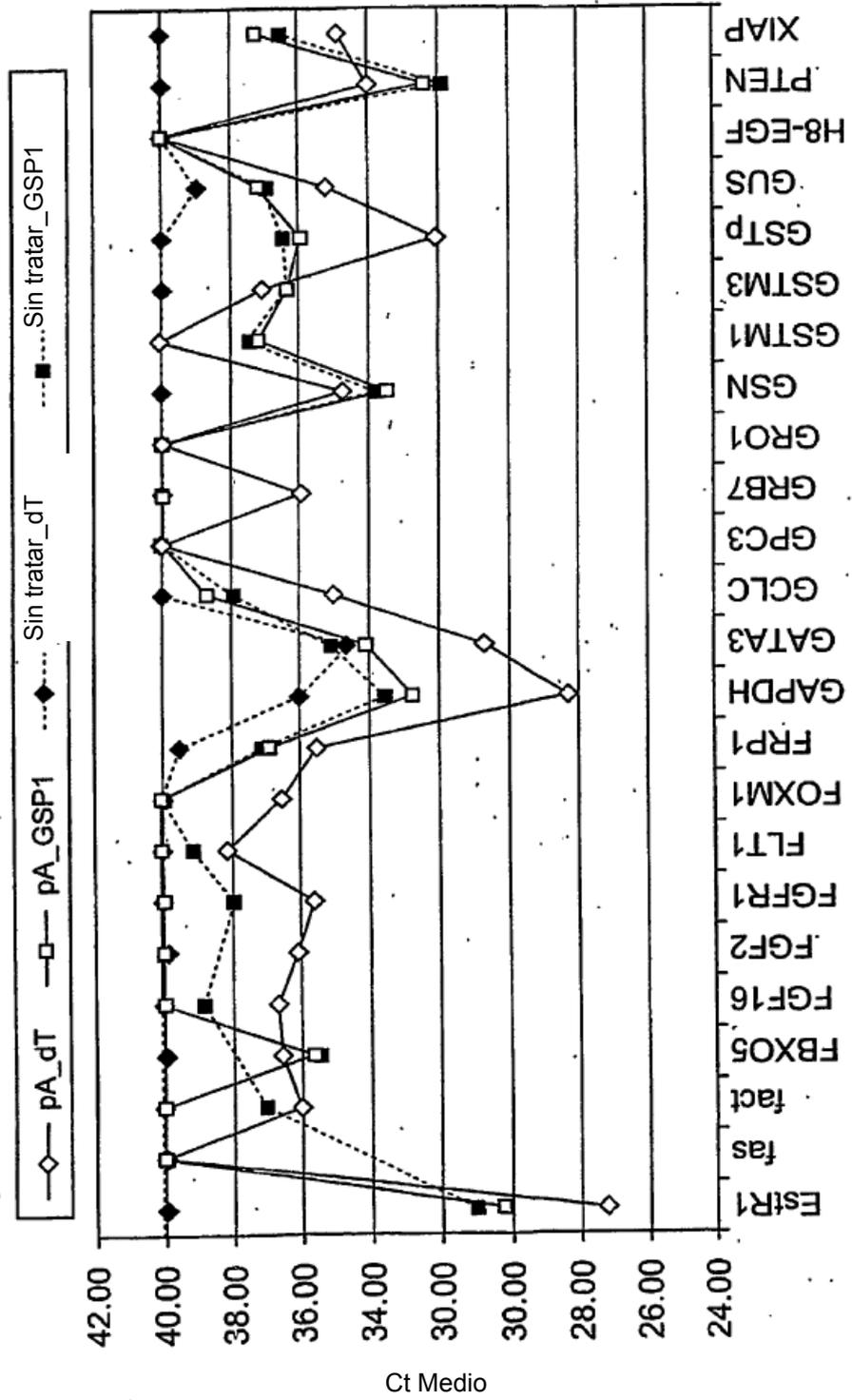
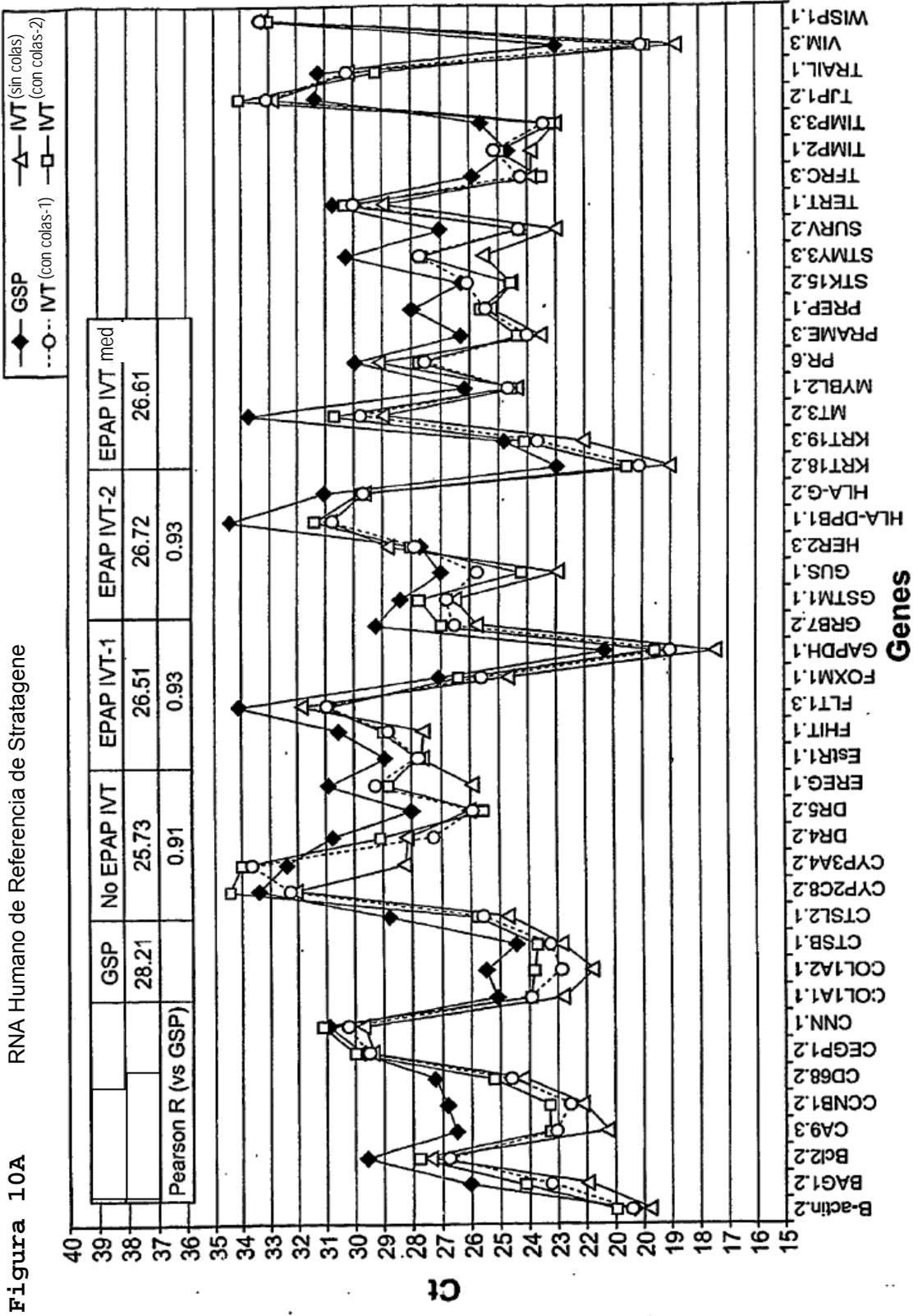
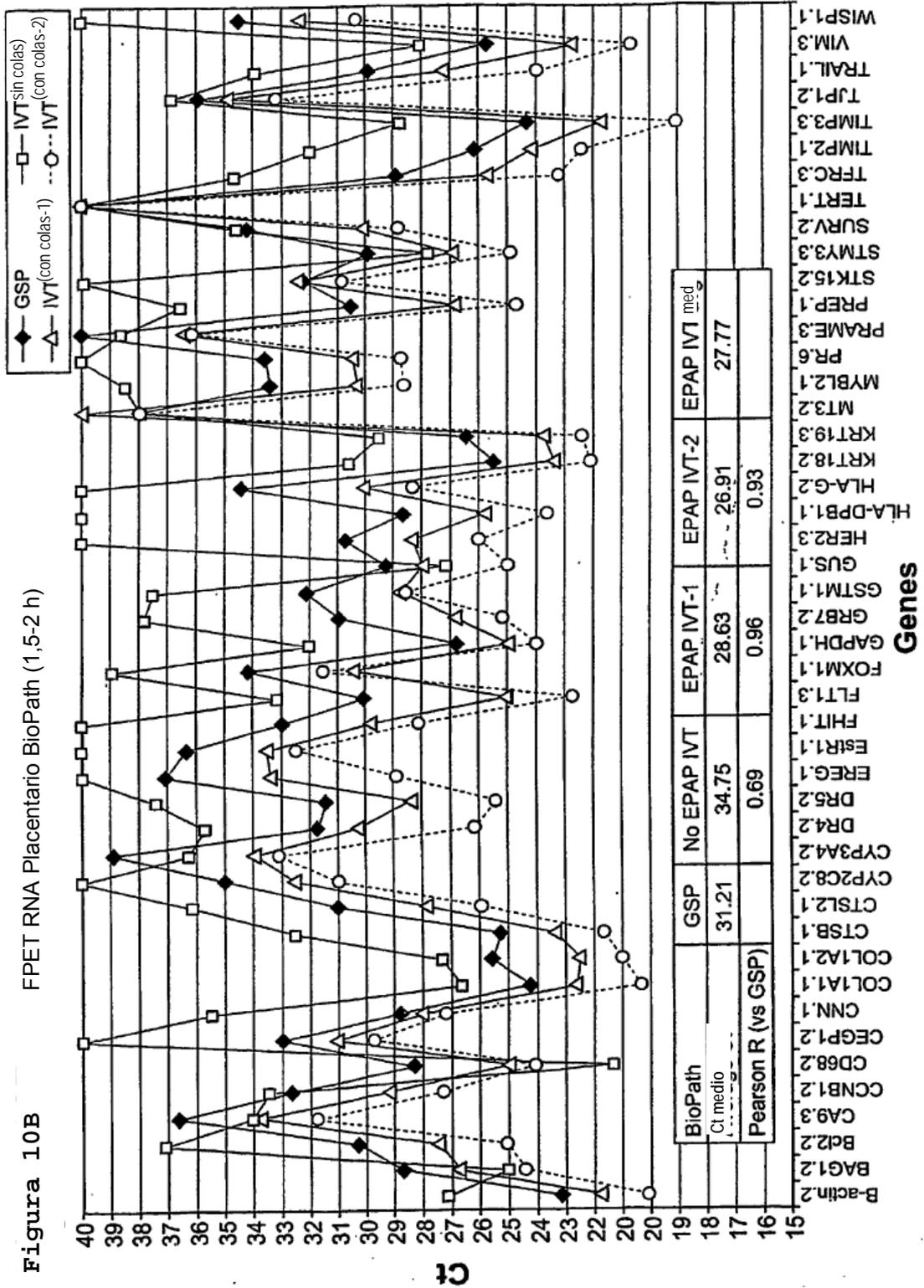
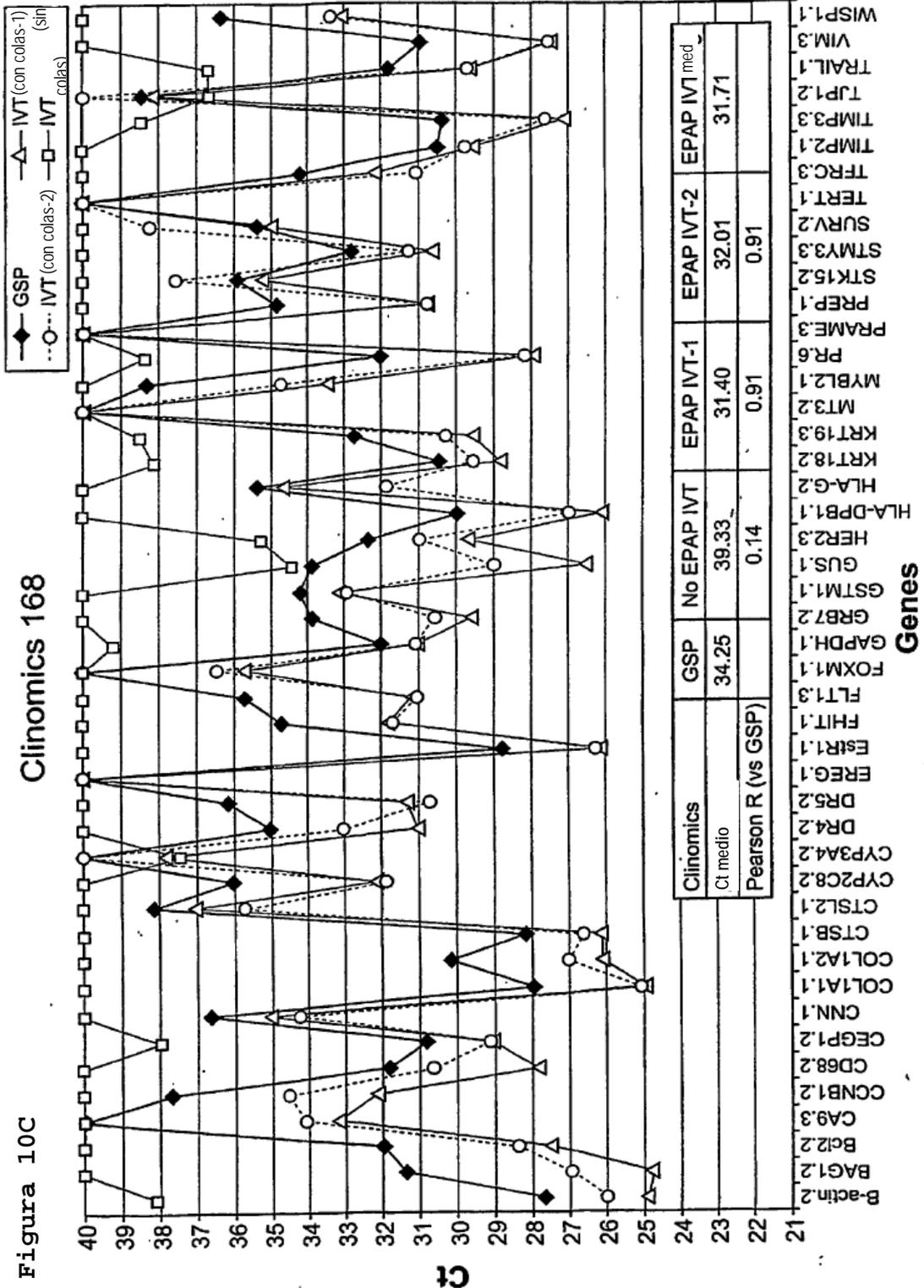


Figura 9D







Transcripción Inversa con Iniciadores Extendidos

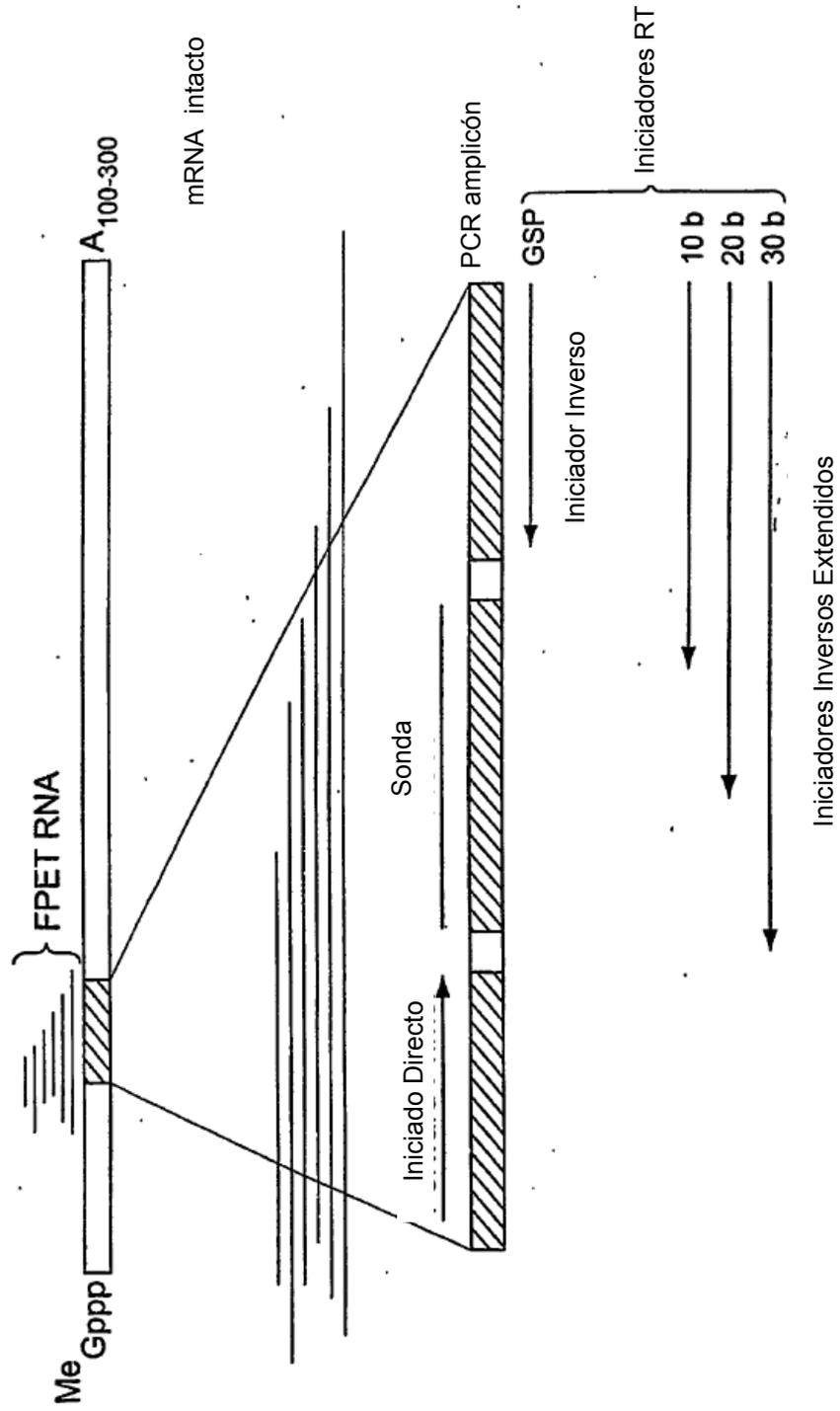


Figura 11

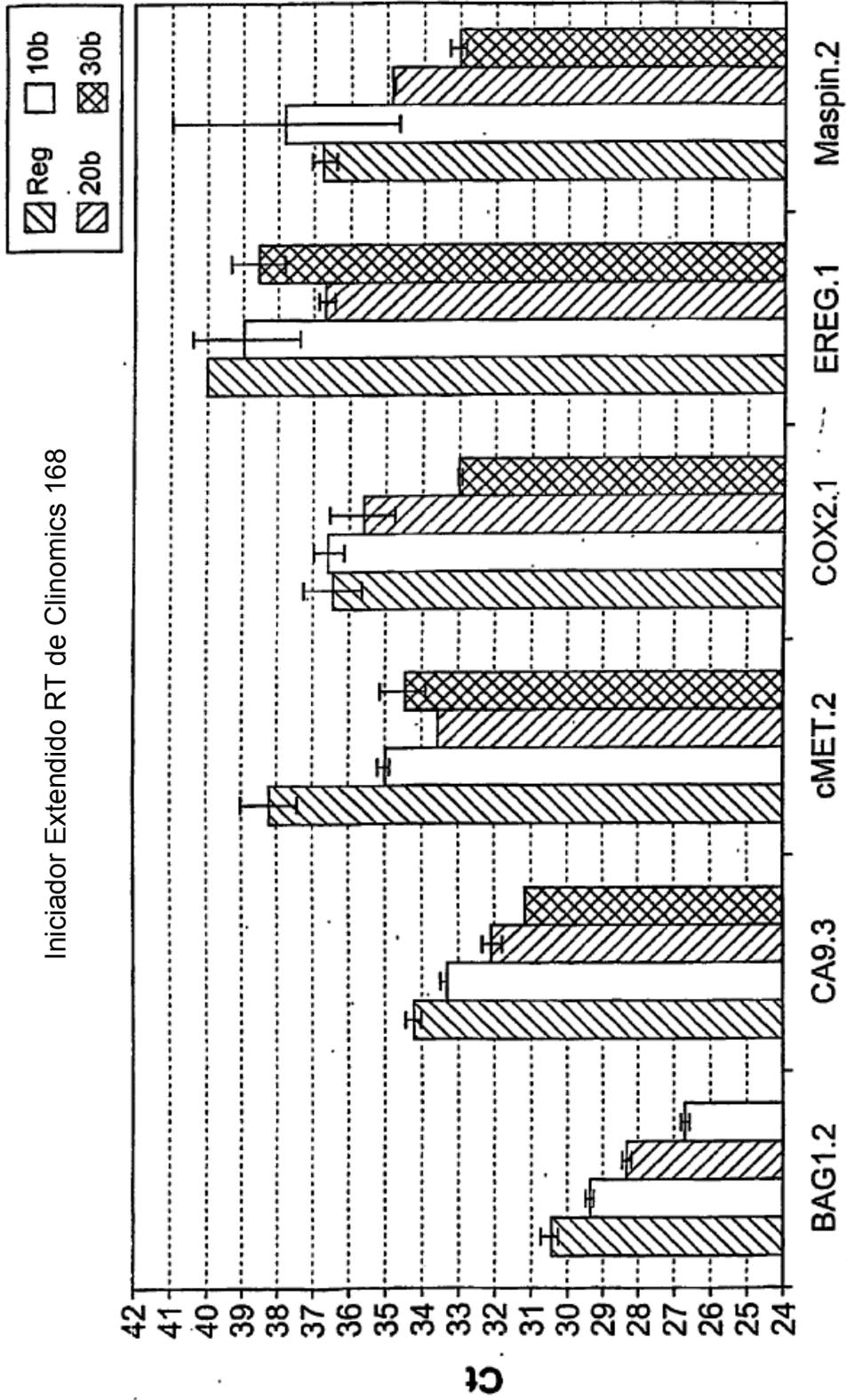


Figura 12

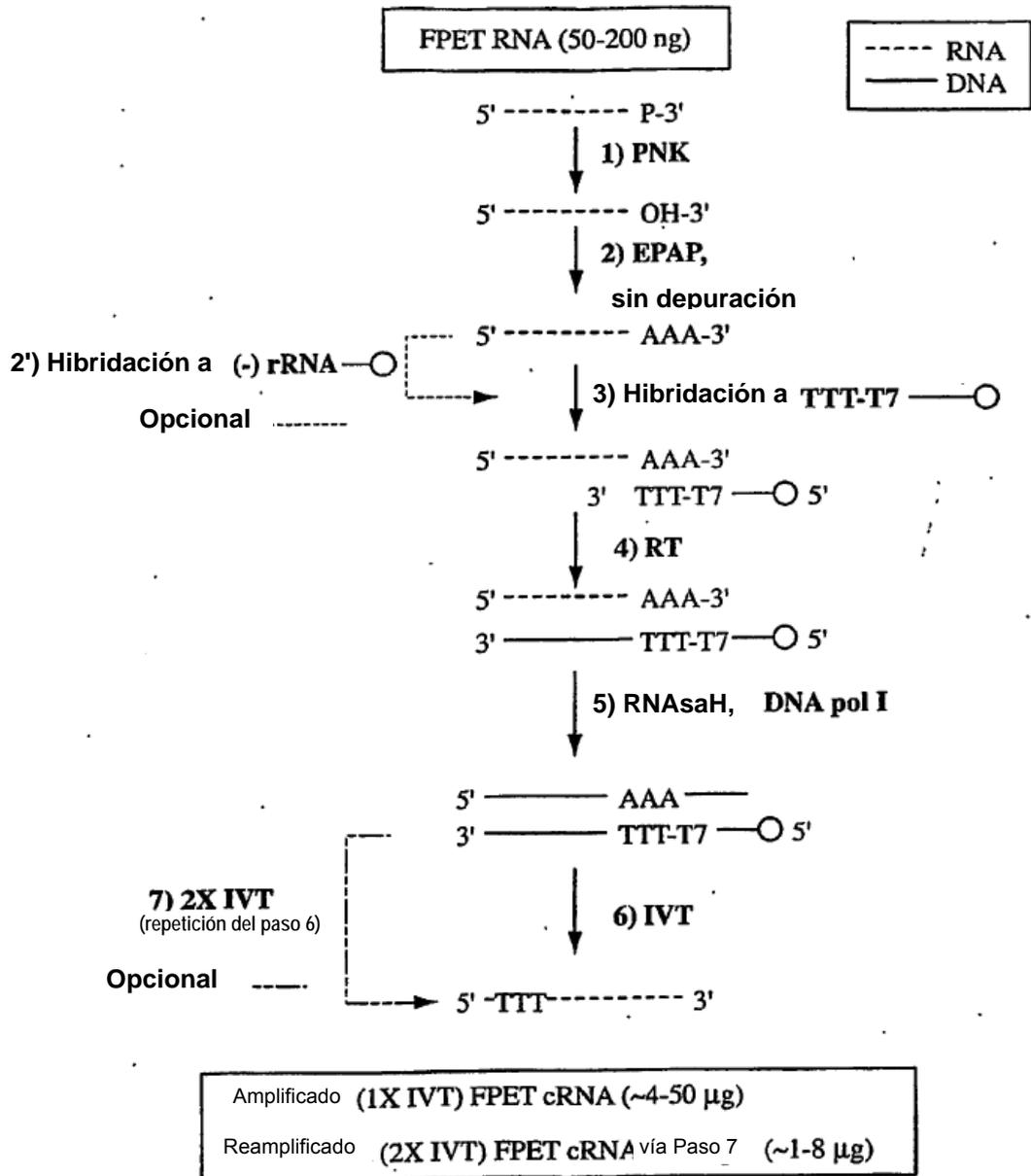
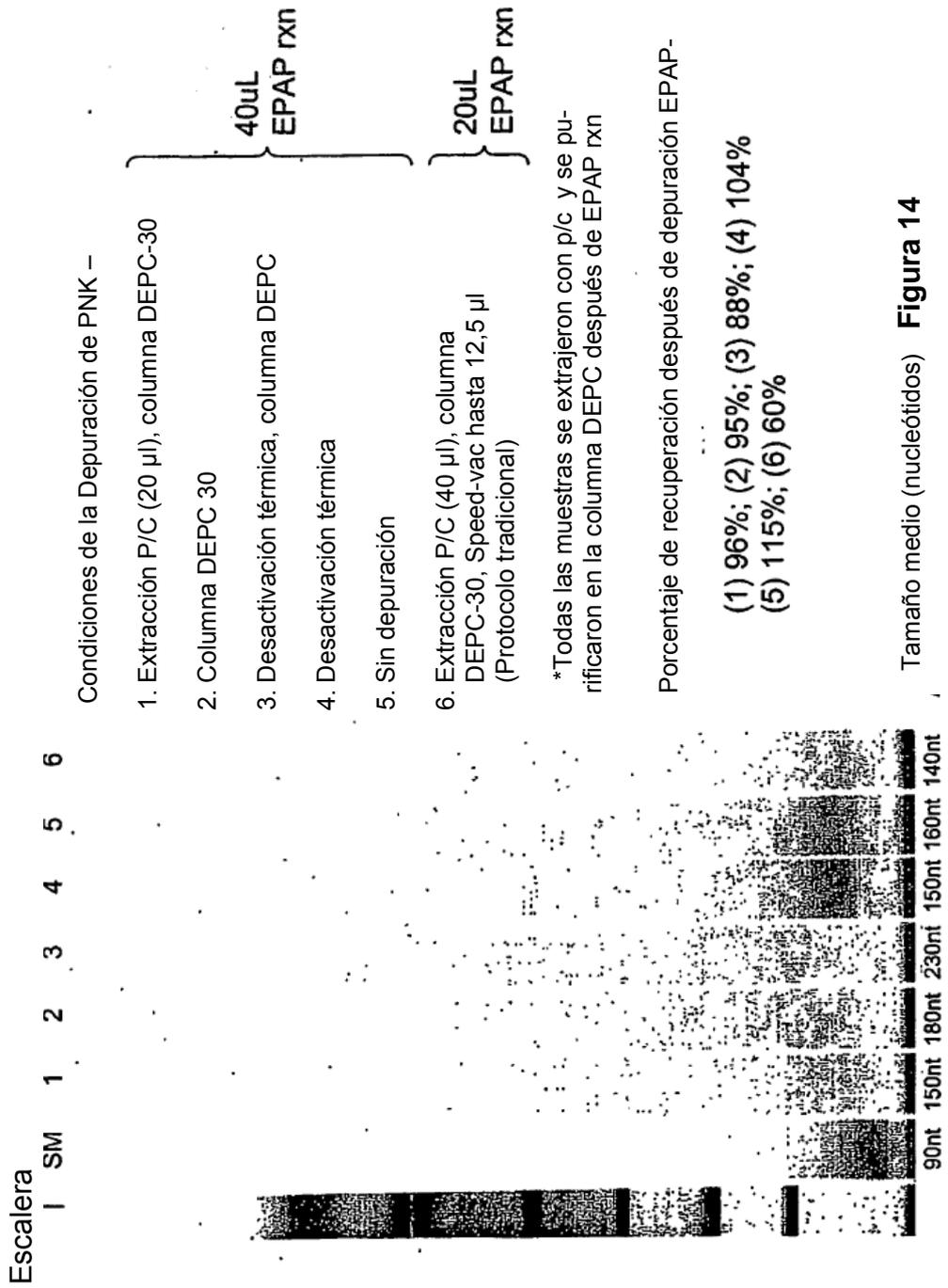
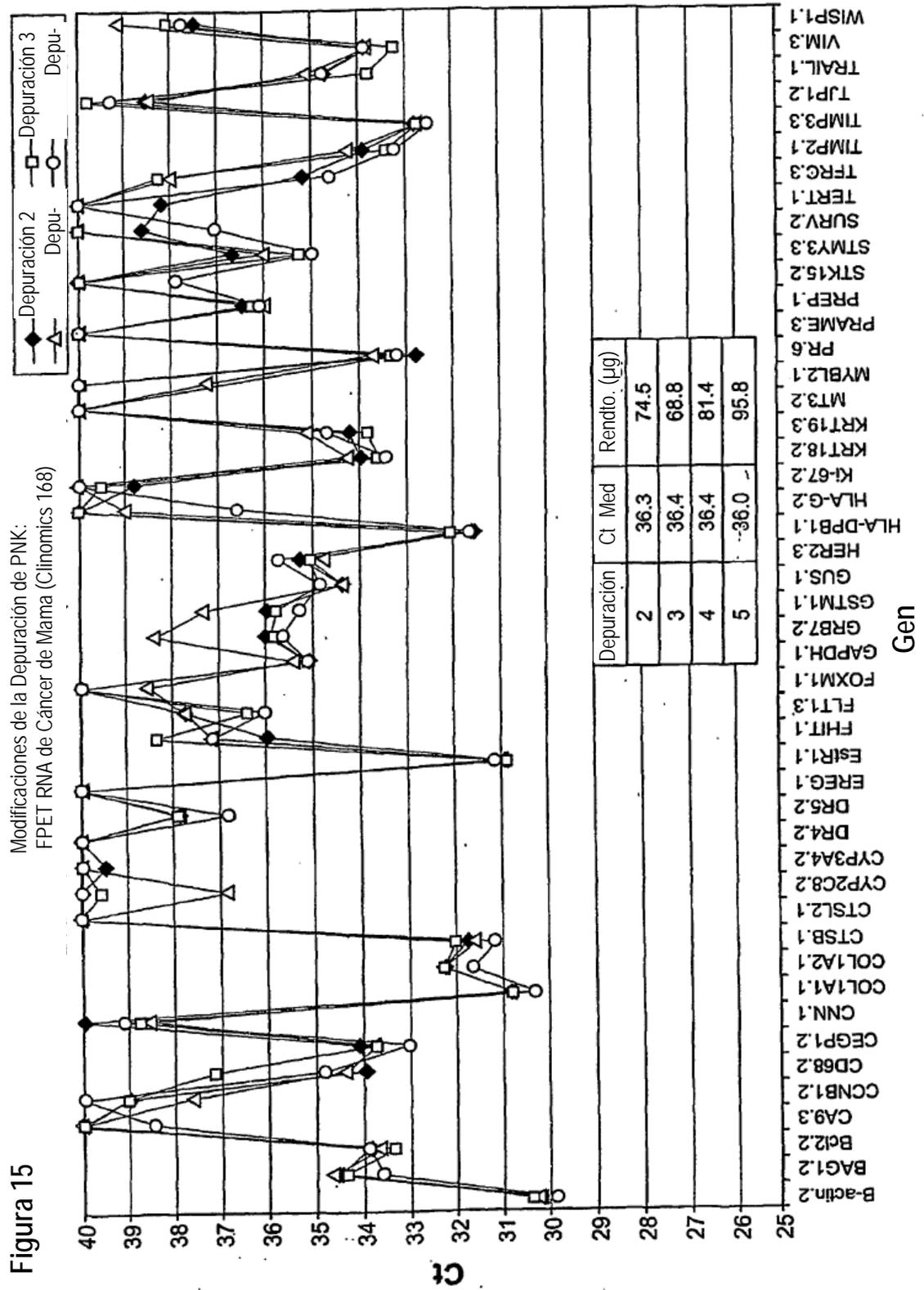


Figura 13

Modificaciones de la Depuración PNK: FPET RNA de Cáncer de Mama (Clinomics 168)





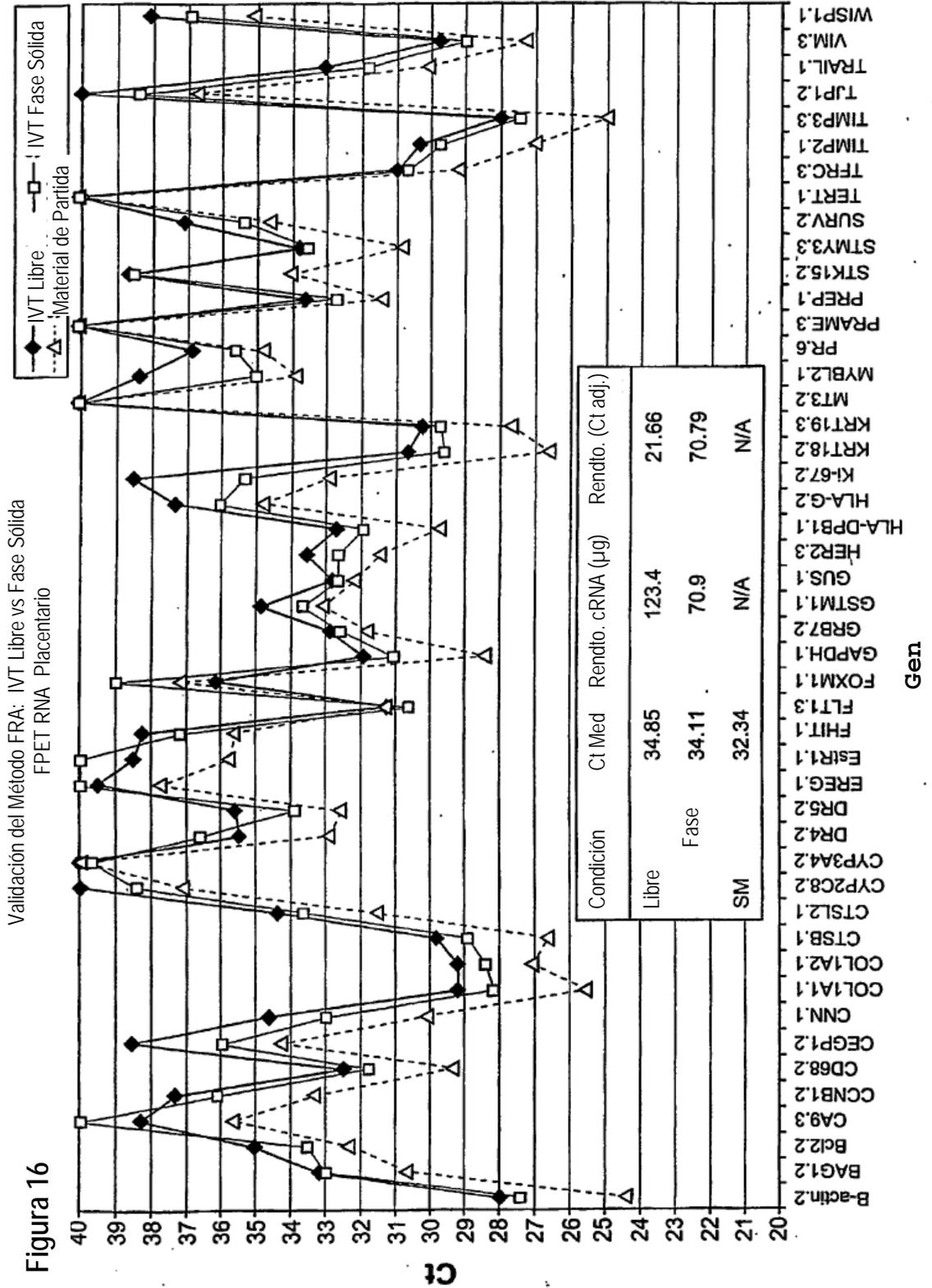


Figura 16

