

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 414**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10165393 .9**
96 Fecha de presentación: **09.06.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2270151**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2011**

54 Título: **Procedimiento para la desparafinación de muestras biológicas**

30 Prioridad:
01.07.2009 DE 102009031434

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.08.2012

73 Titular/es:
AXAGARIUS GmbH & Co. KG
Kapellenstrasse 26
52355 Düren, DE

72 Inventor/es:
Kirsch, Christoph;
Beyard, Claudia;
Meusel, Markus;
Möller, Klaus y
Radmacher, Edmund

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 386 414 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 la desparafinación de muestras biológicas.

Memoria descriptiva

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para el aislamiento de biomoléculas a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina, a un estuche, que incluye las sustancias necesarias para la realización del procedimiento conforme al invento, así como a la utilización del estuche conforme al invento para la realización del procedimiento de aislamiento.

10 A partir del estado de la técnica se conocen unos procedimientos para el aislamiento de biomoléculas a partir de muestras biológicas fijadas, embebidas en parafina. Por el concepto de una muestra fijada, se entiende en el presente caso una muestra biológica, que se hace estable de una manera conocida mediante un tratamiento, por ejemplo, con una solución de formaldehído, con etanol anhidro o con soluciones alcohólicas de carácter ácido. Para el mejoramiento adicional de la estabilidad en almacenamiento, estas muestras son transferidas a continuación a una parafina. Las muestras tratadas con formalina y embebidas en parafina son designadas también como un material FFPE (acrónimo de Formalin Fixierte, Paraffin Eingebettetes, embebido en parafina, fijado con formalina). Las muestras fijadas y embebidas con ayuda de estos métodos se pueden emplear, por ejemplo, para investigaciones histopatológicas y/o a continuación se pueden conservar durante un período de tiempo muy largo, sin que se llegue a una modificación digna de mención de las biomoléculas contenidas en estas muestras. En particular, incluso después de unos prolongados períodos de tiempo, a partir de estas muestras se pueden extraer todavía los ácidos nucleicos, es decir los ARN y ADN.

25 La obtención de estas biomoléculas a partir de tales muestras biológicas fijadas, embebidas en parafina, es sin embargo costosa y complicada, puesto que las muestras tienen que ser en primer lugar liberadas de la parafina que las rodea. En el caso de las muestras se trata usualmente de unos cortes delgados, cuya proporción de parafina sobrepasa por regla general manifiestamente a la proporción de la muestra. Puesto que la parafina puede perturbar en el caso de la elaboración ulterior de la muestra y del aislamiento de las biomoléculas, o puede reprimirla/o totalmente, en el estado de la técnica se proponen diferentes modos de proceder, por medio de los cuales se puede separar la parafina.

35 En el documento de solicitud de patente internacional WO 2006/039563 se propone tratar previamente a la muestra biológica después del corte, por ejemplo con un microtomo, con xileno, tolueno, isoparafina o limoneno, con el fin de disolver a la parafina. Esta solución se centrifuga a continuación, el disolvente se elimina y la muestra se lava eventualmente con etanol, con el fin de eliminar los restos de disolvente posiblemente presentes. A continuación, la muestra se seca y luego se somete al análisis ulterior.

40 Las múltiples etapas de lavado con etanol, necesarias para la obtención de un material de muestra limpio, son, por una parte, costosas, y además de esto albergan el peligro de que después de la separación por centrifugación, al retirar el material sobrenadante de etanol, ya sean conjuntamente eliminadas por descuido partes del material de la muestra. La misma problemática se establece en el caso de la centrifugación y la retirada del disolvente para la parafina. Esto es particularmente problemático cuando, está a disposición sólo poca cantidad del material de la muestra, porque entonces el material de la muestra apenas es reconocible a simple vista en el disolvente. Puesto que una elaboración limpia de la muestra por medio de este procedimiento requiere mucha habilidad y sobre todo experiencia, apenas es posible realizar una automatización confiable.

50 En el documento de patente de los EE.UU. US 2007/0026432 se describe otro procedimiento para el análisis de muestras biológicas fijadas, embebidas en parafina. Para esto se propone calentar el material de la muestra, embebido en parafina, después de una adición de detergentes, por encima del punto de fusión de la parafina, y dejar a la muestra a continuación enfriarse otra vez por debajo del punto de ebullición de la parafina. La obtención del material de la muestra se efectúa entonces con ayuda de una cánula, que es conducida a través de la capa solidificada de parafina hacia el material de la muestra, que se encuentra situado debajo de ésta. En el caso de este procedimiento es desventajoso el hecho de que, al perforar la capa de parafina, la cánula pueda ser obstruida por la parafina, lo que hace prácticamente imposible una automatización.

55 A partir del documento de patente europea EP 1 743 939 y del documento de solicitud de patente internacional WO 01/46402 A1 se conoce asimismo un procedimiento para realizar la desparafinación de muestras biológicas. En este documento se propone disolver la parafina con ayuda de unos disolventes apropiados tales como benceno, tolueno, etilbenceno, xileno o mezclas de éstos, y separarla mediante centrifugación, realizándose que el sedimento obtenido al realizar la centrifugación se lava a continuación múltiples veces con un disolvente adecuado, con el fin de eliminar la parafina lo más completamente que sea posible.

65 A partir del artículo "Inter-laboratory validation of PCR-based detection of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues" (Validación entre laboratorios de una detección basada en una PCR de Mycobacterium tuberculosis en tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina), Christiane Schewe y

colaboradores, Virchows Archiv, Springer, Berlin, tomo 447, n° 3, septiembre de 2005, páginas 573-585, se conoce un procedimiento para la realización de una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en presencia de un ADN procedente de muestras embebidas en parafina. En este caso, las muestras se reúnen primeramente con xileno, con el fin de disolver a la parafina, a continuación se centrifugan, el material sobrenadante se desecha y el sedimento obtenido se lava con etanol. Tanto la extracción con xileno como también las etapas de lavado con etanol se pueden llevar a cabo una vez o múltiples veces.

A partir del artículo "Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues" (Comparación de los métodos de extracción del ADN para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina) de Sato y colaboradores, Diagnostic molecular pathology, Nueva York, tomo 10, n° 4, diciembre de 2011, páginas 265-271, se conoce un procedimiento análogo a ellos para la eliminación de la parafina a partir de muestras embebidas en parafina, en el que asimismo la parafina se elimina primeramente con xileno, a continuación se centrifuga, el material sobrenadante se desecha, y el sedimento obtenido al realizar la centrifugación se lava una vez o múltiples veces con etanol para la eliminación del xileno.

A partir del documento WO 2006/130632 A2 se conoce un procedimiento para el aislamiento de biomoléculas a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina. En el caso del procedimiento aquí descrito, la muestra que se ha de analizar se calienta primeramente a 50 hasta 85°C durante aproximadamente un minuto hasta sesenta minutos en presencia de un tampón iónico que contiene detergentes. En este caso se forma una mezcla de dos fases. El aislamiento de las biomoléculas se efectúa a continuación a partir de la fase acuosa.

En el artículo "Real-Time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies" (Análisis por PCR en tiempo real de los ADN y ARN extraídos a partir de biopsias fijadas con formalina y embebidas en parafina) de Lehmann y colaboradores, Methods (San Diego), diciembre de 2011, tomo 25, n° 4, diciembre de 2001, páginas 409-418, se describe un procedimiento para el aislamiento de un ARN a partir de muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina. En este caso, las muestras se calientan primeramente a 55°C durante una noche en presencia de una mezcla de un detergente iónico y una proteasa, y luego se ponen en contacto con una solución acuosa y/o con agua, con lo que se forma una mezcla de dos fases, efectuándose a continuación el aislamiento de las biomoléculas a partir de la fase acuosa. También en este caso, mediante el calentamiento en presencia del tampón que contiene el detergente, la parafina se vuelve líquida y las células de la muestra de tejido comienzan a lisarse.

Otro procedimiento adicional para el aislamiento de un ARN a partir de muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina se conoce a partir del artículo "Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification" (Extracción de un ADN, basada en un sistema de microondas, a partir de un tejido embebido en parafina para la amplificación por PCR" de Banerjee y colaboradores, Biotechniques, Informa Healthcare, US, tomo 18, n° 5, enero del 1995. En el caso de este procedimiento, la muestra se calienta primeramente en un sistema de microondas (500 W, durante 30 hasta 60 segundos) en presencia de un detergente no iónico. Después de una centrifugación se elimina la parafina solidificada y la fase acuosa se reúne con un tampón de lisis, que contiene una proteinasa. El subsiguiente aislamiento de las biomoléculas se efectúa a partir de la fase acuosa.

Otro procedimiento adicional para el aislamiento de un ARN a partir de muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina se conoce a partir de documento WO 2008/021419 A2. En el caso del procedimiento expuesto en este documento, la muestra se calienta primeramente a una temperatura situada por encima de 40°C en presencia de una mezcla de un detergente iónico y de una proteasa. En este caso se forma una mezcla de dos fases, efectuándose el subsiguiente aislamiento de las biomoléculas a partir de la fase acuosa.

La misión del presente invento consiste en crear un procedimiento para el aislamiento de biomoléculas a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina, que permita una obtención lo más cuantitativa que sea posible de las biomoléculas a partir de la muestra, que evite pérdidas. tales como las que son posibles mediante la retirada de una fase orgánica con la parafina disuelta en ella, y que sea adecuado además para una elaboración automática de las muestras.

El problema planteado por esta misión se resuelve conforme al invento mediante un procedimiento para el aislamiento de biomoléculas a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina, que comprende las siguientes etapas de:

Poner en contacto la muestra

- a) con un disolvente no miscible con agua y disolver la parafina en este disolvente mediando formación de una fase orgánica líquida, y
- b) con una solución acuosa de por lo menos una sustancia para lisis y/o con agua y por lo menos una sustancia para lisis mediando formación de una fase acuosa;

aislar las biomoléculas a partir de la fase acuosa.

5 Constituye el fundamento del presente invento el reconocimiento de que para el aislamiento de las biomoléculas a partir de una muestra embebida en parafina, para la disolución de la parafina, esta muestra se puede reunir con un disolvente no miscible con agua, que forma en común con la parafina una fase orgánica, que puede permanecer en el recipiente para la muestra durante la elaboración ulterior de esta muestra. Por lo tanto, una eliminación del disolvente es tan poco necesaria como la realización de unas sucesivas etapas de lavado, con lo que se puede reducir considerablemente el gasto para el procedimiento. Mediante la renuncia a las múltiples etapas de lavado previstas con anterioridad en el estado de la técnica en el caso del empleo de disolventes, se puede excluir amplísimamente el peligro de la pérdida de material de la muestra.

10 El procedimiento conforme al invento asegura, además, que la fase orgánica a base de una parafina y un disolvente no miscible con agua sea líquida a las temperaturas usuales del entorno. Al realizar la toma de una muestra por medio de la fase orgánica, tal como, por ejemplo, mediante una cánula o pipeta conducida a través de ésta, se puede excluir por consiguiente una obstrucción causada por parafina. El procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo, por consiguiente, también de un modo automático mediando empleo de unos correspondientes aparatos autómatas de pipeteo. El hecho de que el procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo también sin etapas de centrifugación facilita adicionalmente una automatización. En particular, la fase orgánica es líquida a una temperatura de $\leq 25^{\circ}\text{C}$, de manera preferida a $\leq 20^{\circ}\text{C}$ o a $\leq 15^{\circ}\text{C}$.

15 Con ayuda del procedimiento conforme al invento se pueden aislar en principio todos los tipos de biomoléculas a partir de muestras biológicas. Éstos son, por ejemplo, ácidos nucleicos y/o proteínas. Como ácidos nucleicos entran en cuestión unos ARN y ADN con diversas longitudes de cadena, en particular con más que quince nucleótidos, tales como, por ejemplo unos ARN o ADN monocatenarios y bicatenarios bacterianos, víricos, humanos, animales o vegetales, en particular ADN genómicos, ADN mitocondriales, plásmidos, ARNm (mensajeros), ARNt (de transferencia), ARNr (ribosomal), ARNmi (micro ARN) y otras especies cortas de ARN, en particular con una longitud de cadena de 15 a 25 nucleótidos. Todas las biomoléculas antes mencionadas se pueden aislar individualmente o también en una combinación arbitraria mediante el procedimiento conforme al invento. Las muestras se presentan, por ejemplo, en forma de cortes delgados de la muestra biológica, embebida en parafina, tales como los que se obtienen mediante un microtomo.

20 Por el concepto de "un disolvente no miscible con agua" se entiende un disolvente, que a 25°C en el caso de una relación de mezcla de 1:1 con agua, forma dos fases separadas una de otra. Los disolventes empleados dentro del marco del presente invento deberían poseer de manera ventajosa, además de esto, unas buenas propiedades de disolución en lo que respecta a las parafinas utilizadas usualmente para la imbibición de muestras biológicas. A este fin, para realizar la disolución de 1 mg de una parafina a 25°C debería ser necesaria una cantidad de disolvente de no más que 500 μl , de manera preferida de no más que 300 μl , de manera especialmente preferida de no más que 150 μl .

25 Por el concepto de una "sustancia para lisis", dentro del sentido del presente invento se entiende un compuesto, que está en la situación de poner en libertad biomoléculas a partir del material de la muestra biológica. Éstas pueden ser una o varias enzimas, por ejemplo proteasas.

30 Como sustancias para lisis se pueden utilizar también una o varias sales caotrópicas. Para esta finalidad entran en cuestión sobre todo sales de guanidinio tales como tiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de sodio o de potasio, yoduro de potasio, percloratos o sales de bario.

Dentro del sentido del invento se pueden emplear asimismo otras sustancias que apoyan a la lisis.

35 Las sustancias para lisis antes mencionadas, es decir p.ej. enzimas o respectivamente sales caotrópicas, se pueden emplear de manera alternativa o en combinaciones arbitrarias. Conforme al invento, está previsto que la sustancia para lisis ya se presente en forma de una solución acuosa, o que mediante adición de agua y de la sustancia para lisis se forme *in situ* una solución acuosa. En ambos casos, se llega por consiguiente a la formación de una fase acuosa.

40 Siempre y cuando dentro del marco del procedimiento conforme al invento se empleen tanto enzimas como también sales caotrópicas, es conveniente que se añadan primeramente la o respectivamente las enzimas así como en caso deseado una pequeña cantidad de una sal caotrópica y a continuación se incube. En una segunda etapa se puede aumentar entonces la concentración de la sal caotrópica hasta llegar a la magnitud deseada o, cuando primeramente sólo se hubieron añadido enzimas, añadir en esta etapa la cantidad total de una sal caotrópica. Esto es válido tanto para el caso de que se empleen soluciones acuosas de estas sustancias así como también en el caso del empleo de agua y de sustancias sólidas para lisis. De esta manera se puede evitar una posible reducción de la actividad de la o las enzimas mediante una concentración inicialmente demasiado alta de la sal caotrópica.

45 En el caso de unas muestras biológicas, que hubieran sido fijadas mediante una solución de formalina, en la etapa b) se debería emplear convenientemente una sustancia para lisis, que apoye la eliminación de las reticulaciones

resultantes por medio del tratamiento con formalina, tales como, por ejemplo enzimas y en particular una proteasa. En el caso de unas muestras biológicas fijadas con etanol o con soluciones alcohólicas de carácter ácido, la adición de una sal caotrópica en la etapa b) del procedimiento puede ser suficiente para poner en libertad a las biomoléculas contenidas en la muestra biológica.

5 Dentro del marco del procedimiento conforme al invento es posible llevar a cabo la etapa a) antes de, después de o al mismo tiempo que la etapa b). Convenientemente, la etapa a) se lleva a cabo, sin embargo, antes de la etapa b), puesto que de esta manera se puede eliminar la parafina con respecto de la muestra biológica, antes de que se prosiga con la lisis de la muestra en la etapa b).

10 En una forma de realización del procedimiento conforme al invento, el disolvente no miscible con agua tiene una densidad más pequeña que el agua y/o que la solución acuosa. La densidad del disolvente no miscible con agua es en particular $\leq 0,95 \text{ g/cm}^3$ o $\leq 0,90 \text{ g/cm}^3$. En el caso de la adición de un tal disolvente a la muestra biológica embebida en parafina, ésta forma como fase orgánica un material sobrenadante, después de una subsiguiente adición del agua o respectivamente de la solución acuosa para lisis. Puesto que la muestra biológica posee usualmente una densidad, que o bien es igual a o mayor que la del agua, el material de la muestra se encuentra en la fase acuosa, con lo que el proceso de lisis de la muestra se acelera mediante una mejor acción de la sustancia para lisis contenida en la fase acuosa, y transcurre de una manera más completa. Para esto, se puede sacudir también la mezcla, en el caso de que la muestra flote en la superficie del líquido debido a la tensión superficial. Además de ello, las muestras biológicas son por regla general hidrófilas y por lo tanto pueden ser hidratadas fácilmente, lo que facilita asimismo la transición desde la fase orgánica a la fase acuosa. Esto es válido también en el caso de que el disolvente no miscible con agua tenga una densidad más alta que la del agua o respectivamente que la de la solución acuosa.

25 El material sobrenadante formado por la fase orgánica protege al mismo tiempo a la muestra frente a la acción del oxígeno del aire, que puede conducir a una modificación oxidativa de las biomoléculas que se han de aislar. Puesto que los recipientes para muestras terminan en forma puntiaguda en la zona del fondo, es posible además una retirada más fácil de la fase acuosa.

30 El aislamiento de las biomoléculas a partir de la fase acuosa se puede efectuar de un modo en sí conocido. Para esto, las biomoléculas que se han de aislar son fijadas, por ejemplo, a un soporte sólido. Para esto se pueden emplear unas membranas de sílice o partículas sueltas de sílice, partículas de polímeros o de vidrio o perlas (en inglés beads) magnéticas. Para realizar esta etapa, o bien la fase acuosa se puede extraer desde el recipiente para la muestra y llevar sobre la fase sólida, para lo que se ajustan eventualmente todavía unas adecuadas condiciones de fijación. Esto se consigue, por ejemplo, mediante adición a la fase acuosa de una sal caotrópica y/o de uno o varios alcoholes con hasta cuatro átomos de carbono, tales como en particular metanol o etanol. El ajuste de las condiciones de fijación se puede efectuar de manera preferida en presencia de la fase orgánica.

40 Alternativamente a esto, a la mezcla de dos fases que se compone de una fase orgánica y de una fase acuosa, se le puede añadir el soporte sólido, por ejemplo en forma de perlas magnéticas, pudiéndose mejorar también en este caso las condiciones de fijación en dependencia de la calidad de la superficie de las perlas p.ej. mediante adición de sales caotrópicas y/o de los alcoholes arriba mencionados. Las biomoléculas se fijan entonces al soporte sólido en la mezcla de dos fases y pueden ser separadas seguidamente.

45 No obstante, el aislamiento de las biomoléculas a partir de la fase acuosa no está vinculado obligatoriamente con la presencia de una fase sólida. Los ácidos nucleicos se pueden precipitar o extraer, por ejemplo, a partir de la fase acuosa con unos procedimientos en sí conocidos.

50 En otra forma de realización del procedimiento conforme al invento, el disolvente no miscible con agua es líquido a $\leq 25^\circ\text{C}$, en particular a $\leq 20^\circ\text{C}$, de manera preferida a una temperatura de $\leq 15^\circ\text{C}$, de manera especialmente preferida a $\leq 10^\circ\text{C}$. De esta manera se puede asegurar que la fase orgánica permanezca en una forma líquida también en el caso de unas temperaturas más frías del entorno, incluso después de una disolución de la parafina.

55 En un perfeccionamiento del procedimiento conforme al invento, el disolvente no miscible con agua se escoge entre compuestos hidrocarbonados aromáticos con 6 hasta 30 átomos de carbono, compuestos hidrocarbonados alifáticos con 10 hasta 30 átomos de carbono, en particular entre alcanos o alquenos. Se adecuan especialmente unos compuestos hidrocarbonados lineales con 9 hasta 15 átomos de carbono, en particular con 12 hasta 15 átomos de carbono o mezclas de éstos. En particular, los compuestos hidrocarbonados lineales precedentemente mencionados están saturados o insaturados una vez. Éstos son, a modo de ejemplo, n-nonano, n-decano, n-undecano, n-dodecano, n-tridecano y de manera especialmente preferida n-tetradecano, n-pentadecano así como n-pentadeceno. No obstante, también se pueden emplear disolventes técnicos tales como un gasóleo biológico (biodiesel), un gasóleo (aceite diesel) o respectivamente un aceite de calefacción, una parafina muy fluida, un aceite blanco, un petróleo, un queroseno o un sinarol. En el caso del sinarol se trata de una mezcla de hidrocarburos de C_{14} - C_{19} con un intervalo de puntos de ebullición de 250°C - 330°C .

65

Además de esto, se pueden emplear ácidos alcanóicos o alquenoicos con 2 hasta 20, en particular 6 hasta 18 átomos de carbono y sus derivados, y alcoholes aromáticos o alifáticos con 6 hasta 12 átomos de carbono. Asimismo, son posibles unas mezclas de todas las sustancias antes mencionadas. Ejemplos de ácidos alcanóicos empleables son los ácidos octanoico, nonanoico o decanoico.

5 Los compuestos hidrocarbonados alifáticos pueden ser lineales, ramificados, cíclicos, saturados o insaturados, así como pueden componerse de unas mezclas de éstos. Siempre y cuando que se empleen unos compuestos hidrocarbonados aromáticos con sustituyentes alifáticos, éstos pueden ser asimismo lineales, ramificados, cíclicos, saturados o insaturados. Ejemplos de hidrocarburos cíclicos o respectivamente aromáticos empleables son pineno y limoneno, por una parte, así como xileno y cimeno, por otra parte.

Asimismo es posible que los compuestos hidrocarbonados aromáticos y/o alifáticos lleven heteroátomos, tales como, por ejemplo, azufre, nitrógeno, oxígeno, flúor, cloro, bromo y/o yodo.

15 Derivados preferidos de ácidos alcanóicos o alquenoicos son sus ésteres, en particular sus ésteres alquílicos a partir de ácidos carboxílicos lineales y de alcoholes lineales con en cada caso uno hasta 14 átomos de carbono, teniendo los ésteres en particular 5 hasta 20 átomos de carbono. Éstos son, por ejemplo, el éster butílico de ácido acético, el éster etílico de ácido propiónico, el éster pentílico de ácido propiónico, el éster octílico de ácido propiónico, el éster decílico de ácido propiónico, el éster decílico de ácido butanoico, el éster octílico de ácido pentanoico, el éster hexílico de ácido octanoico, el éster octílico de ácido octanoico, el éster butílico de ácido decanoico, así como el éster butílico de ácido dodecanoico.

20 Por lo demás, también son empleables unos ésteres de ácidos orgánicos saturados y/o ramificados, tales como, por ejemplo, el éster isoamílico de ácido octanoico, o también unos ésteres de ácidos orgánicos plurivalentes, tales como el acetil - citrato de tributilo, el éster dietílico de ácido adipico o el éster dietílico de ácido malónico.

30 Para el mejoramiento de una manifiesta separación de fases entre una fase orgánica y una fase acuosa es ventajoso que los disolventes orgánicos empleados tengan un valor de K_{OW} (coeficiente de reparto entre n-octanol y agua) de $> 1,0$, en particular de $\geq 2,0$. Se prefieren especialmente unos disolventes con un valor de K_{OW} de $\geq 4,0$, en particular de $\geq 5,0$ o de $\geq 6,0$. En el caso del empleo de tales disolventes, se alcanza una manifiesta separación entre una fase orgánica y una fase acuosa también a unas temperaturas elevadas o al añadir una sal caotrópica o unos alcoholes tales como etanol o metanol, con lo que se puede excluir amplísimamente un arrastre de biomoléculas dentro de la fase orgánica. Unos disolventes con un valor de K_{OW} de $\geq 5,0$ son, por ejemplo, n-nonano, n-decano, n-undecano, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano así como los correspondientes alquenos, en particular n-pentadeceno.

35 A la fase acuosa se le pueden añadir, junto a la sustancia para lisis o respectivamente la sal caotrópica, todavía otras sustancias, tales como, por ejemplo, por lo menos una sustancia tamponadora y/o por lo menos un alcohol con 1 hasta 4 átomos de carbono y/o por lo menos un agente de reducción y/o un tampón y/o reactivos para la supresión de los enlaces covalentes o de las modificaciones de la biomolécula, que se han provocado por un tratamiento con formalina, tales como cloruro de amonio y/o alquilaminas.

40 Unas sustancias tamponadoras adecuadas son, por ejemplo, Tris/HCl, un tampón de fosfato, un tampón de borato, un tampón de PBS, un tampón de citrato, un tampón de MES o un tampón de HEPES. Unos alcoholes con 1 hasta 4 átomos de carbono son, por ejemplo, metanol, etanol, n-/iso-propanol, butanoles o respectivamente mezclas de estos alcoholes. Como agentes de reducción se pueden emplear DTT, beta-mercaptoetanol, TCEF u otros agentes de reducción.

50 En otra forma de realización del procedimiento conforme al invento, la disolución de la parafina se lleva a cabo mediando calentamiento, en particular mediando calentamiento a una temperatura de 35 a 70°C, de manera preferida de 40 a 60°C. Mediante el calentamiento se favorece una disolución más rápida de la parafina en el disolvente no miscible con agua, pudiéndose excluir amplísimamente una modificación térmica del material de la muestra, por medio de las temperaturas moderadas. Además de esto, en el caso de un empleo simultáneo de una sustancia para lisis, este calentamiento contribuye a disolver las reticulaciones en muestras biológicas fijadas con formalina.

55 En un perfeccionamiento del procedimiento conforme al invento, la etapa b) del procedimiento se lleva a cabo mediando calentamiento, en particular a una temperatura de 70 a 100°C. El calentamiento en esta etapa se puede llevar a cabo tanto antes de, durante así como también después de la adición de la solución acuosa de la sustancia para lisis o respectivamente del agua y de la sustancia para lisis. Mediante el calentamiento se puede acelerar la lisis de la muestra o respectivamente hacerla transcurrir en una extensión más completa, con lo que las biomoléculas que se han de aislar puedan ser puestas en libertad más rápidamente o respectivamente de la manera más cuantitativa que sea posible a partir de la muestra biológica.

60 En el caso de la elección del disolvente no miscible con agua, es ventajoso que éste tenga un punto de ebullición bajo una presión normal de menos que 150°C, en particular de menos que 160°C. De esta manera se evita que el

disolvente orgánico añadido, durante el proceso, en particular al realizar un calentamiento, se evapora de un modo demasiado fuerte y que la parafina se quede atrás otra vez sin disolver. Además de esto, mediante una evaporación del disolvente orgánico puede resultar una molestia por olor o incluso un perjuicio para la salud. Además, los vapores de los disolventes son con frecuencia también fácilmente inflamables. Mediante la elección de un disolvente con un punto de ebullición relativamente alto se reduce su puesta en libertad en forma gaseosa a una temperatura establecida, lo que disminuye el peligro de incendio. La pequeña presión de vapor de tales disolventes permite también cerrar de manera intermedia el recipiente para la muestra, sin que éste amenace de explotar al realizar el calentamiento.

Para el mejoramiento ulterior de la seguridad de manipulación se emplean unos disolventes no miscibles con agua, que tienen un punto de inflamación de por lo menos 40°C, en particular de por lo menos 50°C, de manera preferida de por lo menos 60°C, de manera aún más preferida de por lo menos 70°C o incluso de por lo menos 80°C. Éstos son, por ejemplo, acetil - citrato de tributilo, éster dietílico de ácido adípico, decanol, éster dietílico de ácido malónico, alcohol bencílico o mezclas de éstos. Se prefieren, además de esto, n-dodecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-pentadeceno, un gasóleo biológico, un sinarol o mezclas de éstos, que se distinguen adicionalmente todavía por un comportamiento especialmente bueno de separación de fases con respecto a la fase acuosa.

El aislamiento de la biomolécula a partir de la fase acuosa se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una deposición de la biomolécula junto a una fase sólida, en caso deseado seguida por una o varias etapas de lavado. Como fase sólida entran en cuestión, por ejemplo, partículas poliméricas orgánicas, y/o materiales de soporte minerales tales como fibras de cuarzo, gel de sílice, un vidrio, óxido de aluminio, zeolitas, dióxido de titanio y/o dióxido de zirconio. Estos soportes se pueden presentar en forma de partículas, sobre todo como partículas magnéticas y/o magnetizables, en particular como perlas magnéticas. Por lo demás, el soporte se puede emplear en forma de fibras, esponjas, espumas, en particular en forma de fritas (= materiales sinterizados) o membranas. De manera preferida, la fase sólida está estructurada como una columna cromatográfica. En este caso, la fase sólida puede constituir el empaquetamiento de la columna y/o una membrana, para lo que se utilizan en particular las partículas poliméricas orgánicas y/o los materiales de soporte minerales que arriba se han mencionado.

Como una solución de lavado para las etapas de lavado antes mencionadas se pueden utilizar, por ejemplo, tampones altamente salinos y/o mezclas altas en alcohol. Por el concepto de "altas en alcohol" se entienden unas mezclas de un alcohol y agua con un alto contenido de alcohol de por ejemplo 70 u 80 % en volumen. Como alcoholes entran en consideración, por ejemplo, metanol, etanol, n-iso-propanol, butanoles o respectivamente mezclas de estos alcoholes. Las mezclas altas en alcohol pueden contener además pequeñas cantidades de sustancias tamponadoras.

La deposición de las biomoléculas junto a la fase sólida se puede conseguir mediante el recurso de que la fase acuosa se pone totalmente en contacto con la fase sólida y la fase orgánica se pone en contacto por lo menos parcialmente con la fase sólida. En caso de emplearse unos materiales de sílice como una fase sólida, para el mejoramiento de las condiciones de fijación la fase acuosa puede ser mezclada previamente con una sal caotrópica y/o con un alcohol que tiene de uno hasta cuatro átomos de carbono, tal como, por ejemplo, metanol o etanol. Mediante utilización de un disolvente orgánico con una densidad que es más pequeña que la del agua, se puede proceder en este contexto de tal manera que la fase acuosa que se encuentra situada por debajo de la fase orgánica en un recipiente para muestras, que termina en forma puntiaguda por el lado del fondo, sea retirada por medio de una cánula o pipeta que se conduce hasta inmediatamente por encima del fondo, hasta que también sea transferida conjuntamente una parte de la fase orgánica sobrenadante. De esta manera se puede conseguir una transferencia lo más completa que sea posible de las biomoléculas fuera del recipiente para la muestra. El volumen separado por succión de esta manera se puede añadir a continuación a una columna cromatográfica, con el fin de fijar las biomoléculas a los soportes sólidos. Unas contaminaciones, que asimismo se fijan en estas condiciones a los soportes sólidos, se pueden eliminar en caso deseado por medio de una o varias etapas de lavado. Para esto, se pueden emplear tampones altamente salinos y/o una mezcla alta en alcohol, o también otras soluciones conocidas para un experto en la especialidad para estas finalidades.

En el caso del empleo de partículas magnéticas o magnetizables, en particular de perlas magnéticas, éstas pueden ser añadidas también directamente al sistema de dos fases constituido a base de una fase orgánica y de una fase acuosa, y la fase acuosa se puede separar seguidamente con las partículas. En caso de que la fase orgánica tuviese una densidad más alta que la de la fase acuosa, las partículas se separarán en esta etapa con la fase orgánica. Con la adición de las partículas, para el mejoramiento de las condiciones de fijación, se puede reunir la fase acuosa previamente todavía con una sal caotrópica y/o con un alcohol que tiene de uno hasta cuatro átomos de carbono, y/o la separación de las partículas cargadas puede ser apoyada mediante una centrifugación.

Según una forma adicional de realización del procedimiento conforme al invento, la fase acuosa y/o la fase orgánica está(n) ampliamente exenta(s) de agentes tensioactivos, en particular de agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos y/o anfóteros. De esta manera se puede asegurar una manifiesta separación de fases entre la fase acuosa y la fase orgánica.

Otro objeto adicional de la presente solicitud concierne a un estuche para el aislamiento de la biomolécula a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina, en particular una muestra de tejido, que contiene por lo menos los siguientes componentes:

- 5 a) un disolvente no miscible con agua y
b) por lo menos una sustancia para lisis y/o una solución acuosa de por lo menos una sustancia para lisis.

10 En este estuche, los mencionados componentes se encuentran situados de manera preferida en diferentes recipientes. Cuando la sustancia para lisis ya se presenta como una solución acuosa, entonces en el caso de la utilización del estuche se puede renunciar a la otra adición de agua.

15 En una realización ventajosa del estuche, éste contiene unas instrucciones para el procedimiento, en las que se ha impreso la realización del procedimiento conforme al invento. Esto garantiza una utilización lo más exenta de errores que sea posible del estuche conforme al invento.

La presente solicitud se refiere además a la utilización de un estuche conforme al invento para el aislamiento de biomoléculas a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina.

20 En lo sucesivo se describe más detalladamente el procedimiento conforme al invento con ayuda de Ejemplos de realización.

Ejemplo 1: Aislamiento de un ARN procedente de unas muestras FFPE de hígado de rata

25 Con el fin de comparar el procedimiento conforme al invento con los procedimientos conocidos a partir del estado de la técnica, mediando empleo de xileno para la eliminación de la parafina, unos cortes de muestras con el mismo espesor de aproximadamente 7,5 µm de muestras FFPE de hígado de rata son sometidos a los correspondientes protocolos de procedimiento. Como fase sólida para el aislamiento de los ácidos nucleicos se utilizan unas columnas de fijación disponibles comercialmente con una membrana de sílice (NucleoSpin RNAXS, de MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemania). Estas columnas se pueden introducir en unos tubos colectores adecuados y pueden ser procesadas fácilmente en cualquier centrifugadora usual en el comercio.

Protocolo: Desparafinación con xileno (estado de la técnica)
1 - 3 cortes FFPE de 7,5 µm de espesor por cada preparación
Añadir 1 ml de xileno
Incubar durante 2 min a la temperatura ambiente, 25°C (TA), tratamiento en un vórtice durante 10 segundos
Centrifugar a la velocidad máxima durante 2 min (aproximadamente 14.000 x g)
Separar por pipeteo el material sobrenadante y desecharlo
Añadir 1 ml de etanol (~ 98 %)
Tratar en un vórtice durante 2 segundos
Centrifugar a la velocidad máxima durante 2 min
Separar por pipeteo el material sobrenadante y desecharlo
Secar a 60°C durante 3-10 min con la tapadera abierta (o durante más tiempo hasta que se haya evaporado totalmente el etanol)
Añadir 100 µl de un tampón de lisis (GITC 3 M, Tris 10 mM, pH 7,0)
Añadir 10 µl de la proteinasa K (20 mg/ml)
Tratar en un vórtice durante 10 segundos
Centrifugar brevemente
Si hubiesen quedado adheridos restos de la muestra a las paredes del recipiente, éstos son devueltos por enjuague con precaución a la solución. Añadir y separar por pipeteo la solución para realizar la homogeneización.
Digerir con la proteinasa K a 60°C durante 15 min. Sacar el recipiente desde la incubadora y tratar en un vórtice durante 5 segundos. Si todavía fuesen visibles restos de tejido, entonces la incubación debería prolongarse durante un período de tiempo de hasta 3 h.
Añadir 100 µl de cloruro de amonio 200 mM
Tratar en un vórtice
Incubar a 90°C durante 15 min. Dejar enfriar a la TA durante aproximadamente 2 min
Añadir 200 µl de etanol (al 96 - 100 %)
Mezclar
Centrifugar brevemente (aproximadamente durante 1 segundo a 1.000 x g)
Añadir y separar por pipeteo 3 veces la mezcla e introducir la muestra (410 µl) en la columna de fijación NucleoSpin RNA XS y continuar con el protocolo clásico (véase más abajo).

Protocolo: Desparafinación conforme al invento	
1 - 3 cortes FFPE de 7,5 µm de espesor por cada preparación	
Añadir 0,3 ml de pentadecano	
Incubar durante 2 min a 60°C y a continuación tratar inmediatamente en un vórtice (con el fin de fundir y disolver la parafina)	
Dejar enfriar a la temperatura ambiente (durante 5 min)	
Añadir 100 µl de un tampón de lisis (GITC 3 M, Tris 10 mM, pH 7,0)	
Tratar en un vórtice con el fin de transferir el tejido desde la fase orgánica superior a la fase acuosa inferior	
Centrifugar durante 1 min con el número máximo de g (= aceleración de la gravedad) con el fin de apoyar la separación de las fases y la transferencia del tejido a la fase acuosa.	
Añadir 10 µl de la proteinasa K (20 mg/ml) a la fase acuosa. Mezclar la fase acuosa mediante adición y separación por pipeteo. No mezclar la fase acuosa con la fase orgánica.	
Digerir con la proteinasa a 60°C durante 15 min. Sacar el recipiente desde la incubadora y tratar en un vórtice durante 5 segundos. Si todavía fuesen visibles restos de tejido, entonces la incubación debería proseguirse durante un período de tiempo de hasta 3 h.	
Añadir 100 µl de cloruro de amonio 200 mM a la fase acuosa	
Tratar en un vórtice con el fin de mezclar el cloruro de amonio con la fase acuosa. Eventualmente efectuar una breve centrifugación con el fin de apoyar la separación de las fases.	
Incubar a 90°C durante 15 min. Dejar enfriar a la TA durante aproximadamente 2 min.	
Añadir 200 µl de etanol (96 - 100 %)	
Mezclar	
Centrifugar brevemente (aproximadamente durante 1 segundo 1.000 x g)	
Mezclar 3 veces, añadir y separar por pipeteo e introducir las muestras (410 µl) en la columna de fijación NucleoSpin RNA XS y continuar con el protocolo de aislamiento del ARN (véase más abajo). Los restos de la fase orgánica que son transferidos concomitantemente de manera eventual no son críticos.	

Protocolo de aislamiento de ARN después de haber realizado una desparafinación con xileno y una desparafinación conforme al invento	
1	Cargar las columnas de centrifugación y centrifugar a 8.000 x g durante 30 s
2	Desechar s tubos colectores con el material que ha pasado por la columna
3	Colocar una columna de centrifugación en un nuevo tubo colector (2,0 ml)
4	Añadir 100 µl de etanol al 75 %
5	Centrifugar a 11.000 x g durante 30 s
6	Añadir 25 µl de DNasa
7	Incubar a 20 - 25°C durante 15 min
8	Añadir 100 µl de GITC 2 M, Tris 10 mM, pH 7,0 , etanol al 75 %
9	Incubar a 20 - 25°C durante 2 min
10	Centrifugar a 11.000 x g durante 30 s
11	Añadir 400 µl de etanol al 75 %
12	Centrifugar a 11.000 x g durante 30 s
13	Desechar el tubo colector con el material que ha pasado por la columna
14	Introducir la columna de centrifugación en un nuevo tubo colector (2,0 ml)
15	Añadir 200 µl de etanol al 75 %
16	Centrifugar a 1.000 x g durante 2 min
17	Desechar el tubo colector con el material que ha pasado por la columna
18	Introducir la columna de centrifugación en un nuevo tubo colector (1,5 ml)
19	Añadir 10 µl de agua exenta de RNasa
20	Centrifugar a 11.000 x g durante 30 segundos. Recoger el material eluido en el tubo colector y almacenar el ARN extraído a -20 o -70°C.

El ARN aislado se cuantificó de la siguiente manera mediante una qRT-PCR PCR de fase inversa cuantitativa:

5	Diana:	HPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa)
	Tamaño del amplicón:	101 pb (= pares de bases)
	Especificidad:	para ARNm o respectivamente ADNc de rata
	Instrumento de PCR:	LightCycler
10	Estuche:	Sigma SYBR Green Quantitative RT-PCR Kit (#QR0100)
	Cantidad del molde:	2 µl

ES 2 386 414 T3

Por cada tanda de reacción se mezclan los siguientes componentes:

Agua	3 µl
SYBR Green Taq Ready Mix for QRT-PCR (procedente del estuche: Sigma SYBR Green Quantitative RT-PCR Kit (#QR0100))	10 µl
DuraScript RT diluido a 1:20 (procedente del estuche arriba mencionado)	1 µl
Cebador A (10 µM = 10 pmol/µl) 5'-GCAGACTTTGCTTTCCTTGGT-3'	2 µl
Cebador B (10 µM = 10 pmol/µl) 5'-CTGGCCTGTATCCAACACTTC-3'	2 µl
Material eluido de ARN	2 µl
Volumen total	20 µl

5 La tanda de reacción se transfiere a un capilar de LightCycler (de la entidad Roche). La reacción y el análisis se llevan a cabo con el siguiente programa en el Instrumento LightCycler (de la entidad Roche):

	Diana temperatura (°C)	Incubación tiempo (segundos)	Temperatura velocidad de transición (°C/segundo)
Desnaturalización	48	1.800	20
Desnaturalización	94	30	20
Amplificación (40 ciclos)	94	5	20
	58	1	20
	72	2	20
	81	3	20
Curva de fusión	95	0	20
	65	10	20
	95	0	0,1
Enfriamiento	40	30	20

10 En la Figura 1 se representa el resultado de la medición. Los valores de Cp obtenidos, que constituyen una medida de la cantidad obtenida de ARN, muestran los mismos resultados para los dos métodos. Por consiguiente, el rendimiento de ARN para el procedimiento conforme al invento corresponde amplísimamente al de la cantidad obtenida de la muestra que había sido tratada previamente mediante la desparafinación con xileno, que es esencialmente más complicada y costosa.

15 Ejemplo 2: Aislamiento de ARN y ADN a partir de muestras FFPE de hígado de rata

15 En el caso de este ensayo, junto al ARN, se aísla también el ADN a partir de las muestras, permaneciendo inalterados los protocolos descritos en el Ejemplo 1 para realizar la desparafinación mediante el método con xileno y el procedimiento conforme al invento. En lo que respecta a la extracción de los ácidos nucleicos, en el Ejemplo 2 se prescinde de la digestión con la ADNasa y en lugar de esto se lleva a cabo una elución selectiva del ADN genómico.

20

Protocolo: Aislamiento de ADN y ARN	
Desparafinar con xileno y proceder según el procedimiento conforme al invento en el Ejemplo de realización 1	
Cargar la columna de fijación, centrifugar y desechar el tubo colector con el material que ha pasado por la columna.	
Introducir la columna de fijación con los ARN y ADN fijados en un nuevo tubo colector (2,0 ml). Desviándose del Ejemplo de realización 1, para realizar la elución del ADN se procede de la siguiente manera:	
Etapas para ADN	Añadir 100 µl de CaCl ₂ 10 mM, etanol al 80 %, Tris 10 mM, pH 7,0, a la columna de fijación
	Centrifugar a 11.000 x g durante 30 s
	En el caso de esta etapa no es necesario cambiar el tubo colector después de la centrifugación
	Añadir de nuevo 100 µl de CaCl ₂ 10 mM, etanol al 80 %, Tris 10 mM, pH 7,0, a la columna de fijación
	Centrifugar a 11.000 x g durante 2 min
	Desechar el tubo colector con el material que pasado por la columna
	Introducir la columna de fijación en un nuevo tubo colector (1,5 ml)
	Añadir 10 µl de CaCl ₂ 10 mM, Tris 10 mM, pH 7,0, directamente sobre el centro de la membrana de sílice de la columna de fijación
	Centrifugar a 11.000 x g durante 30 segundos
	Almacenar el ADN eluido para el análisis posterior
	Introducir la columna de fijación en un nuevo tubo colector (2,0 ml)
A partir de aquí se prosigue con la etapa 6 del protocolo de aislamiento de ARN de acuerdo con el Ejemplo 1.	

ES 2 386 414 T3

El análisis del ADN aislado se efectúa mediante una qPCR (cuantitativa), que se llevó a cabo de la siguiente manera:

5	Diana:	GAPDH
	Tamaño del amplicón:	191 pb
	Especificidad:	ADNg (genómico) de ratón
	Instrumento de PCR:	LightCycler
	Estuche:	DyNamo Capillary SYBR Green Kit (Finnzymes #F-420 S/L)
10	Cantidad del molde:	2 µl

Para el análisis de los materiales eluidos de ADN se lleva a cabo una qPCR como sigue:

Por cada tanda de reacción se mezclaron los siguientes componentes:

15	2x DyNamo master mix (procedente del estuche: DyNamo Capillary SYBR Green qPCR Kit #F-420S/L)	10 µl
	Cebador A (10 µM = 10 pmol/µl) 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'	0,5 µl
	Cebador B (10 µM = 10 pmol/µl) 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'	0,5 µl
	Agua	7 µl
	Material eluido de ADN	2 µl
	Volumen total	20 µl

La tanda de reacción se transfiere a un capilar de LightCycler (de la entidad Roche). La reacción y el análisis se llevan a cabo con el siguiente programa en el Instrumento LightCycler (de la entidad Roche).

	Diana temperatura (°C)	Incubación tiempo (segundos)	Temperatura velocidad de transición (°C/segundo)
Desnaturalización	95	600	20
Amplificación (40 ciclos)	95	5	20
	55	10	20
	72	12	20
	95	10	20
Curva de fusión	65	20	20
	95	0	0,2
	40	30	20
Enfriamiento	40	30	20

20 El análisis del ARN aislado se efectúa mediante una qRT-PCR tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

25 En la Figura 2 se representan los resultados del análisis del ADN y en la Figura 3 los resultados del análisis del ARN. Éstos ponen de manifiesto que, con ayuda del procedimiento de aislamiento conforme al invento, junto al ARN se puede aislar también el ADN a partir de muestras FFPE en unas cantidades, que son comparables con las del método de desparafinación con xileno. El procedimiento conforme al invento alcanza por consiguiente la capacidad de rendimiento de elaboración de la muestra con ayuda del método con xileno, evitando las desventajas que están vinculadas con este método.

30 **Ejemplo 3: Aislamiento de ARN a partir de muestras FFPE de hígado de rata mediante un gasóleo biológico o respectivamente un sinarol como disolventes no miscibles con agua**

35 El tratamiento de las muestras FFPE se efectúa tal como se ha descrito en el Ejemplo de realización 1, llevándose a cabo la desparafinación de acuerdo con el procedimiento conforme al invento con dos disolventes diferentes, a saber un gasóleo biológico o respectivamente un sinarol. En el caso del gasóleo biológico (n° de CAS 67762-38-3) se trata de una mezcla de diversos ésteres metílicos de ácidos grasos. El análisis del ARN aislado se efectuó mediante una qRT-PCR tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

40 En la Figura 4 se representa el resultado de la comparación de estos dos disolventes, que proporcionan amplísimamente los mismos resultados en lo que respecta al rendimiento de ARN aislado.

Ejemplo 4: Comparación del aislamiento de ARN a partir de muestras FFPE de hígado de rata con pentadecano y una parafina muy fluida

En este ensayo se compararon las desparafinaciones mediante pentadecano y mediante una parafina muy fluida (n° de CAS 8012-95-1) según el procedimiento conforme al invento. Para esto, unas muestras FFPE de hígado de rata se trataron, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, con pentadecano o respectivamente con una parafina muy fluida como disolventes no miscibles con agua, y se aisló el ARN a partir de las muestras.

En el resultado se pone de manifiesto que con los dos disolventes se puede desparafinar la muestra y aislar seguidamente el ARN. Sin embargo, el pentadecano se adecua mejor que una parafina muy fluida, puesto que en el caso del pentadecano, después de haber añadido el tampón de lisis y de la disgregación proteolítica de la muestra, resulta una interfase más clara y nítida entre la fase orgánica y la fase acuosa que en el caso de la utilización de una parafina muy fluida. La citada en último lugar tiende a la formación de una interfase turbia, en la que la que posiblemente quedan prendidas partes de la muestra.

Ejemplo 5: Influencia del valor de K_{OW} del disolvente no miscible con agua sobre la desparafinación

En los siguientes ensayos se investiga la disolución de una parafina en diferentes disolventes no miscibles con agua, que son empleables conforme al invento. Para esto, 82 mg de una parafina se disuelven en 1.640 µl de cloroformo, de tal manera que por 1 mg de la parafina pasan a emplearse 20 µl de cloroformo. A partir de esto se extraen partes alícuotas de 200 µl, 100 µl, 50 µl así como 25 µl, que corresponden a 10, 5, 2,5 y 1,25 mg de parafina. Estas muestras se rellenan dentro de recipientes para muestras de Eppendorf y el cloroformo se evapora a 60°C. A continuación se añade en cada caso 1 ml de los disolventes indicados abajo, la parafina se disuelve mediando calentamiento a 60°C, a continuación se enfría a 20°C y se valora la solubilidad de la parafina en el disolvente. Los resultados se representan en la siguiente Tabla.

Solubilidad de una parafina (mg) en 1 ml de disolvente a 20°C								
	nonano	xileno	limoneno	cloroformo	pentadecano	sinarol	gasóleo biológico	éster pentílico de ácido propiónico
mg/ml	50	50	50	50	aprox. 40	33	25	10
valor de K _{OW}	5,4	3,1	3,4	2	7,7	aprox. 7	aprox. 8	2,4

	éster butílico de ácido acético	decanol	ácido octanoico	acetil - citrato de tributilo	éster dietílico de ácido adípico	éster dietílico de ácido malónico	alcohol bencílico
mg/ml	5	5	5	2,5	1,25	< 1,25	< 1,25
valor de K _{OW}	1,8	4,6	3,1	3,3	1,3	1	1,1

Los valores de K_{OW} indicados se han tomado de las siguientes fuentes o se han estimado a partir de experimentos propios:

- BGIA - Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung GESTIS-Stoffdatenbank, (Instituto de la seguridad laboral del seguro estatal alemán de accidentes - banco de datos de sustancias GESTIS)
- LOGKOW - A database of evaluated octanol-water partition coefficients (Log P) (Un banco de datos de los coeficientes evaluados de reparto entre octanol y agua (Log P))
- PubChem Substance

Estos resultados muestran que la solubilidad de parafinas en el correspondiente disolvente no miscible con agua es por regla general tanto mayor cuanto más grande sea su valor de K_{OW}.

Ejemplo 6: Influencia del valor de K_{OW} sobre la separación de fases

En un ensayo adicional se investigó la separación de fases entre una fase acuosa y una fase orgánica en lo que respecta a los disolventes antes mencionados. Para esto, se mezclaron en cada caso 400 µl del respectivo disolvente orgánico no miscible con agua con 1,25 mg /ml de una parafina y 100 µl de un tampón de lisis, seguidos por la adición de 100 µl de cloruro de amonio 200 mM. A continuación se añadieron 200 µl de etanol (aproximadamente al 98 %) y después de haber mezclado se centrifugó para apoyar a la separación de fases. De esta manera se crean unas condiciones comparables con las del procedimiento conforme al invento.

Para la evaluación de la separación de fases, se midió el volumen de la fase acuosa. La suma de los componentes, despreciando la contracción del volumen, se sitúa en aproximadamente 400 µl. En el caso de una mezcladura con

5 un disolvente no miscible con agua, que tiene un bajo valor de K_{OW} de por ejemplo 1,0, resulta, sin embargo, un volumen manifiestamente mayor de la fase acuosa, de casi 600 μ l. A partir de esto se desprende que unos disolventes con un más bajo valor de K_{OW} , después de una adición de etanol, hacen posible una peor separación de la fase acuosa con respecto de la fase orgánica. Los disolventes con un valor de K_{OW} de 4,0 o mayor proporcionan, por el contrario, una separación de fases manifiestamente mejor en las condiciones arriba mencionadas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento de biomoléculas a partir de una muestra biológica fijada, embebida en parafina, que comprende las etapas de:
- 5 poner en contacto la muestra
- a) con un disolvente no miscible con agua y disolver la parafina en este disolvente mediando formación de una fase orgánica líquida, y
- 10 b) con una solución acuosa de por lo menos una sustancia para lisis y/o con agua y por lo menos una sustancia para lisis mediando formación de una fase acuosa,
- 15 formándose por medio de las etapas a) y b) una mezcla de dos fases; y seguidamente aislar las biomoléculas a partir de la fase acuosa.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la etapa a) se lleva a cabo antes de, después de o al mismo tiempo que la etapa b).
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** el disolvente no miscible con agua tiene una densidad más pequeña que la del agua y/o el disolvente no miscible con agua es líquido a $\leq 25^{\circ}\text{C}$, en particular a $\leq 20^{\circ}\text{C}$.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el disolvente no miscible con agua se escoge entre compuestos hidrocarbonados aromáticos con 6 hasta 30 átomos de carbono, compuestos hidrocarbonados alifáticos con 10 hasta 30 átomos de carbono, ácidos alcanóicos o alquenoicos con 2 hasta 20 átomos de carbono y sus derivados, alcoholes aromáticos o alifáticos con 6 hasta 12 átomos de carbono, así como mezclas de éstos.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el disolvente no miscible con agua tiene un punto de ebullición bajo una presión normal de por lo menos 150°C , en particular de por lo menos 160°C y/o el disolvente no miscible con agua tiene un punto de inflamación de por lo menos 40°C , en particular de por lo menos 50°C y/o tiene un valor de K_{OW} de por lo menos 4, en particular de por lo menos 5.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las biomoléculas se escogen entre proteínas, ácidos nucleicos, en particular entre ácidos nucleicos mono- o bicatenarios.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la sustancia para lisis se escoge entre enzimas y/o sales caotrópicas.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** en la etapa b) se añaden además todavía
- 45
 - por lo menos una sustancia tamponadora y/o
 - por lo menos un alcohol que tiene de uno hasta cuatro átomos de carbono y/o
 - por lo menos un agente de reducción y/o
 - por lo menos un tampón y/o un reactivo para suprimir los enlaces covalentes y/o las modificaciones de la biomolécula, que se han provocado por el tratamiento con formalina.
- 50 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la disolución de la parafina se lleva a cabo mediando calentamiento, en particular a una temperatura de 35 a 70°C y/o la etapa b) del procedimiento se lleva a cabo mediando calentamiento, en particular a una temperatura de 70 a 100°C .
- 55 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el aislamiento de las biomoléculas a partir de la fase acuosa se lleva a cabo mediante una deposición de las biomoléculas junto a una fase sólida, que es en particular una columna cromatográfica, en caso deseado seguida por una o varias etapas de lavado, en particular para la deposición de las biomoléculas junto a la fase sólida, se ponen en contacto la fase acuosa totalmente, y la fase orgánica por lo menos parcialmente con la fase sólida.
- 60 11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la fase acuosa y/o la fase orgánica están amplísimamente exentas de agentes tensioactivos, en particular de agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos y/o anfóteros.

Figura 1

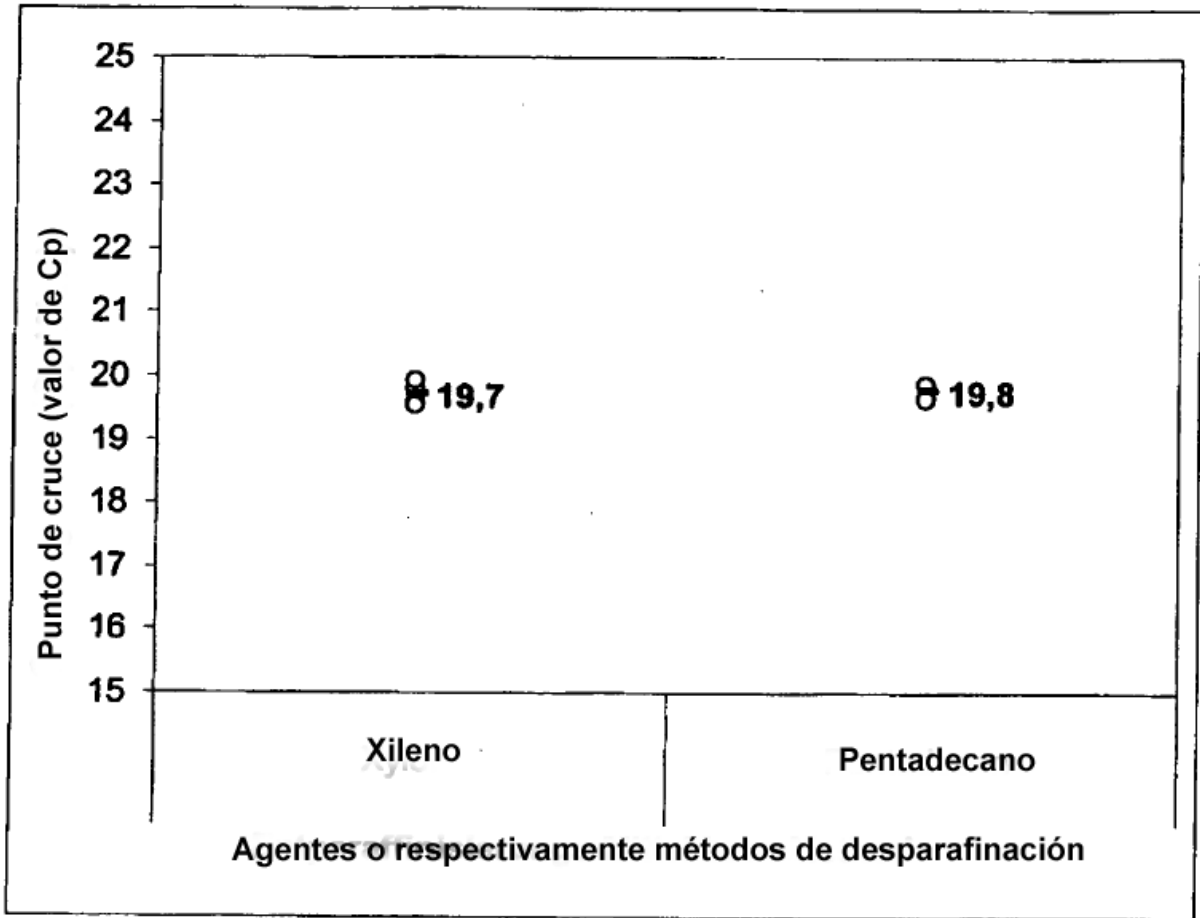


Figura 2

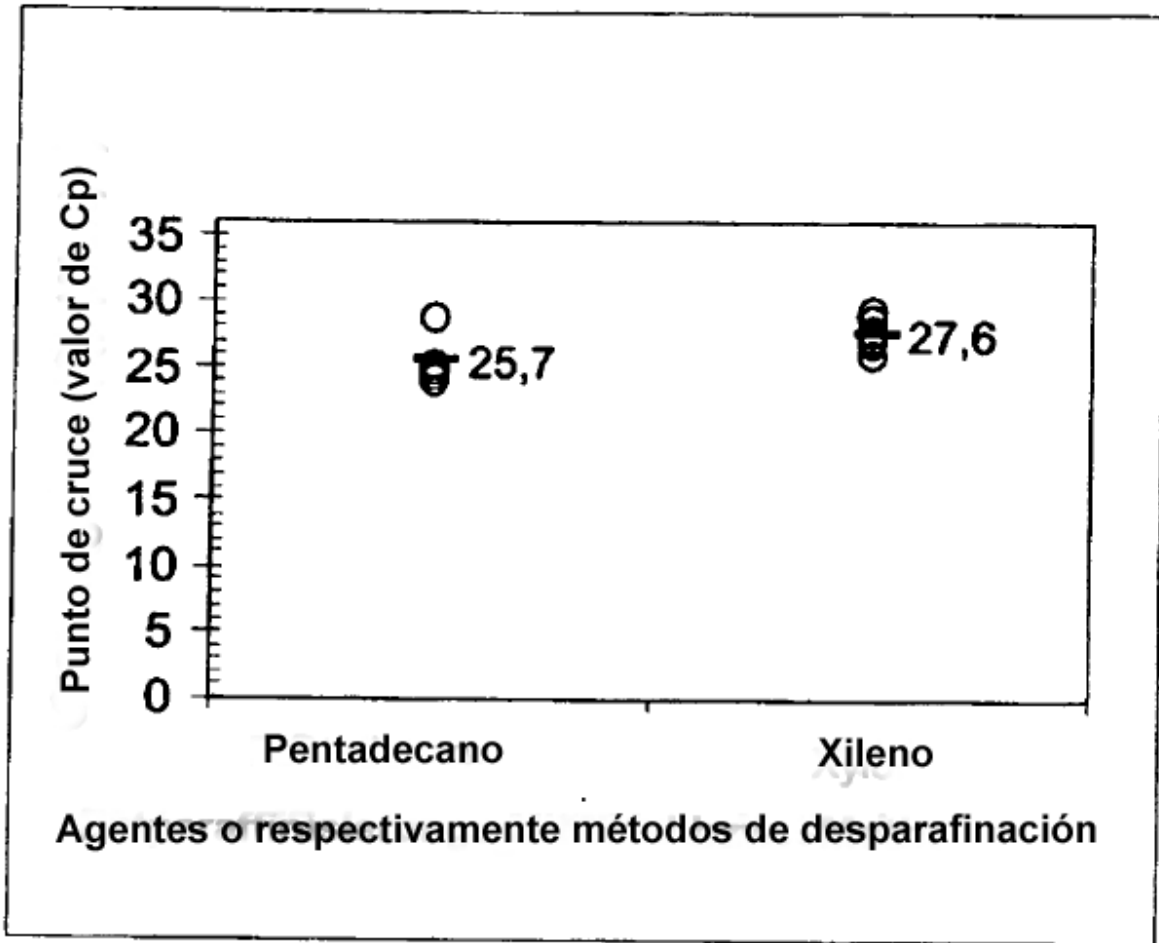


Figura 3

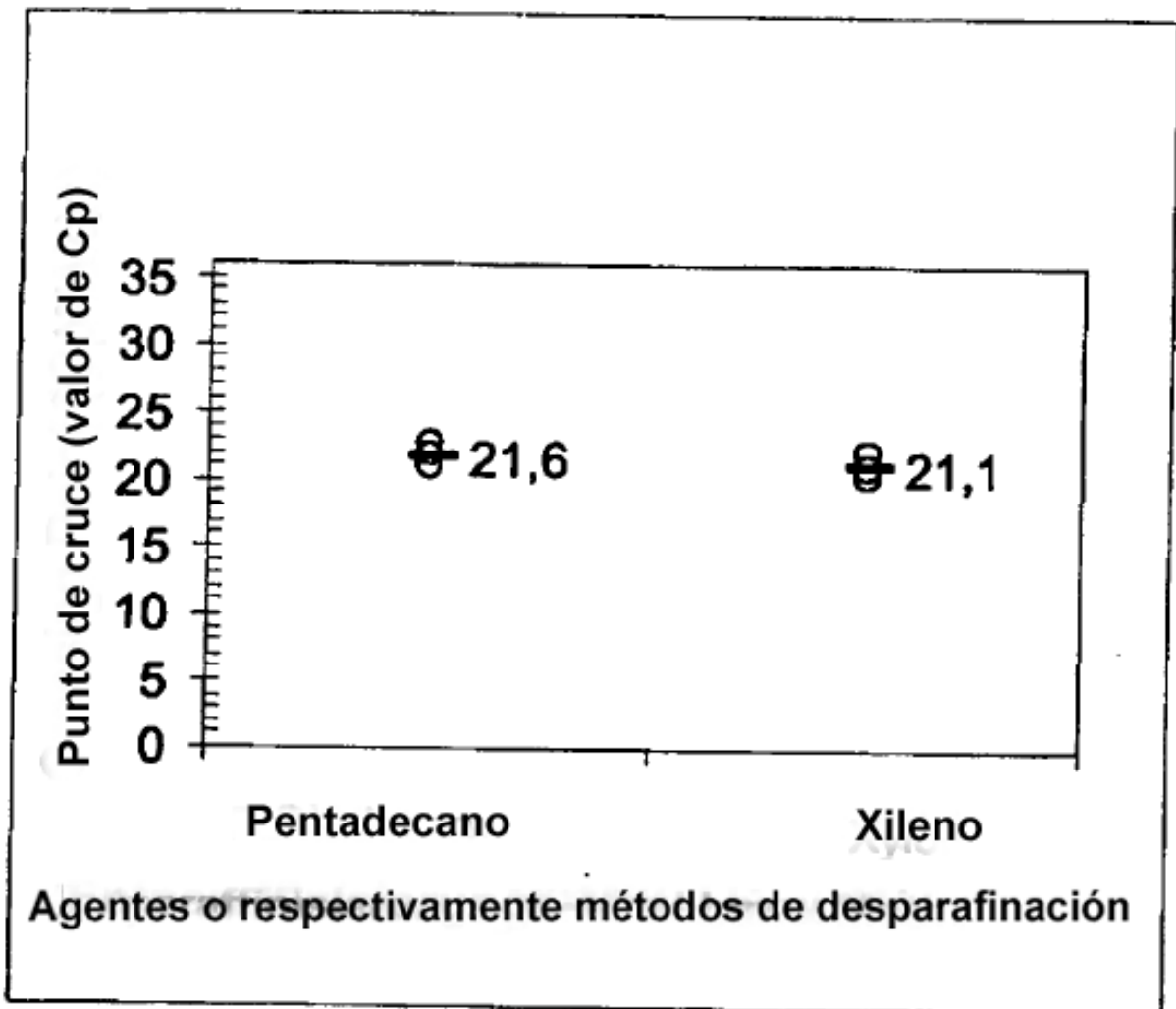


Figura 4

