

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 149**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06123097 .5**
96 Fecha de presentación: **31.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1743939**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE ESPECÍMENES DE TEJIDO FIJADOS CON FORMALINA E INCLUIDOS EN PARAFINA.**

30 Prioridad:
20.12.1999 US 469338

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
3716 SOUTH HOPE STREET, SUITE 313
LOS ANGELES, CA 90007, US**

72 Inventor/es:
**Danenberg, Kathleen;
Danenberg, Peter y
Swenson, Steven**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 149 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento de ARN a partir de especímenes de tejido fijados con formalina e incluidos en parafina

Apoyo gubernamental

- 5 El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención en virtud el número de asignación R01 CA 71716 del Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de Salud.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la purificación de ARN, ADN y proteínas de muestras de tejido biológico.

10 **Antecedentes**

La determinación de los niveles de expresión génica en los tejidos es de gran importancia para el diagnóstico exacto de enfermedades en seres humanos y se utiliza cada vez más para determinar el curso del tratamiento de un paciente. Los procedimientos farmacogenómicos pueden identificar pacientes propensos a responder a un fármaco en particular y pueden abrir el camino a nuevos enfoques terapéuticos.

- 15 Por ejemplo, la timidilato sintasa (TS) es una enzima integral en la biosíntesis de ADN en la que cataliza la metilación reductiva de monofosfato de desoxiuridina (dUMP) a monofosfato de desoxitimidina (dTMP) y proporciona la única vía para la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina en la célula (Johnston *et al.*, 1995). La timidilato sintasa es una diana para los fármacos quimioterapéuticos, más comúnmente el agente antifolato 5-fluorouracilo (5-FU). Como el agente más efectivo para el tratamiento de los cánceres de colon, cabeza y cuello y mama, la acción
20 primaria del 5-FU es inhibir la actividad de TS, lo que resulta en una disminución de los niveles intracelulares de timina y en consecuencia provoca la muerte celular.

- Se ha informado una variación considerable en la expresión de TS entre especímenes clínicos tumorales de tumores primarios (Johnston *et al.* 1995; Lenz *et al.* 1995) y metástasis (Farrugia *et al.* 1997; Leichmann *et al.* 1997). En el
25 cáncer colorrectal, por ejemplo, la tasa de expresión de TS en el tejido tumoral con respecto al tejido de la mucosa gastrointestinal normal ha abarcado de 2 a 10 (Ardalan y Zang, 1996).

- La timidilato sintasa también es conocida por tener importancia clínica en el desarrollo de resistencia tumoral, como se ha demostrado mediante estudios que han mostrado inducción aguda de la proteína de TS y aumento en los niveles de enzimas TS en células neoplásicas después de la exposición a 5-FU (Spears *et al.*, 1982, Swain y col
30 1989). La capacidad de un tumor de sobreexpresar TS en forma aguda en respuesta a agentes citotóxicos como 5-FU puede desempeñar un rol en el desarrollo de resistencia a fluorouracilo. Estudios anteriores han mostrado que los niveles de proteína TS se correlacionan directamente con la efectividad de la terapia con 5-FU, que existe una correlación directa entre la proteína y la expresión de ARN (Jackman *et al.*, 1985) y que la expresión de TS es un marcador pronóstico potente en el cáncer colorrectal y de mama (Jackman *et al.* 1985; Horikoshi *et al.* 1992).

- En la enfermedad metastásica avanzada, se ha demostrado que el ARNm de TS elevado, cuantificado por RT-PCR, y la expresión de proteína de TS elevada predicen mala respuesta a la terapia basada en fluoropirimidinas para los
35 cánceres colorrectal (Johnston *et al.*, 1995, Farrugia *et al.*, 1997, Leichman *et al.*, 1997), gástrico (Lenz *et al.*, 1995, Alexander *et al.*, 1995), y de cabeza y cuello (Johnston *et al.*, 1997). Estuvo presente a menudo una considerable superposición entre respondedores y no respondedores en la categoría de TS baja, pero los pacientes con niveles de TS por encima de la mediana fueron en su mayoría no respondedores. El valor predictivo de la sobreexpresión de TS puede ser aún mayor si se combina con otras características moleculares como niveles de dihidropirimidina
40 deshidrogenasa (DPD) y expresión de timidina fosforilasa (TP), estado de error de replicación positivo (RER+) (Kitchens y Berger, 1997), y estado de p53 (Lenz *et al.*, 1997). Los estudios realizados hasta la fecha que han evaluado la expresión de TS en tumores humanos sugieren que la capacidad para predecir la respuesta y el resultado basado en la expresión de TS en tumores humanos pueden brindar la oportunidad en el futuro de
45 seleccionar a los pacientes más susceptibles de beneficiarse de la terapia dirigida a TS.

- Hasta ahora, los estudios de expresión génica tisular cuantitativa que incluyen los de expresión de TS se han limitado a la amplificación de ARN por transcriptasa reversa reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) a partir de
tejido congelado. Sin embargo, la mayoría de las muestras patológicas no están preparadas como tejidos congelados, sino que habitualmente son fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) para permitir el análisis
50 histológico y el almacenamiento para archivo. Los niveles de expresión génica pueden ser monitoreados semicuantitativamente e indirectamente en estas muestras fijadas e incluidas mediante el uso de tinción inmunohistoquímica para monitorear los niveles de expresión de proteínas. Debido a que las muestras incluidas en parafina están ampliamente disponibles, son necesarios procedimientos rápidos y confiables para el aislamiento de ácidos nucleicos, en especial de ARN, a partir de dichas muestras.

55

- Existen un número de técnicas para la purificación de ARN de muestras biológicas, pero ninguna es fiable para el aislamiento de ARN de muestras FFPE. Por ejemplo, Chomczynski (Patente de EE.UU. Núm. 5.346.994) describe un procedimiento para la purificación de ARN de tejidos basado en una separación en fase líquida usando fenol e isotiocianato de guanidina. Una muestra biológica se homogeneiza en una solución acuosa de fenol e isotiocianato de guanidina y el homogeneizado de esta se mezcla con cloroformo. Después de la centrifugación, el homogeneizado se separa en una fase orgánica, una interfase y una fase acuosa. Las proteínas son secuestradas en la fase orgánica, el ADN en la interfase, y el ARN en la fase acuosa. El ARN puede ser precipitado de la fase acuosa. Este procedimiento no permite el aislamiento fiable de ARN de muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina.
- Otras técnicas conocidas para el aislamiento de ARN suelen utilizar sales de guanidina o extracción con fenol, como se describe por ejemplo en Sambrook, J. *et al.*, (1989) en las pág. 7.3-7.24, y en Ausubel, F. M. *et al.*, (1994) en las pág. 4.0.3-4.4.7. Sin embargo, ninguno de los procedimientos conocidos proporciona resultados cuantitativos reproducibles en el aislamiento de ARN a partir de muestras de tejido incluidas en parafina.
- Las técnicas para el aislamiento de ARN a partir de tejidos incluidos en parafina son particularmente necesarias para el estudio de la expresión génica en tejidos tumorales. Los niveles de expresión de ciertos receptores o enzimas pueden indicar la probabilidad de éxito de un tratamiento en particular.
- Los estudios de expresión génica de TS verdaderamente cuantitativos se han limitado a RT-PCR a partir de tejido congelado, mientras que el monitoreo semi-cuantitativo de control de la expresión de proteína de TS en material patológico de archivo fijado en portaobjetos de vidrio ha estado disponible a través de la tinción inmunohistoquímica. Debido a las limitaciones en el aislamiento de ARN a partir de material patológico de archivo, no se dispone hasta el momento de técnicas cuantitativas para medir los niveles de expresión génica de estas muestras.

Sumario

- Un aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento fiable para el aislamiento de ARN, ADN o proteínas de muestras de tejidos biológicos. La invención también proporciona procedimientos simples, eficientes y reproducibles para el aislamiento de ARN, ADN o proteínas de tejidos que han sido incluidos en parafina.
- La invención proporciona procedimientos de purificación de ARN a partir de una muestra de tejido biológico mediante el calentamiento de la muestra durante aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100°C en una solución de una concentración efectiva de un agente caotrópico. En una realización, el agente caotrópico es un compuesto de guanidinio. El ARN se recupera a partir de dicha solución. Por ejemplo, la recuperación de ARN puede realizarse por extracción con cloroformo.
- En un procedimiento de la invención, el ARN es aislado de una muestra patológica de archivo. En una realización, una muestra incluida en parafina es primero desparafinada. Un procedimiento de desparafinación ejemplar comprende lavar la muestra parafinada con un disolvente orgánico, preferentemente xileno. Las muestras desparafinadas pueden ser rehidratadas con una solución acuosa de un alcohol inferior. Los alcoholes inferiores adecuados incluyen metanol, etanol, propanoles y butanoles. En una realización, las muestras desparafinadas se rehidratan con lavados sucesivos con soluciones de concentración de alcohol decreciente. En otra realización, la muestra es desparafinada y rehidratada simultáneamente.
- Las muestras desparafinadas pueden homogeneizarse utilizando medios mecánicos, sónicos u otros tipos de homogeneización. En una realización, las muestras rehidratadas se homogeneizan en una solución que comprende un agente caotrópico, como tiocianato de guanidinio (también comercializado como isotiocianato de guanidinio).
- Las muestras homogeneizadas se calientan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 °C en una solución caotrópica, que comprende una cantidad efectiva de un agente caotrópico. En una realización, el agente caotrópico es un compuesto de guanidinio. Un agente caotrópico preferido es tiocianato de guanidinio.
- El ARN se recupera a continuación de la solución, por ejemplo, mediante extracción con fenol cloroformo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.
- El ARN puede entonces ser purificado utilizando técnicas de extracción, electroforesis, cromatografía, precipitación u otras técnicas adecuadas.
- El ARN aislado por los procedimientos de la invención es adecuado para un número de aplicaciones en biología molecular que incluyen transcripción reversa con cebadores aleatorios para proporcionar bibliotecas de ADNc.
- Puede utilizarse ARN purificado para determinar el nivel de expresión génica en una muestra de tejido fijada con formalina e incluida en parafina mediante amplificación por transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Utilizando los cebadores de PCR apropiados, puede determinarse el nivel de expresión de cualquier ARN mensajero por los procedimientos de la invención. La técnica cuantitativa de RT-PCR permite la

comparación de los niveles de expresión de proteína (mediante inmunohistoquímica) con los niveles de expresión génica (mediante RT-PCR) en la misma muestra incluida en parafina.

- 5 Los procedimientos de la invención son aplicables a una amplia gama de tipos de tejidos y tumores y genes diana y por lo tanto pueden ser utilizados para la evaluación del tratamiento y como herramienta de diagnóstico en una gama de cánceres que incluyen de mama, cabeza y cuello, esófago, colorrectal, y otros. Un gen preferido particularmente por los procedimientos de la invención es el gen de timidilato sintasa. Los procedimientos de la invención lograron la cuantificación reproducible de la expresión génica de TS en tejidos FFPE, comparable a la derivada de tejido congelado.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra el nivel de β -actina y expresión de TS a diversos tiempos de calentamiento. Estos datos muestran que sin la etapa de calentamiento, hay un rendimiento mínimo de ARN extraído de la parafina.

La Figura 2 muestra el nivel de expresión de β -actina en tejido normal (N) o tumoral (T) de pacientes con cáncer colorrectal según lo determinado por PCR cuantitativa a partir de ARN extraído a 95 °C durante cero a 40 minutos. Estos datos sugieren 30 minutos como el tiempo de calentamiento óptimo.

- 15 La Figura 3 muestra el efecto de la temperatura y el tiempo en la producción de ARN de β -actina y en el aislamiento de ADN. Estos datos muestran que a tiempos de calentamiento mayores (entre 60 y 120 minutos), el ARN sufre degradación mientras que hay un aumento en la contaminación de ADN capaz de generar una señal de ADN en la PCR. Las barras representan valores de experimentos por triplicado realizados en los distintos tiempos y temperaturas indicados.

- 20 La Figura 4 muestra el efecto de diferentes soluciones de calentamiento en el rendimiento del ARN aislado. Estos datos muestran que el caotropeo en la solución, en este caso isotiocianato de guanidinio (GITC), es el componente esencial de la solución de extracción de ARN, sin el cual el rendimiento del ARN extraído es al menos 10 veces menor.

- 25 La Figura 5 muestra una comparación de la expresión génica relativa de TS a partir de pellets celulares incluidos en parafina (barras de color blanco) y congelados (barras de color negro) de seis líneas celulares. Estos datos muestran que el análisis de ARN extraído de parafina refleja de forma fiable valores de expresión génica en tejido fresco-congelado.

La Figura 6 muestra una comparación de los niveles de expresión génica de TS en tejidos de colon normal o tumoral y tumoral de esófago que estaban fijados con formalina e incluidos en parafina o congelados.

- 30 La Figura 7 muestra proporciones de TS/ β -actina determinadas en secciones en parafina de pacientes cuya respuesta a 5-FU/LV se vinculó previamente a la expresión génica de TS.

- 35 La Figura 8 muestra los niveles de expresión de cuatro genes marcadores de malignidad (TS; timidina fosforilasa (TP); ciclooxigenasa-2 (COX-2); y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)) en muestras de FFPE de un cáncer de colon primario y una metástasis hepática que recurrieron un año más tarde en el mismo paciente. Estos datos muestran que, como era de esperar, tres de los cuatro marcadores de malignidad se encuentran elevados en el tejido tumoral metastásico.

Descripción detallada

- 40 Los procedimientos de la presente invención incluyen la purificación del ARN de muestras biológicas. En una realización, las muestras son muestras de tejido incluidas en parafina y el procedimiento comprende la desparafinación de las muestras incluidas, la homogeneización del tejido desparafinado y el calentamiento del tejido homogeneizado a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 °C durante un período de tiempo de entre aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 120 minutos en una solución caotrópica que contiene una cantidad efectiva de un compuesto de guanidinio. Esta etapa de calentamiento aumenta la cantidad de ADNc que es amplificado a partir de la muestra en hasta 1000 veces más que los especímenes que no son calentados.

Si bien el tejido tumoral congelado no está ampliamente disponible, los bloques de parafina se preparan de forma rutinaria a partir de cada tipo tumoral después de la cirugía, lo que permite realizar investigaciones retrospectivas a gran escala de la expresión de TS y la respuesta a la quimioterapia.

- 50 Por otra parte, la técnica puede aplicarse a cualquiera de una amplia gama de tipos de tumores y a una gama ilimitada de genes diana. Esto tiene consecuencias para la preparación futura de "perfiles de expresión génica" de tumores individuales, en los que podrían determinarse los niveles de expresión en muestras de pacientes individuales para una gama de genes que se sabe que influyen en el resultado clínico y la respuesta a diversos agentes quimioterápicos. La PCR automatizada en tiempo real de una muestra FFPE permite dirigir el tratamiento a tumores individuales.

Muestras de tejidos

El ARN puede ser aislado de cualquier muestra biológica usando los procedimientos de la invención. Las muestras biológicas suelen fijarse con un fijador. Comúnmente se utilizan fijadores de aldehídos como formalina (formaldehído) y glutaraldehído. Las muestras de tejido fijadas utilizando otras técnicas de fijación como inmersión en alcohol (Battifora y Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34:1095) también son adecuadas. Las muestras utilizadas son también incluidas en parafina. Puede aislarse ARN de cualquier muestra de tejido biológico incluida en parafina mediante los procedimientos de la invención. En una realización, las muestras son fijadas con formalina e incluidas en parafina.

Desparafinación de las muestras

La desparafinación elimina la mayor parte de la parafina de las muestras incluidas en parafina. Se conoce un número de técnicas para la desparafinación y cualquier técnica adecuada puede utilizarse con la presente invención. El procedimiento preferido de la invención utiliza un lavado con un disolvente orgánico para disolver la parafina. Estos disolventes son capaces de eliminar la parafina efectivamente de la muestra de tejido sin afectar en forma adversa el aislamiento del ARN. Los disolventes adecuados pueden elegirse de disolventes como benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y mezclas de los mismos. Un xileno es el disolvente preferido para su uso en los procedimientos de la invención. Los disolventes solos o en combinación en los procedimientos de la invención son preferentemente de alta pureza, por lo general superior al 99%.

La parafina normalmente se elimina mediante el lavado con un disolvente orgánico, con mezclado enérgico seguido por centrifugación. Las muestras se centrifugan a una velocidad suficiente para hacer que el tejido forme un pellet en el tubo, usualmente a aproximadamente 10.000 a 20.000 x g. Después de la centrifugación, se descarta el sobrenadante de disolvente orgánico. Un experto en la técnica de la histología reconocerá que el volumen de disolvente orgánico utilizado y el número de lavados necesarios dependerá del tamaño de la muestra y la cantidad de parafina a eliminar. Cuanta más parafina haya que eliminar, serán necesarios más lavados. Por lo general, una muestra será lavada entre 1 y 10 veces y preferentemente entre aproximadamente dos y aproximadamente cuatro veces. Un volumen común de disolvente orgánico es de aproximadamente 500 μ l para un espécimen de tejido de 10 μ m.

Pueden utilizarse también otros procedimientos para desparafinación conocidos para el experto en la técnica en el procedimiento de la invención. Estos procedimientos incluyen la fusión directa (Banerjee *et al.*, 1995).

Las muestras son preferentemente rehidratadas después de la desparafinación. El procedimiento preferido para la rehidratación es un lavado gradual con soluciones acuosas de alcoholes inferiores de concentración decreciente. El etanol es el alcohol inferior preferido para la rehidratación. Otros alcoholes también pueden ser adecuados para su uso con la invención, incluyendo metanol, isopropanol y otros alcoholes similares en el intervalo de C1-C5. La muestra se mezcla enérgicamente en forma alternativa con soluciones alcohólicas y se centrifuga. En una modalidad preferida, el intervalo de concentración del alcohol se disminuye gradualmente de aproximadamente 100% a aproximadamente 70% en agua durante aproximadamente tres a cinco pasos incrementales, en los que el cambio en la concentración de la solución en cada paso es usualmente menor que aproximadamente 10% (es decir, la secuencia: 100%, 95%, 90%, 80%, 70%). En otra realización, la desparafinación y la rehidratación se llevan a cabo simultáneamente utilizando un reactivo como EZ-DEWAX (BioGenex, San Ramon, CA)

Homogeneización

Las muestras desparafinadas, rehidratadas pueden homogeneizarse mediante cualquier técnica estándar mecánica, sónica u otra adecuada. La homogeneización del tejido se lleva a cabo preferentemente con un homogeneizador de tejidos mecánico de acuerdo con procedimientos estándar. Un número de homogeneizadores disponibles comercialmente son adecuados para su uso con la invención incluyendo: homogeneizador Ultra-Turrax (IKAWorks, Inc., Wilmington, NC); Tissumizer (Tekmar-Dohrmann, Cincinnati, OH); y Polytron (Brinkmann, Westbury, NY).

En una realización, la muestra se homogeniza en presencia de un agente caotrópico. Los agentes caotrópicos se eligen de manera que el ARN en una concentración efectiva es purificado a partir de una muestra incluida en parafina en una cantidad mayor que aproximadamente 10 veces la aislada en ausencia de un agente caotrópico. Los agentes caotrópicos incluyen: compuestos de guanidinio, urea, formamida, yoduro de potasio, tiocianato de potasio y compuestos similares. El agente caotrópico preferido para los procedimientos de la invención es un compuesto de guanidinio, como isotiocianato de guanidinio (también comercializado como tiocianato de guanidinio) y clorhidrato de guanidinio. Numerosos contraiones aniónicos son útiles, y un experto en la materia puede preparar muchas sales de guanidinio con estos aniones apropiados. La solución de guanidinio utilizada en la invención por lo general tiene una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5M, con un valor preferido de aproximadamente 4M. Si el ARN ya está en solución, la solución de guanidinio puede ser de mayor concentración de modo que la concentración final alcanzada en la muestra esté en el intervalo de 1 a 5M. La solución de guanidinio también está preferentemente tamponada a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, más preferentemente aproximadamente 4, con un tampón bioquímico adecuado como Tris-Cl. La solución caotrópica

también puede contener agentes reductores, como ditioneitol (DTT) y β -mercaptoetanol (BME). La solución caotrópica también puede contener inhibidores de ARNasa.

Calentamiento

5 Las muestras se calientan en la solución caotrópica a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 100 °C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas. Como alternativa, las muestras se calientan en la solución caotrópica a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 100 °C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas. Los tiempos de calentamiento suelen ser elegidos de modo que la cantidad de ARN purificado es de al menos aproximadamente 100 veces mayor que para las muestras sin calentar, y más preferentemente aproximadamente 1000 veces mayor. En una realización preferida, 10 la muestra se calienta durante aproximadamente 20 minutos a una temperatura de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C. Más preferentemente, la muestra se calienta durante 30 a 60 minutos a aproximadamente 95 °C.

Recuperación de ARN

15 El ARN puede ser recuperado de la solución caotrópica después del calentamiento mediante cualquier técnica adecuada que da como resultado el aislamiento del ARN a partir de al menos un componente de la solución caotrópica. El ARN puede ser recuperado de la solución caotrópica por extracción con un disolvente orgánico, extracción con cloroformo, extracción con fenol-cloroformo, precipitación con etanol, isopropanol o cualquier otro alcohol inferior, mediante cromatografía incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en gel de sílice y cromatografía de fase reversa, o por procedimientos electroforéticos, 20 incluyendo electroforesis en gel de poliacrilamida y electroforesis en gel de agarosa, como será evidente para un experto en la técnica. El ARN se recupera preferentemente de la solución caotrópica mediante extracción con fenol cloroformo.

Después de la recuperación del ARN, este puede opcionalmente ser purificado aún más. La purificación adicional resulta en ARN que está sustancialmente libre de contaminación por ADN o proteínas. La purificación adicional 25 puede ser realizada por cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente para la recuperación de ARN. El ARN es purificado preferentemente por precipitación utilizando un alcohol inferior, especialmente con etanol o con isopropanol. La precipitación se lleva a cabo preferentemente en presencia de un vehículo como glucógeno que facilita la precipitación.

Recuperación de ADN y proteínas

30 Los procedimientos de la invención también pueden utilizarse para purificar ADN o proteínas de la muestra de tejido. Después de mezclar una muestra con un disolvente orgánico, como cloroformo, y después de la centrifugación, la solución tiene tres fases, una fase orgánica inferior, una interfase y una fase acuosa superior. Con un agente caotrópico apropiado, en particular con un compuesto de guanidinio, los componentes biológicos de la muestra se segregarán en las tres fases. La fase acuosa superior contendrá ARN, mientras que la interfase contendrá ADN y la fase orgánica contendrá proteínas. Un experto en la técnica reconocerá que los procedimientos de la invención son 35 adecuados para la recuperación de las fases de ADN y proteína, así como de la que contiene ARN. La recuperación del ADN es potenciada por los procedimientos de la invención.

ARN purificado

40 El ARN purificado por los procedimientos de la invención es adecuado para una variedad de propósitos y procedimientos de biología molecular, que incluyen entre otros: transcripción reversa a ADNc; producción de ADNc marcado con radioactividad; fluorescencia o de alguna otra manera para el análisis de chips de genes, microarreglos de oligonucleótidos y similares; electroforesis mediante gel de acrilamida o agarosa; purificación por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, gel de sílice, fase reversa, o cromatografía de exclusión por tamaño); hibridación con sondas de ácidos nucleicos; y fragmentación mediante medios mecánicos, sónicos u otros.

45 Ejemplos

Materiales y procedimientos

Estos materiales y procedimientos son comunes a los siguientes ejemplos.

Preparación de la muestra. Las características de las líneas celulares humanas SK1, H157, A431, HT29, HCC298 y HH30 se han descrito previamente. Las células fueron retiradas de sus monocapas por tripsinización y se agruparon 50 en pellets por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Los pellets celulares fueron congelados -70 °C o fijados con formalina durante 24 horas, a continuación incluidos en parafina.

Se obtuvieron secciones representativas de tejido tumoral en el momento de la cirugía, se fijaron con formalina e incluyeron en parafina mediante procedimientos comunes a la mayoría de los laboratorios de patología clínica. Se cortaron secciones transversales de tejido (5 μ m) utilizando un microtomo.

5 Aislamiento de ARN. Se aisló el ARN de los tejidos incluidos en parafina de la siguiente manera. Se colocó una sección individual de tejido parafinado de 5 µm en un tubo Eppendorf y se desparafinó mediante dos lavados de 15 minutos con xileno. El tejido fue rehidratado mediante lavados sucesivos de 15 minutos con alcoholes graduados (100%, 95%, 80% y 70%). El pellet resultante se suspendió en isotiocianato de guanidina 4M con sarcosina 0,5% y ditiotreitól (DTT) 20 mM. La suspensión se homogeneizó y después se calentó a partir de aproximadamente 50 a aproximadamente 95 °C durante 0-60 minutos; se incluyó un punto de tiempo de calentamiento de cero como un control para cada muestra. Se añadió acetato de sodio (pH 4,0) a 0,2 M y la solución se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con isopropanol y 10 mg de glucógeno. Después de la centrifugación (13000 rpm, 4 °C, 15 min) el ARN precipitado se lavó dos veces con 1 ml de etanol 75% y a continuación se resuspendió en agua libre de ARNasa.

10 Transcripción reversa (RT). Después de calentar, el ARN total fue convertido a ADNc utilizando hexámeros al azar. Las condiciones de RT fueron como las que han sido descritas previamente para tejido congelado (Horikoshi *et al.*, 1992). Se prepararon controles omitiendo la transcriptasa reversa (No RT) para cada muestra.

15 Cuantificación por PCR en tiempo real de la expresión génica de TS y β-actina utilizando la Máquina de PCR Perkin Elmer Cetus 7700 (Taqman). La cuantificación de los niveles de ARNm se llevó a cabo utilizando una PCR en tiempo real basada en un procedimiento de detección de fluorescencia como se describió previamente (Heid *et al.* 1996; Eads *et al.* 1999). El ADNc fue preparado como se describió anteriormente. El ADNc de interés y el ADNc de referencia fueron amplificados por separado utilizando una sonda con un colorante reportero fluorescente 5' (6FAM) y un colorante inactivador 3' (TAMRA). La actividad de 5'-exonucleasa de la TAQ polimerasa escinde la sonda y libera la molécula reportera, cuya fluorescencia es detectada por el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism (Taqman). Después de cruzar un umbral de detección de fluorescencia, la amplificación por PCR da como resultado una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto generado por PCR. La concentración inicial de la plantilla se determinó a partir del número de ciclo en el cual la señal fluorescente cruzó un umbral en la fase exponencial de la reacción de PCR. La expresión génica relativa se determinó sobre la base de los ciclos de umbral del gen de interés y el gen de referencia. El uso de un gen de referencia evita la necesidad de cuantificar el ARN directamente, lo que podría ser una importante fuente de error.

20 Las secuencias del cebador y de la sonda fueron las siguientes: TS: Secuencia Núm. 1 GGC CTC GGT GTG CCT TT; Secuencia Núm. 2 AAC ATC GCC AGC TAC GCC CTG C; Secuencia Núm. 3 GAT GTG CGC AAT CAT GTA CGT. β-actina: Secuencia Núm. 4 TGA GCG CGG CTA CAG CTT; Secuencia Núm. 5 ACC ACC ACG GCC GAG CGG; Secuencia Núm. 6 TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T. Para los experimentos de PCR en tiempo real, como se mencionó anteriormente, los oligonucleótidos reporteros (Secuencias Núm. 2 y 5) fueron marcados en 5' con 6FAM y marcados en 3' con TAMRA.

30 Para cada PCR, se incluyó un control "Sin Transcriptasa Reversa" (NRT o No RT). El propósito de esta reacción fue corregir cualquier amplificación de fondo derivada de contaminación por ADN genómico residual. Por lo tanto, cada valor global de TS y β-actina se calcula como el valor de RT menos el valor de NRT (RT-NRT).

35 Análisis estadístico. Se realizaron comparaciones no paramétricas de medias de prueba para determinar si las diferencias en los niveles de TS entre el tejido congelado y las muestras FFPE del mismo tumor eran significativas o no significativas.

Ejemplo 1

40 *Procedimiento general de aislamiento de ARN*

Se extrajo el ARN de tejido incluido en parafina mediante el siguiente procedimiento general.

A. Desparafinación e hidratación de las secciones:

- (1) Se coloca una porción de una sección de aproximadamente 10 µm en un tubo de centrífuga de plástico de 1,5 ml.
- 45 (2) Se añaden 600 µl de xileno y la mezcla se agita energicamente durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 a 25 °C).
- (3) La muestra se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos a temperatura ambiente a la máxima velocidad de la centrifuga de laboratorio (aproximadamente 10-20.000 x g).
- (4) Los pasos 2 y 3 se repiten hasta que la mayoría de la parafina se ha disuelto. Normalmente se requieren dos o más veces dependiendo de la cantidad de parafina incluida en la porción de la muestra original.
- 50 (5) La solución de xileno se elimina agitando energicamente con un alcohol inferior, preferentemente con etanol 100% (aproximadamente 600 µl) durante aproximadamente 3 minutos.
- (6) El tubo se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos como en el paso (3). El sobrenadante se decanta y se desecha. El pellet se torna de color blanco.

(7) Los pasos 5 y 6 se repiten con soluciones de etanol sucesivamente más diluidas: en primer lugar con etanol aproximadamente 95%, a continuación, con aproximadamente 80% y, finalmente, con etanol aproximadamente 70%.

5 (8) La muestra se centrifuga durante 7 minutos a temperatura ambiente como en el paso (3). El sobrenadante se desecha y se deja secar el pellet a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

B. Aislamiento del ARN con fenol-cloroformo

(1) Se añaden 400 µl de solución de isotiocianato de guanidina que incluye sarcosina 0,5% y 8 µl de ditiotretitol 1M.

10 (2) La muestra se homogeniza a continuación con un homogenizador de tejidos (Ultra-Turrax, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC) durante aproximadamente 2 a 3 minutos, mientras se aumenta gradualmente la velocidad de baja velocidad (velocidad 1) a alta velocidad (velocidad 5).

(3) La muestra se calienta a continuación a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 50-20 minutos. Es preferente perforar la tapa del tubo que contiene la muestra con una aguja de calibre fino antes de calentar. Como alternativa, la tapa puede ser fijada con una abrazadera de plástico o con una película para laboratorio.

15 (4) La muestra se extrae a continuación con 50 µl de acetato de sodio 2M a pH 4,0 y 600 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (10:1,93:0,036), recién preparada mezclando 18 ml de fenol con 3,6 ml de una solución 1:49 de alcohol isoamílico:cloroformo. La solución se agita enérgicamente durante aproximadamente 10 segundos y después se enfría en hielo durante aproximadamente 15 minutos.

(5) La solución se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos a velocidad máxima. La fase superior (acuosa) se transfiere a un tubo nuevo.

20 (6) El ARN se precipita con aproximadamente 10 µl de glucógeno y con 400 µl de isopropanol durante 30 minutos a -20 °C.

(7) El ARN se reúne en un pellet por centrifugación durante aproximadamente 7 minutos en una centrífuga de laboratorio a velocidad máxima; el sobrenadante se decanta y se desecha; y el precipitado se lava con aproximadamente 500 µl de etanol 70 a 75%.

25 (8) La muestra se centrifuga nuevamente durante 7 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se decanta y el pellet se seca al aire. El pellet se disuelve a continuación en un tampón apropiado para experimentos adicionales (por ejemplo, 50 µl de Tris cloruro 5 mM Tris, pH 8,0).

Ejemplo 2

Tiempo de calentamiento

30 Este ejemplo ilustra el efecto del tiempo de calentamiento en el rendimiento del ARN.

Como se ilustra en la Figura 1, el calentamiento de la solución caotrópica a 95 °C antes de la precipitación y la transcripción reversa aumentó significativamente la eficiencia de la detección de las dianas TS y β-actina. Cuando no se incluyó una etapa de calentamiento no pudieron detectarse TS ni β-actina (puntos de tiempo 0 min.). Después de 20 minutos a 95 °C ambos transcritos fueron detectables; un aumento adicional del tiempo de calentamiento a 35 60 minutos dio como resultado un aumento de 3 veces en la sensibilidad de la detección para TS y un aumento de 4,5 veces para β-actina. (NRT = Control Sin Transcriptasa Reversa, RT-NRT = nivel relativo global de expresión génica, es decir, Transcriptasa Reversa menos Sin Transcriptasa Reversa).

La Figura 2 ilustra la cantidad de expresión de ARN del gen de la β-actina en tejido normal (N) y tumoral (T). Las muestras fueron calentadas a 95 °C durante períodos que abarcan de cero a 40 minutos. Se observa un tiempo de 40 calentamiento preferido de aproximadamente 30 minutos para la mayoría de las muestras.

La Figura 3 muestra que a tiempos de calentamiento mayores que aproximadamente 60 minutos, la cantidad de ARN extraído comienza a disminuir, lo que sugiere la degradación térmica del ARN, mientras que la cantidad de ADN extraído comienza a aumentar. Esto no es deseable debido a que la presencia de ADN puede dar una señal de PCR falsa en algunos casos.

45 Ejemplo 3

Soluciones de calentamiento

Este ejemplo ilustra que el calentamiento de la solución de ARN en presencia de un agente caotrópico es importante para obtener rendimientos elevados de ARN. Este fue un experimento de RT-PCR que utilizó la detección de la expresión de genes de β-actina como una medida de las cantidades relativas de ARN aisladas en varias soluciones.

Se trataron especímenes clínicos de muestras de tejido FFPE de cáncer de esófago de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, con la excepción de que el pellet inicial obtenido después de la desparafinación fue disuelto o suspendido en isotiocianato de guanidinio (GITC) 4M, isotiocianato de guanidinio 4M + β -mercaptoetanol 100 μ M (GITC + BME), isotiocianato de guanidinio 4M + ditiotreitól 20 μ M (GITC + DTT) o tampón Tris-Cl (10 mM pH 7,5) o tampón Tris-Cl + DTT 20 μ M (Tris/Cl + DTT). Las muestras se calentaron a continuación a 95 °C durante 30 minutos o no se calentaron (0 min, 95 °C). Las muestras en Tris/Cl fueron tratadas a continuación con isotiocianato de guanidinio 4M. Los niveles de ARN se determinaron por RT-PCR y detección por PCR en tiempo real de β -actina. Como se mostró en la Figura 4, la presencia del agente caotrópico isotiocianato de guanidinio en el calentamiento fue importante para la recuperación de alto rendimiento del ARN. La presencia de un agente reductor, como DTT o BME, no es esencial para la recuperación de alto rendimiento del ARN. La solución de isotiocianato de guanidinio 4M contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 25 mM y sarcosina 0,5%.

Ejemplo 4

Comparación de valores de expresión génica determinados en tejido FFPE y congelado de los mismos orígenes

Este ejemplo muestra que los procedimientos de la presente invención proporcionan valores de expresión génica de muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina equivalentes a los obtenidos a partir de tejido congelado.

Se trataron con FFPE muestras de seis líneas celulares y se realizó la cuantificación de TS utilizando los procedimientos de la invención (incluyendo el calentamiento a 95 °C durante 30 minutos). Los valores de TS relativos resultantes (Figura 5) se compararon con los obtenidos a partir de pellets de células congeladas usando procedimientos conocidos. Los niveles relativos de expresión de TS fueron 3,0-19,5 (media = 8,5) en las células congeladas versus 3,0-25,0 (media = 9,0) en las muestras FFPE. El análisis estadístico de la diferencia entre las dos medias reveló un valor de p de 0,726, lo que indica que no hay diferencia significativa en los valores de TS obtenidos de pellets de células congeladas utilizando los procedimientos de RT-PCR originales y los obtenidos a partir de pellets de células FFPE utilizando los procedimientos de la invención.

Los niveles de expresión de ARN en muestras de tejidos tumorales y de tejidos normales (no tumorales) también fueron equivalentes independientemente de si las muestras fueron fijadas con formalina e incluidas en parafina o congeladas. Se compararon 5 tejidos de colon normales y 6 tumorales y 4 tejidos tumorales esofágicos en cuanto a la expresión génica relativa de TS en tejido en parafina y congelado (FT) pareado como anteriormente. Los resultados se ilustran en la Figura 6. No se encontró diferencia significativa entre los niveles de TS en muestras de tejido congelado y los valores de TS hallados en muestras FFPE del mismo tejido. Esto fue cierto para los tipos de tejido de colon y de esófago (media de las muestras de colon FT = 3,46, media de las muestras de colon FFPE = 3,06, p = 0,395; media de las muestras de esófago FT = 13,9, media de las muestras de esófago FFPE = 15,93, p = 0,21).

Ejemplo 5

Comparación de niveles de TS en tejidos tumorales respondedor y no respondedor

Correlación de los niveles de TS en muestras de tejido congelado y FFPE pareadas con respuesta a 5-FU/leucovorina (LV) en cáncer de colon en estadio IV. Informes anteriores basados en datos de RT-PCR derivados de tejido congelado encontraron que niveles elevados de TS en los tumores (expresión génica relativa $\geq 4,0$) eran indicadores de mala respuesta al tratamiento para TS. Los tumores respondedores podían ser caracterizados como aquellos que expresan niveles más bajos de TS. Se determinaron las proporciones de TS/ β -actina en secciones en parafina de 17 pacientes cuya respuesta a 5-FU/LV había sido vinculada previamente a la expresión génica de TS a través del análisis de muestras de tejido congelado (Figura 7). De los 17, 6 eran conocidos por ser respondedores a TS y 11 eran conocidos por haber sido poco respondedores al tratamiento para TS. Se halló que los resultados de TS con tejido en parafina pareado también predijeron la respuesta a este tratamiento (media de FT respondedor = 2,87, media de FFPE respondedor = 2,37, p = 0,641; media de FT no respondedor = 7,66, media de FFPE no respondedor = 7,84, p = 0,537). No hubo diferencia significativa entre los niveles de TS derivados de tejido congelado y los derivados de tejidos FFPE pareados.

Ejemplo 6

Niveles de expresión génica de TS en cáncer de colon primario y metástasis hepática

Este ejemplo muestra un análisis de TS, y la expresión de otros genes, en un tumor primario de colon y en una metástasis hepática recurrente del mismo paciente.

La Figura 8 muestra los niveles de expresión de cuatro genes: TS; TP; ciclooxygenasa-2 (COX-2); y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en muestras de FFPE de un cáncer de colon primario y una metástasis hepática (met) del mismo paciente que recurrió un año más tarde. Los hallazgos sugieren que, si bien el tumor primario fue sensible a la terapia con 5-FU (TS = 2.32), la metástasis será refractaria (TS met 11,58). Los niveles de expresión de COX-2 y VEGF se correlacionan con las indicaciones publicadas en que su expresión se incrementa en la enfermedad agresiva, y son co-regulados. (Cox-2 primario = 1,35; COX-2 met = 5,4; VEGF primario = 5,02;

VEGF met = 14,4). Se aisló el ARN como se describe a partir de una sección de 5 µm FFPE del cáncer de colon primario y de una sección FFPE de la metástasis hepática. La expresión relativa del gen de TS en el tumor primario respondedor fue de 2,32 comparado con 11,58 en la enfermedad metastásica (Figura 8). Este aumento de 5 veces en la expresión de TS, según lo determinado por los procedimientos de RT-PCR informados en la presente memoria, indica que la enfermedad secundaria no responderá al 5-FU y sugiere que un tratamiento alternativo como CPT-11 puede ser apropiado.

Referencias

- Ardalan, B. and Dang, Z. (1996) Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 37:A1376.
- Ausubel, F. M. et al., "Current Protocols In Molecular Biology", John Wiley & Sons, Inc., vol. 1, pp. 2.2.1-2.4.5 (1994).
- 10 Bannerjee, S.K., Makdisi, W.F., Weston, A.P., Mitchell, S.M., and Campbell, D.R. (1995) Biotechniques, 18:768-773.
- Chomczynski et al., "Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol- Chloroform Extraction," Analytical Biochemistry, 162:156-159 (1987).
- Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Danenberg, P.V. and Laird, P.W. (1999) CpG island hypermethylation in humancolorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. Cancer Res., 59: 2302-2306.
- 15 Farrugia, D. Cunningham D. Danenberg P. Danenberg K. Metzger R. Mitchell F. MacVicar D. McCarthy K. Aherne GW. Norman A. Jackman AL. (1997) Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Cancer Res. 38:A4132.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996) Real-time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
- Horikoshi, T., Danenberg, K.D., Stadlbauer, T.H.W., Volkenandt, M., Shea, L.L.C., Aigner, K., Gustavsson, B., 20 Leichman, L., Frösing, R., Ray, M., Gibson, N.W., Spears, C.P. and Danenberg, P.V. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. Cancer Res., 52: 108-116, 1992.
- Jackman, A.L., Jones, T.R., Calvert, A.H. Experimental and Clinical Progress in Cancer Chemotherapy (F.M. Muggia ED.) Martinus Nijhoff, Boston (1985).
- 25 Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., Leichman, L. (1995) Cancer Research 55:1407-1412.
- Leichman, C.G., Lenz, H.J., Leichman, L., Danenberg, K., Baranda, J., Groshen, S., Boswell, W., Metzger, R., Tan, M., Danenberg, P.V. (1997) J. Clinical Oncology. 15(10):3223-9.
- 30 Lenz, H.J., Danenberg, K.D., Leichman, C.G., Florentine, B., Johnston, P.G., Groshen, S., Zhou, L., Xiong, Y.P., Danenberg, P.V. and Leichman, L.P. (1998) Clinical Cancer Research. 4(5):1227-34.
- Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Press, 2nd Ed., pp. 9.14-9.23 (1989).
- Spears, C. P., Shahinian, A. H., Moran, R. G., Heidelberger, C., and Corbett, T. H. (1982) Cancer Res. 42, 450-456; Keyomarsi, K., and Moran, R. G. (1988) J. Biol. Chem. 263, 14402-14409.
- 35 Swain, S. M., Lippman, M. E., Egan, E. F., Drake, J. C., Steinberg, S. M., and Allegra, C. J. (1989) J. Clin. Oncol. 7, 890-899.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la recuperación de ARN de una muestra de tejido fijada con formalina e incluida en parafina, que comprende:
 - 5 calentar la muestra en una solución caotrópica que comprende una concentración efectiva de un agente caotrópico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 °C durante un período de tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos; y
 - recuperar dicho ARN a partir de dicha solución caotrópica,
 - en la que la solución caotrópica es urea, formamida, yoduro de potasio y tiocianato de potasio.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además desparafinar la muestra.
3. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente que comprende además rehidratar la muestra antes del calentamiento.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente que comprende además homogeneizar dicha muestra antes del calentamiento.
- 15 5. El procedimiento de cualquier reivindicación 1 a 4 para la recuperación de ARN a partir de una muestra de tejido biológico en la que dicho ARN es recuperado por extracción a partir de dicha solución caotrópica con un disolvente orgánico insoluble en agua.
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que dicho disolvente orgánico insoluble en agua consiste esencialmente de cloroformo.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6 que además comprende purificar dicho ARN.
8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que dicho ARN es purificado por precipitación con etanol.
9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicho período de tiempo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 minutos.
10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicho período de tiempo es de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos.
- 25 11. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicha temperatura está en el intervalo de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C.
12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicha temperatura está en el intervalo de aproximadamente 85 a aproximadamente 100 °C.
- 30 13. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicha solución caotrópica tiene un pH de aproximadamente 3-6.
14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que dicha solución caotrópica tiene un pH de aproximadamente 4.
15. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicha solución caotrópica comprende además un agente reductor.
- 35 16. El procedimiento de la reivindicación 15 en el que dicho agente reductor se selecciona de β-mercaptoetanol y ditiotreitól.
17. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicho ARN se utiliza para determinar el nivel de expresión de un gen diana.
- 40 18. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que dicho ARN es además sometido a un procedimiento seleccionado del grupo que consiste de transcripción reversa, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis, cromatografía, hibridación con una sonda de ácido nucleico, y fragmentación.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el ARN se somete a transcripción reversa y el ADNc así producido es marcado.
- 45 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el ADNc marcado se utiliza en un chip génico o un análisis de microarreglos.

21. Un procedimiento para la medición cuantitativa de la expresión génica de genes diana que comprende la recuperación de ARN mediante un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, que comprende además:

convertir el ARN purificado a ADNc mediante una reacción de transcripción reversa;

5 someter el ADNc a una reacción de PCR en una solución de reacción en cadena de la polimerasa que comprende una sonda de oligonucleótidos adecuada para amplificar al menos una secuencia específica, una polimerasa y un fluorocromo;

medir el cambio que se produce en la intensidad de la fluorescencia como resultado de la reacción de PCR; y

10 determinar, sobre la base del cambio en la intensidad de la fluorescencia, la cantidad de un ácido nucleico que tiene una secuencia específica presente en la muestra.

22. Un procedimiento para determinar el nivel de expresión de un gen diana en una muestra de tejido fijada incluida en parafina que comprende:

desparafinar la muestra de tejido para obtener una muestra desparafinada;

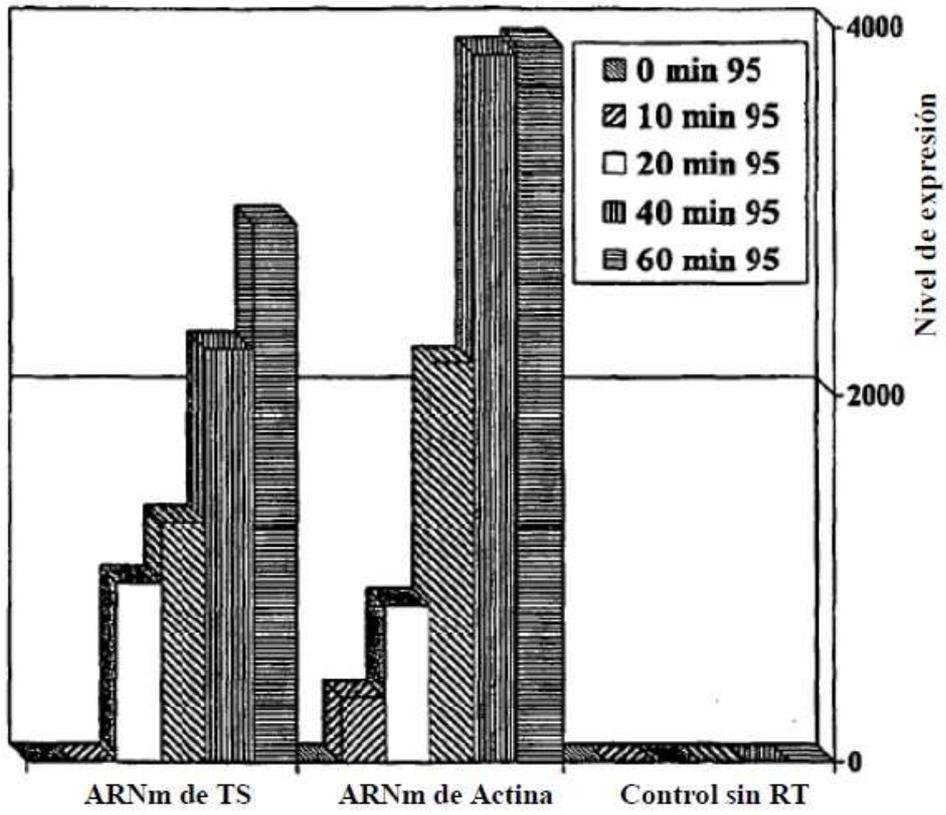
15 aislar el ARNm de la muestra desparafinada calentando primero la muestra de tejido desparafinada en una solución que comprende una concentración efectiva de un agente caotrópico a una temperatura en el intervalo de 50 a 100 °C y recuperar dicho ARNm de dicha solución; y

determinar la cantidad de ARNm de un gen diana en relación con la cantidad de ARNm de un gen de control interno.

20 23. El procedimiento de la reivindicación 22 en el que el gen de control interno es β -actina.

24. El procedimiento de la reivindicación 22 en el que el gen diana es Timidilato Sintasa (TS).

Figura 1



5

Figura 2

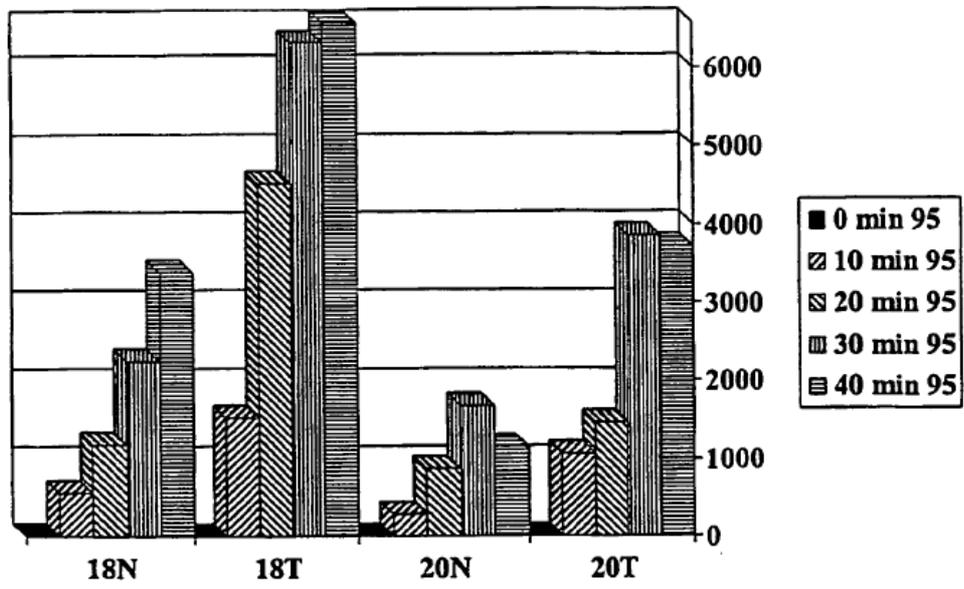
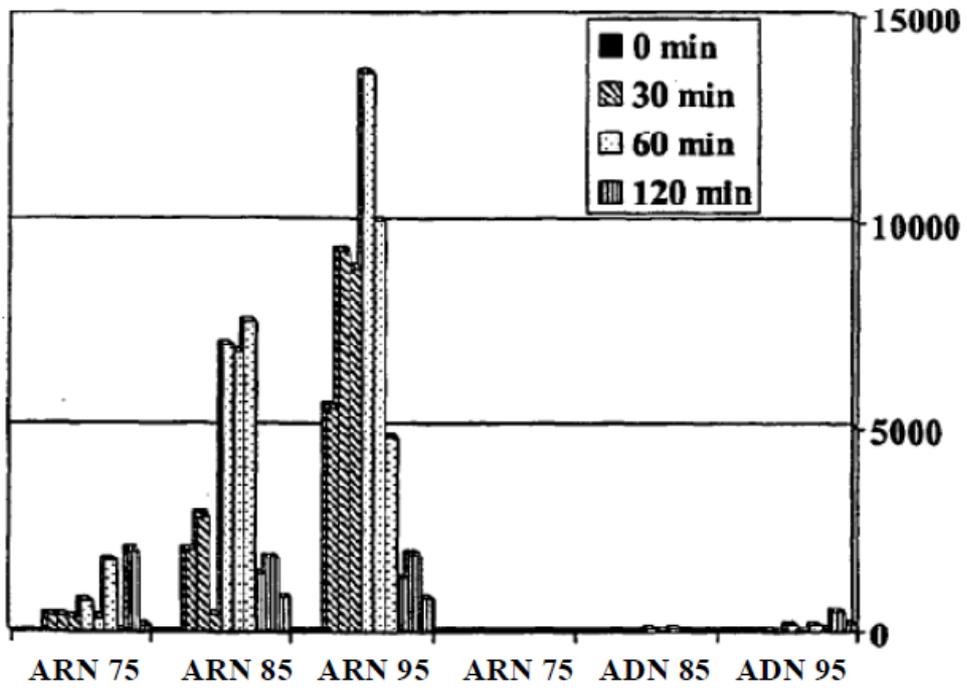
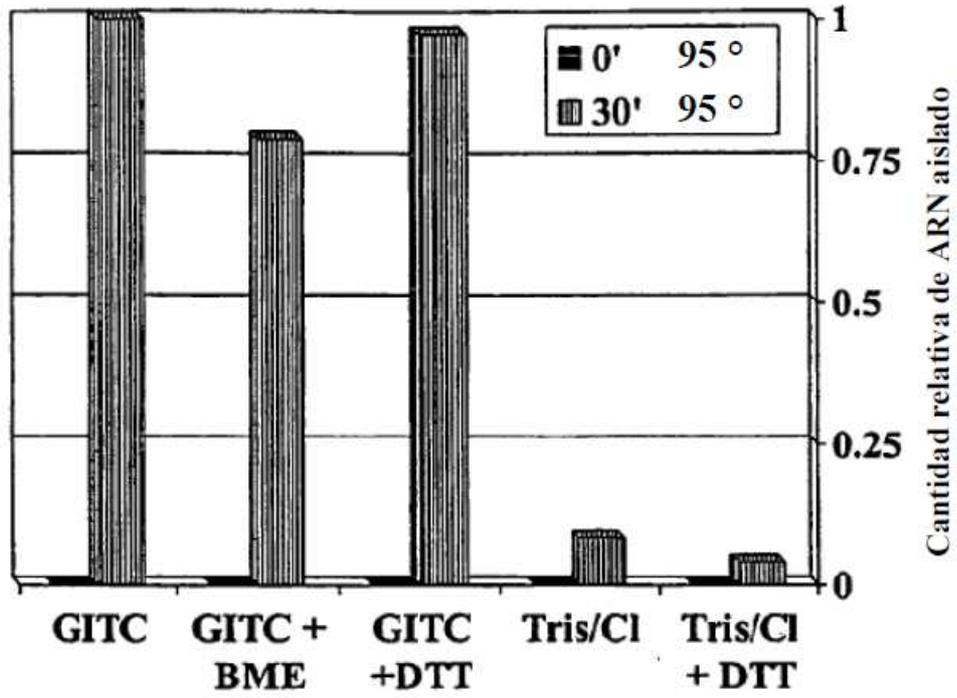


Figura 3



5

Figura 4



5

Figura 5

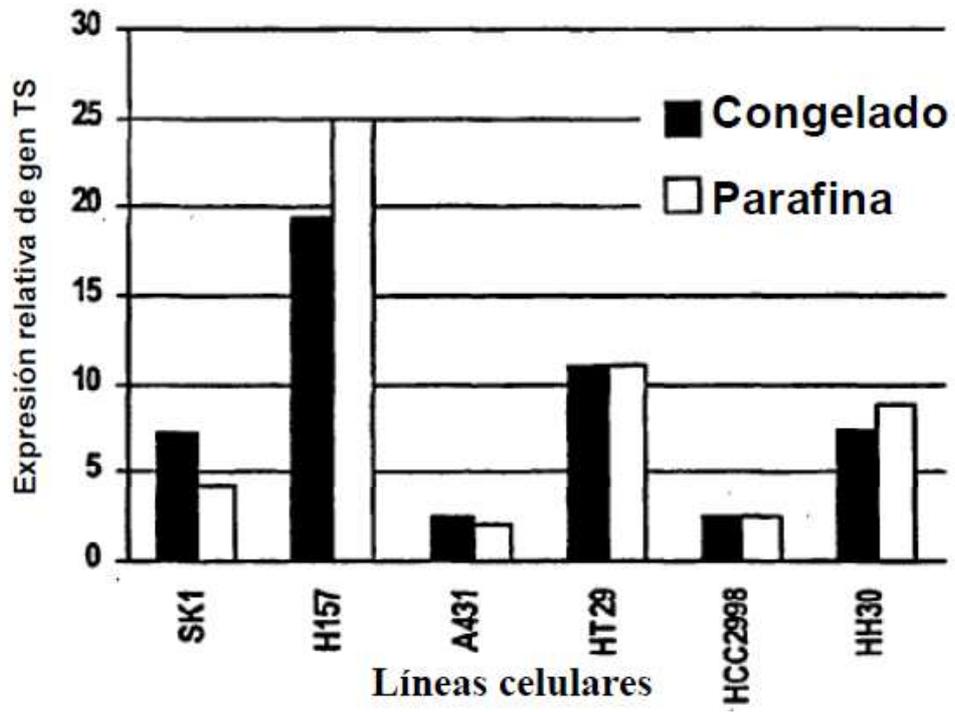


Figura 6

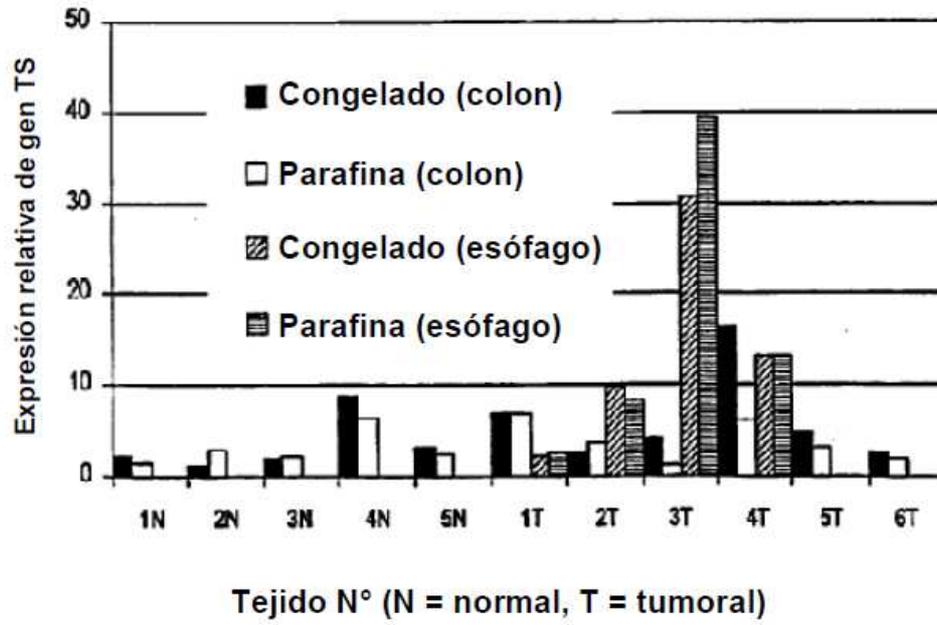


Figura 7

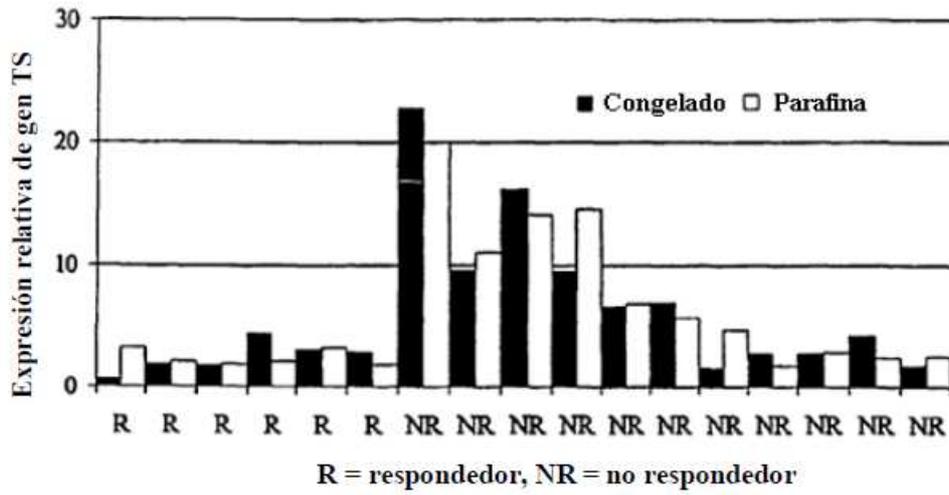
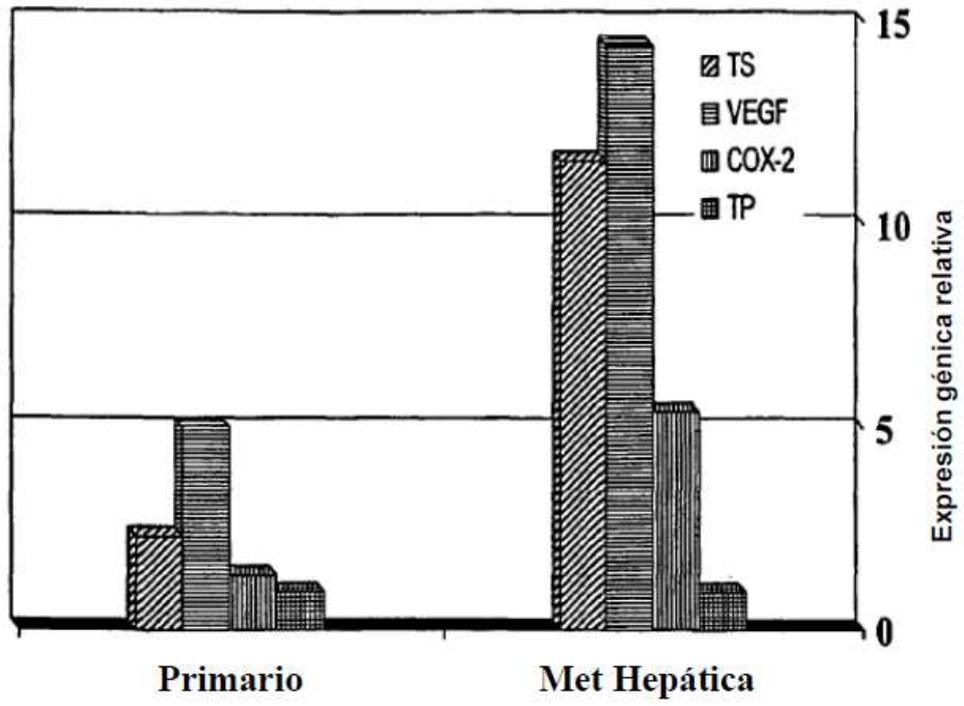


Figura 8



5