

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 941**

51 Int. Cl.:

G01N 1/44 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

B01F 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2004 E 04719188 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 1601450**

54 Título: **Preparación líquida de tejidos a partir de muestras biológicas, tejidos y células procesadas histopatológicamente**

30 Prioridad:

10.03.2003 US 452956 P

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

12.11.2013

73 Titular/es:

**EXPRESSION PATHOLOGY, INC. (100.0%)
9290 GAITHER ROAD
GAITHERSBURG, MD 20877, US**

72 Inventor/es:

**DARFLER, MARLENE M. y
KRIZMAN, DAVID B.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 941 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

Preparación líquida de tejidos a partir de muestras biológicas, tejidos y células procesadas histopatológicamente.

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona métodos para procesar muestras biológicas, tejidos y células procesadas histopatológicamente hasta un lisado de biomoléculas que forma una biblioteca representativa de proteínas. Los métodos permiten la extracción, el aislamiento, la solubilización, y el almacenamiento de biomoléculas de los lisados, lo que incluye proteínas y glicoproteínas. Este lisado de biomoléculas es soluble, diluible, puede ser fraccionado, y es utilizable en numerosos ensayos bioquímicos posteriores.

Antecedentes de la invención

10 Durante más de cien años, las universidades e instituciones médicas públicas y académicas, clínicas de patología, instituciones biomédicas privadas, archivos de tejidos, hospitales y museos han conservado muestras biológicas con formalina y otros fijadores químicos tales como formaldehído y alcohol etílico. El fijador químico más habitual es formalina. La formalina se usa como fijador debido a su capacidad superior para conservar tanto la estructura tisular como la morfología celular. Esto ha dado como resultado el uso generalizado de formalina para la conservación
15 eficaz de cortes histológicos para el análisis microscópico tradicional. La fijación en formalina es tan eficaz para conservar la estructura tisular y la morfología celular que el archivo con formalina es un auténtico tesoro que contiene millones de muestras. En este archivo hay muestras biológicas de tejido sano, muestras de tejido de prácticamente todas las enfermedades conocidas, y una multitud de formas de vida conservadas.

20 La forma más habitual de fijación de muestras se da por medio de la reticulación inducida por formalina de las proteínas de la muestra biológica. Estas reticulaciones de proteínas, aunque proporcionan una conservación excelente de la morfología celular, también hacen que la muestra fijada sea relativamente insoluble. Debido a estas reticulaciones de proteínas, los tipos de ensayos que se pueden llevar a cabo en una muestra fijada en formalina son escasos, incapaces de proporcionar resultados cuantitativos, y carecen de sensibilidad. De hecho, las muestras biológicas fijadas en formalina son prácticamente inútiles en muchas técnicas de ensayo modernas, que son muy
25 cuantitativas y sensibles.

Es evidente, por lo tanto, que son muy deseables los métodos nuevos para solubilizar muestras biológicas fijadas en formalina u otras muestras biológicas fijadas químicamente.

30 Los documentos WO 02/46463 y EP-A-0 692 533 describen métodos para preparar un lisado de biomoléculas multi-uso (usado por ejemplo para la purificación, extracción o análisis de ADN/ARN... etc.), que comprenden las etapas de calentar una composición que comprende una muestra biológica (tejido) procesada histopatológicamente (p.ej. fijada con formalina o formaldehído, o incrustada en un medio de soporte, por ejemplo parafina) y una reacción en un tampón a una temperatura (p.ej. por encima del punto de fusión de la parafina) y un tiempo suficiente para fundir la parafina (por lo tanto, suficiente para afectar negativamente a la reticulación de las proteínas, ya que esta reticulación en dicha muestra se crea, por ejemplo, por la fijación en formalina).

35 Ikeda K et al; 1 de marzo de 1998 (01-03-1998) describe un método para preparar un lisado de biomoléculas para extraer las proteínas, que comprende las etapas de calentar una composición que comprende una muestra biológica fijada en formalina y un tampón de reacción a una temperatura (de alrededor de 100°C) y un tiempo suficiente para afectar negativamente a la reticulación de proteínas en dicha muestra biológica, en el que el tampón de reacción contiene un 2% de dodecil sulfato sódico (SDS) que permite alterar de manera eficaz la estructura tisular y celular de
40 dicha muestra biológica.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la invención son:

45 1. La primera realización proporciona un método para preparar un lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de las proteínas de una muestra biológica fijada en formalina, que comprende las etapas de:

(a) calentar una composición que comprende la muestra biológica fijada en formalina y un tampón de reacción a una temperatura entre alrededor de 80°C y alrededor de 100°C y durante un periodo de tiempo suficiente para afectar negativamente a la reticulación proteica en dicha muestra biológica, en el que tal periodo de tiempo es de alrededor de 10 minutos a alrededor de 4 horas, y

50 (b) tratar la composición resultante con una cantidad eficaz de una enzima proteolítica durante un periodo de tiempo suficiente para alterar la estructura tisular y celular de dicha muestra biológica, en el que tal periodo de tiempo es de alrededor de 30 minutos a alrededor de 24 horas, en el que la enzima proteolítica es una endoproteasa.

2. La segunda realización de la invención proporciona el método según la realización 1, en el que dicha muestra

biológica comprende una población sustancialmente homogénea de tejidos o células.

3. El método según la realización 1, que comprende además, antes de la etapa (a), la etapa de eliminar toda la parafina presente en dicha muestra biológica mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en: añadir un disolvente orgánico; calentar; calentar y añadir un tampón que comprende Tris; y calentar y añadir un disolvente orgánico.
4. El método según la realización 1, que comprende además la etapa de alterar mecánicamente dicha muestra biológica mediante al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en:
homogeneización manual; agitación en vórtex; y mezcla física.
5. El método según la realización 1, en el que dicho tratamiento con enzima proteolítica se lleva a cabo a una temperatura entre alrededor de 37°C y alrededor de 65°C.
6. El método según la realización 1, en el que dicho tampón de reacción comprende un detergente.
7. El método según la realización 1, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en presencia de un detergente.
8. El método según la realización 6, en el que dicho detergente se selecciona del grupo que consiste en Nonidet P40, SDS, Tween-20, Triton X, y desoxicolato sódico.
9. El método según la realización 7, en el que dicho detergente se selecciona del grupo que consiste en Nonidet P40, SDS, Tween-20, Triton X, y desoxicolato sódico.
10. El método según la realización 1, en el que dicha enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en quimotripsina, tripsina y endoproteinasa Lys-C.
11. El método según la realización 1, en el que dicho tampón de reacción comprende Tris y tiene un pH en el intervalo de alrededor de 6,0 a alrededor de 9,0.
12. El método según la realización 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho lisado hasta fracciones de biomoléculas diferentes y separadas y obtener una fracción de proteínas y una fracción de ácidos nucleicos.
13. El método según la realización 12, en el que cada fracción de biomoléculas contiene biomoléculas diferentes y separadas adecuadas para el uso en ensayos bioquímicos.
14. El método según la realización 1, en el que dicha muestra biológica se selecciona de un grupo que consiste en tejidos/células fijados en formalina, tejidos/células fijados en formalina/incrustados en parafina (FFPE), bloques de tejidos FFPE y células de esos bloques, y células de cultivos de tejidos que se han fijado en formalina y/o incrustado en parafina.
15. El uso de un equipo en un método para preparar un lisado biológico según cualquiera de las realizaciones 1 a 14, que comprende al menos:
(a) una muestra biológica fijada en formalina
(b) una enzima proteolítica, y
(c) un detergente,
en el que la enzima proteolítica es una endoproteasa.
16. Un método para detectar uno o más analitos en un lisado de biomoléculas que se sospecha que contiene dicho analito o más analitos, en el que el lisado es una biblioteca representativa de todas las proteínas de una muestra biológica fijada en formalina obtenida mediante un método según cualquiera de las realizaciones 1 a 14, que comprende las etapas de:
(a) poner en contacto la fracción de proteínas obtenida mediante el método según la realización 12 con una matriz, en la que dicha matriz comprende uno o más agentes de captura de especificidad de unión conocida inmovilizados sobre una superficie de soporte de una manera posicionalmente distinguible; y
(b) detectar la unión o ausencia de unión de uno o más analitos en dicha fracción de proteínas obtenida a dichos reactivos de captura inmovilizados.
17. El método según la realización 16, en el que dicho reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de un dominio, regiones estructurales modificadas, péptidos, aptámeros de ácidos nucleicos, un resto receptor, reactivos de afinidad, moléculas pequeñas, y ligandos de proteínas.

18. El método según la realización 16, en el que la superficie de soporte comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, vidrio derivatizado, silicio, silicio derivatizado, silicio poroso, plástico, membranas de nitrocelulosa, membranas de nailon, y membranas de PVDF.
- 5 19. Un método para analizar una diversidad de lisados de biomoléculas obtenidos a partir de una diversidad de muestras biológicas fijadas en formalina mediante un método según cualquiera de las realizaciones 1 a 14, en el que los lisados son bibliotecas representativas de las proteínas de dicha muestra biológica fijada en formalina que comprende las etapas de
- 10 (a) inmovilizar una diversidad de las fracciones de proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica fijada en formalina mediante un método según cualquiera de las realizaciones 12 a 14 sobre una superficie de soporte, en el que cada lisado se inmoviliza en una posición discreta sobre dicha superficie;
- (b) poner en contacto dicha superficie de soporte con un reactivo de afinidad de unión conocida;
- (c) detectar la presencia o ausencia de unión de dicho reactivo de afinidad de unión conocida en dichas posiciones específicas sobre dicha superficie de soporte.
- 15 20. El método según la realización 19, en el que el lisado de biomoléculas se deposita sobre la superficie de soporte mediante un método seleccionado del grupo que consiste en depósito manual, inyección de tinta, impresión robótica por contacto, impresión robótica sin contacto y depósito piezoeléctrico.
- 20 21. El método según la realización 19, en el que dicho reactivo de afinidad de unión conocida se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de un dominio, regiones estructurales modificadas, péptidos, aptámeros de ácidos nucleicos, un resto receptor, reactivos de afinidad, moléculas pequeñas, y ligandos de proteínas.
22. El método según la realización 19, en el que dicha superficie de soporte comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, vidrio derivatizado, silicio, silicio derivatizado, silicio poroso, plástico, membranas de nitrocelulosa, membranas de nailon, y membranas de PVDF.
- 25 23. El método según la realización 16, en el que dicho lisado de biomoléculas se somete a una etapa de fraccionamiento antes de poner en contacto dicho lisado con dicha matriz.
24. El método según la realización 16, en el que la etapa de detección (b) se lleva a cabo mediante el uso de un reactivo de detección que se une de manera específica a uno o más de los analitos que se sospecha que están presentes en dicha muestra.
25. El método según la realización 24, en el que dichos reactivos de detección son proteínas.
- 30 26. El método según la realización 19, en el que uno o más de dichos lisados de biomoléculas se someten a una etapa de fraccionamiento antes de inmovilizar una o más de las fracciones resultantes sobre dicha superficie.
27. El método según la realización 26, en el que dicha fracción es una fracción que contiene proteínas.
28. El uso de un lisado de biomoléculas preparado mediante un método de cualquiera de las realizaciones 12-14 en una técnica de diagnóstico.
- 35 29. El uso según la realización 28, en el que dicha técnica se selecciona del grupo que consiste en cromatografía, matrices de proteínas, transferencia de Western, inmunoprecipitación, columnas de afinidad, ensayos de corte y empalme alternativo, análisis de mutaciones, amplificación de ácidos nucleicos, sondas marcadas para análisis de micromatrices, análisis de RFLP, transferencia de Southern, electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional, electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional, análisis en serie de la expresión génica, HPLC, FPLC, espectroscopía de masas MALDI-TOF, espectroscopía de masas SELDI, cromatografía líquida, espectrometría de masas, ensayos ELISA, RT-PCR cuantitativa, detección de polimorfismos de nucleótidos simples, genotipado y secuenciación.

Breve descripción de los dibujos

- La presente invención se entenderá mejor con referencia a las hojas de dibujos adjuntas, en las que:
- 45 La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra el método de preparación del lisado de biomoléculas multi-uso de la presente invención.
- La Figura 2 muestra un análisis típico de expresión de proteínas y demuestra que una preparación de lisado de biomoléculas multi-uso es diluible y se puede usar para realizar un perfil cuantitativo de la expresión de proteínas de células obtenidas a partir de muestras de tejido fijadas en formalina.
- 50 La Figura 3 muestra una preparación estándar de lisado de biomoléculas multi-uso que se fraccionó. Ambas

fracciones se recuperaron y se usaron para el análisis mediante electroforesis en gel para la determinación de los ácidos nucleicos.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para tratar muestras biológicas procesadas histopatológicamente de una manera que permite que las muestras se usen en una amplia diversidad de ensayos bioquímicos. Los métodos de la invención permiten por primera vez la recuperación de proteínas a partir de muestras biológicas procesadas histopatológicamente de una forma que es útil para los ensayos posteriores.

10 De manera específica, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las muestras biológicas procesadas histopatológicamente se pueden calentar en un tampón de reacción, seguido de tratamiento con proteasa, para proporcionar lisados que son ricos en información molecular en relación con la muestra biológica original. Hay disponible un número inmenso de muestras biológicas procesadas histopatológicamente de una matriz enorme de tejidos normales y enfermos en laboratorios y hospitales de todo el mundo, y los métodos de la presente
15 invención amplían en un grado significativo la información que se puede obtener de esas muestras, como se describe con más detalle más adelante.

Se debe entender que la presente invención no se limita a las metodologías, protocolos, construcciones, fórmulas y reactivos particulares descritos, y como tales pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el
20 alcance de la presente invención.

Tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una", y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" es una referencia a una o más células, e incluye los equivalentes de la misma conocidos para los expertos en la técnica, etc.

25 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comprende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede usar cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o en los ensayos de la invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

30 Muestras biológicas

La presente invención proporciona un método para obtener un lisado de biomoléculas a partir de una muestra biológica procesada histopatológicamente. Las muestras biológicas procesadas histopatológicamente pueden incluir organismos completos, muestras obtenidas de patología quirúrgica de diagnóstico, muestras de tejidos, líquidos corporales, material celular o viral, o cualquier otra muestra biológica que haya sido procesada histopatológicamente.

35 Los usos del lisado incluyen la modelización diagnóstica o predictiva de enfermedades, pero este lisado se puede usar también junto con cualquier técnica de laboratorio útil tal como dicten las circunstancias particulares.

Una realización de la presente invención proporciona la obtención de un lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de las proteínas, de una muestra biológica procesada histopatológicamente. Los ejemplos de procesamiento histopatológico de muestras biológicas incluyen, pero sin limitación: fijación en formalina de organismos completos; fijación en formalina de tejidos o células; fijación en formalina/incrustación en parafina de tejidos o células; y fijación en formalina y/o incrustación en parafina de células de cultivos de tejidos.

El procesamiento histopatológico se da en general por medio del uso de un fijador de formalina. La formalina se usa de manera generalizada porque es relativamente económica, fácil de manejar, y una vez que la muestra fijada en formalina se incrusta en parafina, la muestra se almacena fácilmente. Además, la formalina es a menudo el fijador de elección porque conserva tanto la estructura tisular como la morfología celular. Aunque el mecanismo exacto puede no comprenderse completamente, la fijación se da por la reticulación inducida por la formalina de las proteínas de la muestra biológica. Debido a estas reticulaciones proteicas, la fijación en formalina ha tenido un gran éxito en el análisis microscópico tradicional de cortes histológicos. Una vez que una muestra biológica se procesa histopatológicamente, no obstante, ya no es soluble. Como resultado, solamente hay disponibles unas cuantas técnicas experimentales para las muestras biológicas procesadas histopatológicamente. Los ensayos actuales que se pueden llevar a cabo en una muestra fijada en formalina son pocos y, en el mejor de los casos, semi-cuantitativos. Los ejemplos de ensayos que se pueden llevar a cabo con un tejido fijado en formalina son inmunohistoquímica (IHC), hibridación in situ (ISH), y hibridación de fluorescencia in situ (FISH). ISH y FISH proporcionan la localización celular del mRNA o ADN. Todos estos ensayos adolecen de los mismos defectos en cuanto a la carencia de cuantificación, sensibilidad baja, y la dificultad de llevar a cabo ensayos de alto rendimiento. La fijación en formalina, por lo tanto, hace que el archivo fijado en formalina tenga poco valor para muchos de los

métodos de análisis potentes que se han desarrollado en años recientes.

No se puede enfatizar suficientemente el volumen total de muestras fijadas en formalina. Durante prácticamente los últimos cien años, las muestras biológicas normalmente se han fijado en formalina o en bloques fijados en formalina/incrustados en parafina (FFPE). Las universidades y los museos tienen archivos inmensos de vegetales y animales que están fijados en formalina. Los hospitales, en el curso de la patología quirúrgica de diagnóstico, han establecido grandes colecciones fijadas en formalina que contienen tejidos de prácticamente todas las enfermedades conocidas, además de tejidos sanos normales. Debido a la necesidad de mantener estas muestras clínicas de tejidos en caso de que fuera necesario llevar a cabo ensayos adicionales, estos archivos de todo el mundo contienen actualmente millones de muestras FFPE.

Una realización de la invención descrita en la presente memoria proporciona la creación de un lisado de biomoléculas solubles a partir de muestras biológicas procesadas histopatológicamente, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas. Este método incluye producir un lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas, directamente a partir de una muestra biológica conservada histopatológicamente, p.ej., un tejido o célula, que permite obtener, extraer, aislar, solubilizar, fraccionar y almacenar las biomoléculas contenidas en la muestra. Este lisado de biomoléculas solubles forma una biblioteca representativa de proteínas tal como existen en la muestra biológica procesada histopatológicamente. Tales biomoléculas incluyen proteínas y glicoproteínas.

Además, el lisado de biomoléculas es maleable. Por ejemplo, el lisado de biomoléculas se puede fraccionar hasta una fracción de ácidos nucleicos y una fracción de proteínas. Además, este lisado de biomoléculas se puede diluir en serie. Otra realización de la presente invención proporciona un método en el que un lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas, a partir de una muestra biológica procesada histopatológicamente se puede usar en varias técnicas experimentales.

Usos de los lisados

El método descrito en la presente memoria es especialmente útil porque se puede usar para obtener un lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas, a partir de una muestra biológica procesada histopatológicamente que se puede usar con numerosas técnicas experimentales y de diagnóstico, por lo que se proporcionan nuevos usos para el archivo procesado histopatológicamente. Los ejemplos de técnicas con las que se puede usar el lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas, incluyen, pero sin limitación, cromatografía, matrices de proteínas, transferencia de Western, inmunoprecipitación, columnas de afinidad, análisis de mutaciones, sondas marcadas para análisis de micromatrices, análisis de RFLP, y ensayos de alto rendimiento tales como, pero sin limitación, electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional y bidimensional (2D-PAGE), HPLC, FPLC, espectroscopía de masas MALDI-TOF, espectroscopía de masas SELDI, cromatografía líquida, espectrometría de masas, ensayos ELISA, y secuenciación. El técnico experto reconocerá que los lisados producidos mediante los métodos de la invención se pueden usar también en una amplia diversidad de ensayos adicionales.

La finalización reciente del Proyecto del Genoma Humano, además de estimular avances espectaculares en el campo de la genómica y proteómica, ha demostrado el potencial inmenso de los ensayos de alto rendimiento. La proteómica ha ido más allá del intento inicial de identificar y cuantificar las proteínas, y ahora se están intentando determinar las funciones de todas las proteínas de un organismo, órgano, u orgánulo, y cómo estas proteínas varían con el tiempo y el estado fisiológico.

La "genómica funcional" intenta determinar el papel fisiológico de cada gen. Una etapa importante en el descubrimiento de la función de cada gen es medir cuidadosamente los patrones de expresión de los transcritos de mRNA y las proteínas en las muestras de tejidos. Mediante la medida de los patrones de expresión específicos de genes y productos génicos tales como mRNA y proteínas, se puede determinar qué genes se expresan y a qué niveles en un tipo celular sano normal. Quizás es más importante, sin embargo, que midiendo los patrones de expresión en tipos celulares enfermos, se comprenderá mejor la progresión patológica de esa enfermedad. Además, se pueden descubrir marcadores nuevos, proporcionando por ello nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

La capacidad de utilizar el archivo fijado en formalina sería una ayuda extraordinaria en estas tareas. A menudo se conoce el resultado del paciente para cada muestra patológica. Por lo tanto, se podrían crear fácilmente correlaciones entre los marcadores y el pronóstico del paciente. Además, debido a que el lisado de biomoléculas multi-uso es una biblioteca representativa de la muestra biológica procesada histopatológicamente, hay presentes fracciones tanto nucleicas como no nucleicas. Por lo tanto, se pueden determinar relaciones directas entre la expresión de ácidos nucleicos y la presencia de moléculas distintas de ácidos nucleicos. Esta es una ventaja sobre las técnicas actuales que aíslan únicamente la fracción de ácidos nucleicos o la fracción distinta de ácidos nucleicos, y solamente se pueden extraer correlaciones indirectas. De manera alternativa, los ensayos de alto rendimiento son un gran beneficio para los biólogos y zoólogos comparativos y evolutivos debido a la capacidad de estos ensayos para generar y cuantificar diferencias entre especies. El alcance de estas tareas es solamente posible por medio del uso de ensayos de alto rendimiento.

Ensayos con matrices

Un ejemplo específico de un ensayo de alto rendimiento es la matriz de proteínas. Las matrices de proteínas son muy paralelas (multiplexadas) y se pueden llevar a cabo en miniatura (micromatriz). Las matrices de proteínas son rápidas, normalmente automatizadas, muy sensibles, y capaces de generar una cantidad enorme de datos en un único experimento. La matriz de proteínas es básicamente una versión miniaturizada del conocido ELISA o inmunoensayo de transferencia en punto. De forma similar al ELISA y las transferencias en punto, los resultados de las matrices de proteínas se obtienen normalmente mediante el uso de métodos de detección óptica, por ejemplo detección fluorescente. Los datos generados mediante un único experimento de matriz de proteínas a menudo son tan voluminosos que se necesita un programa informático especializado para leer y analizar los datos que se generan.

Los ensayos de alto rendimiento, tales como el análisis con matrices de proteínas, son capaces de cribar cantidades inmensas de muestras biológicas inmediatamente. Para relacionar de manera significativa un único marcador candidato con cualquier enfermedad, se debe cribar un gran número de casos para generar correlaciones inequívocas. Sin embargo, la obtención de suficientes muestras biológicas con resultados conocidos de la enfermedad en un estado congelado o estable y almacenable que no estén fijadas químicamente es un factor limitante. Una solución posible a esta limitación sería el uso del archivo de tejidos y células fijadas en formalina. Los métodos de la presente invención son especialmente útiles porque el lisado de biomoléculas multi-uso permite usar el archivo de tejidos fijados en formalina en un análisis con matrices de proteínas de alto rendimiento.

En un tipo de análisis con matriz de proteínas, se inmovilizan o se depositan reactivos de captura específicos de afinidad de unión conocida, tales como anticuerpos, sobre una superficie de soporte de una manera posicional conocida, por lo que se forma la matriz de proteínas. Después se añade plasma, otros extractos de tejidos, o en este caso el lisado de biomoléculas multi-uso a la matriz de proteínas. Debido a que las proteínas de unión inmovilizadas sobre la superficie de soporte tienen una afinidad específica hacia una proteína o marcador individual, las matrices de proteínas pueden detectar moléculas o proteínas marcadoras de interés de la muestra. Mediante la inmovilización de los reactivos de captura específicos en posiciones conocidas sobre la superficie de soporte, se puede determinar la identificación de las proteínas y la presencia de las proteínas marcadoras mediante información posicional x, y. Además, debido a que se pueden medir fácilmente las diferencias en los niveles de proteínas en muestras complejas, también se puede llevar a cabo un análisis diferencial cuantitativo preciso. La detección se lleva a cabo por medio de varios métodos conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: anticuerpos secundarios en ensayos de tipo sándwich, marcaje directo de analitos, marcaje con doble color, espectrometría de masas, resonancia de plasmones superficiales, y microscopía de fuerza atómica.

Un tipo alternativo de análisis con matriz de proteínas coloca lisados de tejidos/células en un formato de matriz, por ejemplo sobre un soporte sólido. Se pueden colocar en una matriz múltiples lisados de muestras diferentes sobre una única superficie de una manera identificable posicionalmente. Después se añaden reactivos de especificidad de unión conocida, tales como anticuerpos, que se unen a las biomoléculas o marcadores de interés. La diferencia principal entre los dos tipos fundamentales de análisis con matrices descritos en la presente memoria es que en el primer tipo de matriz de proteínas se puede determinar la expresión de muchas proteínas diferentes en una única fuente de proteínas (un único tejido canceroso, por ejemplo). En contraste, mediante el otro tipo de análisis con matrices de proteínas, se puede ensayar la expresión de una proteína en un momento en muchas fuentes diferentes de proteínas (muchos casos diferentes de tejidos cancerosos, por ejemplo). El lisado se puede fraccionar antes de la inmovilización sobre la matriz, y las fracciones que contienen proteínas de los lisados se pueden usar para preparar la matriz. El técnico experto reconocerá también que se pueden usar otras fracciones de los lisados para preparar matrices. Por ejemplo, se pueden inmovilizar las fracciones que contienen ADN y/o ARN sobre superficies adecuadas para preparar matrices de ácidos nucleicos.

Los reactivos específicos de afinidad de unión conocida en matrices de proteínas son de manera ventajosa anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, pero pueden ser también anticuerpos de un dominio, regiones estructurales modificadas, péptidos, aptámeros de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas tales como fármacos, por ejemplo, ligandos de proteínas, u otras proteínas de unión específica conocidas en la técnica relevante. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, o una porción o fragmento de un anticuerpo capaz de unirse a los sitios antigénicos, y están disponibles de las fuentes comerciales habituales, tales como Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO).

Las superficies de soporte de las matrices de proteínas incluyen, pero sin limitación, vidrio (tal como portaobjetos), silicio, silicio poroso, nailon, membranas de PVDF o nitrocelulosa y similares, o microesferas, y están disponibles de una diversidad de fuentes comerciales. De manera alternativa, se han desarrollado chips especializados para ensayos de proteínas, y están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Biotrove (Woburn, MA), Zyomyx (Hayward, CA) y Pontilliste (Mountain View, CA).

Los reactivos de captura específicos o lisados de tejidos/células se pueden depositar o inmovilizar sobre la superficie de soporte mediante varias técnicas familiares para los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, impresión robótica por contacto, impresión robótica sin contacto, inyección de tinta, y depósito piezoeléctrico. Si el reactivo de captura es un polímero que se puede sintetizar sobre un soporte sólido, tal como un

ácido nucleico, el reactivo de captura se puede preparar directamente sobre el soporte, por ejemplo, mediante fotolitografía. Hay disponibles varios dispositivos de depósito automatizados comerciales, por ejemplo, de Packard Bioscience (Meriden, CT) y también hay equipos de transferencia manual disponibles comercialmente, p.ej. de V & P Scientific (San Diego, CA).

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "analito" se refiere a una biomolécula contenida dentro de la muestra biológica que es detectable mediante la unión a un reactivo de afinidad de unión específica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "tampón" se refiere a un tampón que tiene un pH específico en el intervalo de 1,0 a 9,0. Tanto el pH específico como los tipos de tampones se seleccionan basándose en la enzima proteolítica usada. Los expertos en la técnica conocen bien tanto el tipo de tampón como las necesidades específicas de pH.

10 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "disolvente orgánico" se refiere a los disolventes para eliminar la parafina que incluyen, pero sin limitación, xileno, tolueno, o cloroformo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "incubar" se refiere a poner en contacto un reactivo de afinidad de unión conocida con la muestra biológica para facilitar la unión entre el reactivo de afinidad de unión específica conocida y los analitos contenidos en la muestra biológica. El tiempo de incubación y la concentración del reactivo tienen que ser suficientes únicamente para obtener un resultado deseado, aunque el técnico experto reconocerá que tanto el tiempo de incubación como la concentración de reactivo se pueden optimizar mediante el uso de métodos que se conocen en la técnica una vez que se han identificado los reactivos adecuados.

15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "homogeneidad suficiente" se refiere a una población de tejidos o células que poseen características o rasgos similares basados en los criterios de selección. Un ejemplo de criterios de selección incluye, pero sin limitación, los criterios de selección histopatológicos que se conocen bien en la técnica relevante. Los ejemplos de métodos para "obtener" realmente una muestra biológica incluyen, pero sin limitación, el uso de un sacabocados manual, sacabocados de tejidos, microdissección por láser y otros métodos que se conocen bien en la técnica. El tamaño concreto de la muestra biológica obtenida no es importante, con tal de que haya una cantidad suficiente para llevar a cabo el ensayo elegido.

Métodos de preparación de lisados

Los métodos de la presente invención implican calentar la muestra biológica procesada histopatológicamente durante un tiempo y a una temperatura suficiente como para afectar negativamente a las reticulaciones de proteínas inducidas por formalina. El técnico experto reconocerá que el tiempo y la temperatura de calentamiento no son críticos, y se pueden variar, aunque un periodo típico para el calentamiento es de alrededor de 30 minutos a alrededor de 24 horas. Los mecanismos mediante los cuales la temperatura puede afectar negativamente a las reticulaciones inducidas por formalina incluyen, pero sin limitación, la inversión de las reticulaciones de las proteínas. Aunque no se conoce el mecanismo exacto, y sin limitarse por ninguna teoría, los presentes inventores creen que el efecto negativo de la temperatura sobre las reticulaciones de proteínas parece implicar cierta forma de liberación, inversión, o modificación parcial de las reticulaciones.

El método de la presente invención implica además añadir al menos una enzima proteolítica a la muestra biológica procesada histopatológicamente. Se cree que las enzimas proteolíticas aumentan el efecto negativo del calentamiento sobre las reticulaciones de proteínas inducidas por formalina. El tiempo, la temperatura, y la cantidad de la enzima proteolítica no son críticas, con tal de que sean suficientes como para afectar negativamente a las reticulaciones de proteínas inducidas por formalina. Los ejemplos de enzimas proteolíticas que son adecuadas para el uso en la presente invención incluyen tripsina, quimotripsina, y endoproteinasa Lys-C. La tripsina se puede adquirir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). De manera ventajosa, el tratamiento con proteasa se lleva a cabo tras la etapa de calentamiento descrita anteriormente. El tratamiento con proteasa se lleva a cabo de manera ventajosa a una temperatura que es óptima para la actividad máxima de la proteasa, pero esto se puede variar.

45 En una realización de la presente invención, el lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas, se puede fraccionar hasta biomoléculas diferentes y separadas que se pueden recoger por separado. Los ejemplos de fracciones de biomoléculas que se pueden recoger incluyen proteínas, glicoproteínas. Los métodos de fraccionamiento se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, fraccionamiento en columna de centrifugación, inmunoprecipitación, centrifugación en gradiente, HPLC y fraccionamiento en columna de goteo. Otros métodos de fraccionamiento se conocen bien en la técnica.

Después del fraccionamiento, la fracción deseada del lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de proteínas, se puede usar en los ensayos posteriores. Los ejemplos de ensayos que se pueden usar con las fracciones de biomoléculas del lisado de biomoléculas incluyen, pero sin limitación, cromatografía en columna, matrices de proteínas, transferencia de Western, inmunoprecipitación, columnas de afinidad, análisis de mutaciones, sondas marcadas para análisis de micromatrices, análisis de RFLP y ensayos de alto rendimiento tales como, pero sin limitación, electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional y bidimensional (2D-PAGE), HPLC, FPLC, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas SELDI, cromatografía líquida, espectrometría de masas, ensayos ELISA, y secuenciación.

La presente descripción incluye artículos manufacturados, tales como "equipos". Tales equipos estarán especialmente adaptados en general para contener en compartimentación próxima cada recipiente que alberga un componente útil para llevar a cabo la preparación del lisado multi-uso según los métodos y composiciones expuestos en la presente memoria. En una realización particular, la presente invención proporciona composiciones que contienen una muestra biológica procesada histopatológicamente, un tampón de reacción, y un detergente. El equipo puede incluir en general una proteasa, y un reactivo para eliminar la parafina de la muestra, tal como un tampón y/o un disolvente orgánico

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente invención, que comprende un método para preparar el lisado de biomoléculas multi-uso y posteriormente utilizar dicho lisado en varios ensayos diferentes. No es necesario llevar a cabo estas "etapas" en un orden particular, y sirven como descripción no limitante como sigue:

(a) aplicar criterios de selección específicos, basados en la histología, a una muestra biológica para conseguir un enriquecimiento de tejido biológico/poblaciones celulares homogéneas específicas. El enriquecimiento se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante métodos de microdissección de tejidos, antes de la obtención de biomoléculas en forma de una preparación líquida de tejidos;

(b) añadir un tampón Tris de pH ajustado específico (que oscila de pH 6,0 a pH 9,0) a dicha muestra biológica obtenida para la estabilización de los péptidos, fragmentos peptídicos, proteínas, enzimas, ADN, fragmentos de ADN, ARN, fragmentos de ARN, y otras biomoléculas y fragmentos de biomoléculas;

(c) conferir cierto nivel de alteración física a la muestra biológica mediante un método que incluye, pero sin limitación, homogeneización manual, agitación en vórtex, y/o mezcla física;

(d) calentar la muestra biológica a una temperatura elevada en el intervalo de alrededor de 80°C a alrededor de 100°C durante un periodo de tiempo de alrededor de 10 minutos a alrededor de 4 horas. Los expertos en la técnica pueden determinar el intervalo de temperaturas y el periodo de tiempo, basándose, por ejemplo, en el tamaño de la muestra;

(e) añadir una o más enzima(s) proteolítica(s) que incluyen, por ejemplo, proteinasa K, quimotripsina, papaína, pepsina, tripsina, pronasa, y endoproteinasa Lys-C a la muestra biológica durante un periodo de tiempo de alrededor de 30 minutos a alrededor de 24 horas a una temperatura elevada de alrededor de 37°C a alrededor de 80°C, de manera ventajosa a una temperatura de alrededor de 37°C a alrededor de 65°C. Los técnicos expertos pueden determinar el intervalo de temperaturas y el tiempo considerando, por ejemplo, el tamaño de la muestra biológica y/o la enzima proteolítica elegida;

(f) añadir uno o más detergentes que incluyen, por ejemplo, Nonidet-P-40, SDS, Tween-20, Triton-X, y desoxicolato sódico a la muestra biológica. El detergente se puede añadir antes de la etapa de tratamiento con proteasa (antes o después del calentamiento), en cuyo caso la naturaleza del detergente y su concentración se seleccionan para que no inhiban sustancialmente la actividad de la proteasa, o se puede añadir después de la etapa de la proteasa;

(g) fraccionar molecularmente la muestra biológica resultante mediante algún método, como por ejemplo fraccionamiento en columna de centrifugación, inmunoprecipitación, centrifugación en gradiente, HPLC, y fraccionamiento en columna de goteo para separar fracciones moleculares específicas, lo que da como resultado la obtención de diferentes biomoléculas en fracciones diferentes y que se pueden recoger;

(h) obtener y purificar fracciones subcelulares y moleculares específicas para la obtención de diferentes biomoléculas para los ensayos bioquímicos posteriores.

En la presente invención, cada lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de biomoléculas específicas que refleja directamente el estado de esas biomoléculas tal como se hallaban previamente en la muestra biológica procesada histopatológicamente. Un ejemplo de tal biblioteca representativa de lisado biomolecular a partir de una muestra biológica procesada histopatológicamente sería la preparación de un lisado de proteínas directamente a partir de tejidos/células fijados en formalina-incrustados en parafina.

La preparación resultante de biomoléculas se puede colocar en un formato de matriz para el análisis bioquímico simultáneo de múltiples preparaciones líquidas de tejidos (lisado de biomoléculas multi-uso) obtenidas a partir de múltiples y diferentes muestras biológicas procesadas histopatológicamente. Un ejemplo de tal formato de ensayo con matrices de alto rendimiento sería el desarrollo de una matriz de proteínas de tejido líquido de forma que los lisados de proteínas de los tejidos derivados de muestras procesadas histopatológicamente y obtenidos como se indicó anteriormente se colocan en la matriz en un patrón ordenado y definido en forma de puntos pequeños de proteínas sobre un sustrato de soporte sólido, en el que cada punto es una biblioteca representativa de las proteínas expresadas, y las características de esas proteínas expresadas, que se hallaban en la muestra biológica procesada histopatológicamente, y que cuando se ensayan mediante varios formatos de análisis bioquímico de proteínas, tales como inmuno-ensayos de unión de identificación de proteínas, reflejan directamente el patrón de expresión y las características de las proteínas ya que están relacionadas con la patología e histología de la muestra biológica

procesada histopatológicamente de la que se obtuvieron las proteínas.

5 Cuando la biomolécula de interés es una proteína, el extracto de proteínas está en una forma líquida soluble y es representativa del contenido de proteínas totales de las células obtenidas a partir de la muestra biológica procesada histopatológicamente de partida. El extracto de proteínas se puede colocar en cualquier número de ensayos de identificación, análisis y expresión de proteínas que incluyen, pero sin limitación, micromatrices de proteínas de tejidos líquidos que contienen bibliotecas representativas de proteínas de poblaciones patológicamente e histológicamente definidas de muestras biológicas procesadas histopatológicamente, y estos análisis están relacionados con la histología, el estado de la enfermedad, y la patología de la muestra biológica procesada histopatológicamente.

10 La presente invención, descrita así en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1. Preparación de un lisado a partir de una muestra fijada en formalina.

1. Colocar un corte de 2 mm de diámetro por 25 μm de grosor de un sacabocados de tejidos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml silanizado o de baja unión a proteínas.
- 15 2. Añadir 500 μl de Tris-HCl 20 mM de pH 7,8.
3. Calentar a 95°C durante 1 minuto.
4. Mezclar suavemente en un vórtex.
5. Con cuidado, sin romper el corte de tejido, retirar el tampón mediante el uso de una pipeta.
6. Añadir 750 μl de Tris-HCl 20 mM de pH 7,8.
- 20 7. Calentar a 95°C durante 1 minuto.
8. Con cuidado, sin romper el corte de tejido, retirar el tampón mediante el uso de una pipeta.
9. Microcentrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.
10. Eliminar cualquier tampón residual del tubo de microcentrífuga con una pipeta.
11. Añadir 10 μl de tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM de pH 7,8, EDTA 1,5 mM, 0,1% de Triton X-100, 10% de glicerol) al tubo. Asegurarse de que el tejido está en el fondo del tubo y cubrirlo con tampón de reacción.
- 25 12. Calentar a 95°C durante 1,5 horas. Cada 20 minutos, comprobar el tubo y hacer caer al fondo del tubo el tampón que ha formado una condensación en el tapón de forma que cubra el corte de tejido antes de colocar el tubo de nuevo en el bloque de calentamiento.
13. Microcentrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.
- 30 14. Colocar los tubos en hielo para enfriarlos.
15. Añadir 0,5 μl de Tripsina del 1% y mezclar suavemente.
16. Incubar durante 1 hora a 37°C. Cada 20 minutos comprobar el tubo y hacer caer al fondo del tubo el tampón que ha formado un condensado en el tapón. Agitar en vórtex enérgicamente durante 10 a 15 segundos. Hacer caer el tampón al fondo del tubo de forma que cubra el corte de tejido antes de volver a colocar el tubo en el baño de agua.
- 35 17. Microcentrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.
18. Calentar a 95°C durante 5 minutos.
19. Microcentrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.

40 El lisado de biomoléculas multi-uso resultante se puede usar en ensayos posteriores o almacenarlo a -20°C hasta su uso.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un lisado de biomoléculas, en el que el lisado de biomoléculas forma una biblioteca representativa de las proteínas de una muestra biológica fijada en formalina, que comprende las etapas de:
- 5 (a) calentar una composición que comprende la muestra biológica fijada en formalina y un tampón de reacción a una temperatura entre alrededor de 80°C y alrededor de 100°C y durante un periodo de tiempo suficiente para afectar negativamente a la reticulación proteica en dicha muestra biológica, en el que tal periodo de tiempo es de alrededor de 10 minutos a alrededor de 4 horas, y
- 10 (b) tratar la composición resultante con una cantidad eficaz de una enzima proteolítica durante un periodo de tiempo suficiente para alterar la estructura tisular y celular de dicha muestra biológica, en el que tal periodo de tiempo es de alrededor de 30 minutos a alrededor de 24 horas,
- en el que la enzima proteolítica es una endoproteasa.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica comprende una población sustancialmente homogénea de tejidos o células.
3. El método según la reivindicación 1, que comprende además, antes de la etapa (a), la etapa de eliminar toda la parafina presente en dicha muestra biológica mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en añadir un disolvente orgánico; calentar; calentar y añadir un tampón que comprende Tris; y calentar y añadir un disolvente orgánico.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de alterar mecánicamente dicha muestra biológica mediante al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en: homogeneización manual; agitación en vórtex; y mezcla física.
- 20 5. El método según la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento con enzima proteolítica se lleva a cabo a una temperatura entre alrededor de 37°C y alrededor de 65°C.
6. El método según la reivindicación 1, en el que dicho tampón de reacción comprende un detergente.
7. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en presencia de un detergente.
- 25 8. El método según la reivindicación 6, en el que dicho detergente se selecciona del grupo que consiste en Nonidet P40, SDS, Tween-20, Triton X, y desoxicolato sódico.
9. El método según la reivindicación 7, en el que dicho detergente se selecciona del grupo que consiste en Nonidet P40, SDS, Tween-20, Triton X, y desoxicolato sódico.
- 30 10. El método según la reivindicación 1, en el que dicha enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en quimotripsina, tripsina y endoproteinasa Lys-C.
11. El método según la reivindicación 1, en el que dicho tampón de reacción comprende Tris y tiene un pH en el intervalo de alrededor de 6,0 a alrededor de 9,0.
12. El método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho lisado hasta fracciones de biomoléculas diferentes y separadas y obtener una fracción de proteínas y una fracción de ácidos nucleicos.
- 35 13. El método según la reivindicación 12, en el que cada fracción de biomoléculas contiene biomoléculas diferentes y separadas adecuadas para el uso en ensayos bioquímicos.
14. El método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica se selecciona de un grupo que consiste en tejidos/células fijados en formalina, tejidos/células fijados en formalina/incrustados en parafina (FFPE), bloques de tejidos FFPE y células de esos bloques, y células de cultivos de tejidos que se han fijado en formalina y/o incrustado en parafina.
- 40 15. El uso de un equipo en un método para preparar un lisado biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende al menos:
- (a) una muestra biológica fijada en formalina
- 45 (b) una enzima proteolítica, y
- (c) un detergente,
- en el que la enzima proteolítica es una endoproteasa.

16. Un método para detectar uno o más analitos en un lisado de biomoléculas que se sospecha que contiene dicho analito o más analitos, en el que el lisado es una biblioteca representativa de todas las proteínas de una muestra biológica fijada en formalina obtenida mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende las etapas de:
- 5 (a) poner en contacto la fracción de proteínas obtenida mediante el método según la reivindicación 12 con una matriz, en la que dicha matriz comprende uno o más agentes de captura de especificidad de unión conocida inmovilizados sobre una superficie de soporte de una manera posicionalmente distinguible; y
- (b) detectar la unión o ausencia de unión de uno o más analitos en dicha fracción de proteínas obtenida a dichos reactivos de captura inmovilizados.
- 10 17. El método según la reivindicación 16, en el que dicho reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de un dominio, regiones estructurales modificadas, péptidos, aptámeros de ácidos nucleicos, un resto receptor, reactivos de afinidad, moléculas pequeñas, y ligandos de proteínas.
- 15 18. El método según la reivindicación 16, en el que la superficie de soporte comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, vidrio derivatizado, silicio, silicio derivatizado, silicio poroso, plástico, membranas de nitrocelulosa, membranas de nailon, y membranas de PVDF.
- 20 19. Un método para analizar una diversidad de lisados de biomoléculas obtenidos a partir de una diversidad de muestras biológicas fijadas en formalina mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que los lisados son bibliotecas representativas de las proteínas de dicha muestra biológica fijada en formalina que comprende las etapas de
- (a) inmovilizar una diversidad de las fracciones de proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica fijada en formalina mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 sobre una superficie de soporte, en el que cada lisado se inmoviliza en una posición discreta sobre dicha superficie;
- (b) poner en contacto dicha superficie de soporte con un reactivo de afinidad de unión conocida;
- 25 (c) detectar la presencia o ausencia de unión de dicho reactivo de afinidad de unión conocida en dichas posiciones específicas sobre dicha superficie de soporte.
20. El método según la reivindicación 19, en el que el lisado de biomoléculas se deposita sobre la superficie de soporte mediante un método seleccionado del grupo que consiste en depósito manual, inyección de tinta, impresión robótica por contacto, impresión robótica sin contacto y depósito piezoeléctrico.
- 30 21. El método según la reivindicación 19, en el que dicho reactivo de afinidad de unión conocida se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de un dominio, regiones estructurales modificadas, péptidos, aptámeros de ácidos nucleicos, un resto receptor, reactivos de afinidad, moléculas pequeñas, y ligandos de proteínas.
- 35 22. El método según la reivindicación 19, en el que dicha superficie de soporte comprende un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, vidrio derivatizado, silicio, silicio derivatizado, silicio poroso, plástico, membranas de nitrocelulosa, membranas de nailon, y membranas de PVDF.
23. El método según la reivindicación 16, en el que dicho lisado de biomoléculas se somete a una etapa de fraccionamiento antes de poner en contacto dicho lisado con dicha matriz.
- 40 24. El método según la reivindicación 16, en el que la etapa de detección (b) se lleva a cabo mediante el uso de un reactivo de detección que se une de manera específica a uno o más de los analitos que se sospecha que están presentes en dicha muestra.
25. El método según la reivindicación 24, en el que dichos reactivos de detección son proteínas.
26. El método según la reivindicación 19, en el que uno o más de dichos lisados de biomoléculas se someten a una etapa de fraccionamiento antes de inmovilizar una o más de las fracciones resultantes sobre dicha superficie.
- 45 27. El método según la reivindicación 26, en el que dicha fracción es una fracción que contiene proteínas.
28. El uso de un lisado de biomoléculas preparado mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones 12-14 en una técnica de diagnóstico.
- 50 29. El uso según la reivindicación 28, en el que dicha técnica se selecciona del grupo que consiste en cromatografía, matrices de proteínas, transferencia de Western, inmunoprecipitación, columnas de afinidad, ensayos de corte y empalme alternativo, análisis de mutaciones, amplificación de ácidos nucleicos, sondas marcadas para análisis de micromatrices, análisis de RFLP, transferencia de Southern, electroforesis en gel de poliacrilamida

unidimensional, electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional, análisis en serie de la expresión génica, HPLC, FPLC, espectroscopía de masas MALDI-TOF, espectroscopía de masas SELDI, cromatografía líquida, espectrometría de masas, ensayos ELISA, RT-PCR cuantitativa, detección de polimorfismos de nucleótidos simples, genotipado y secuenciación.

5

Figura 1

Preparación Líquida de Tejidos

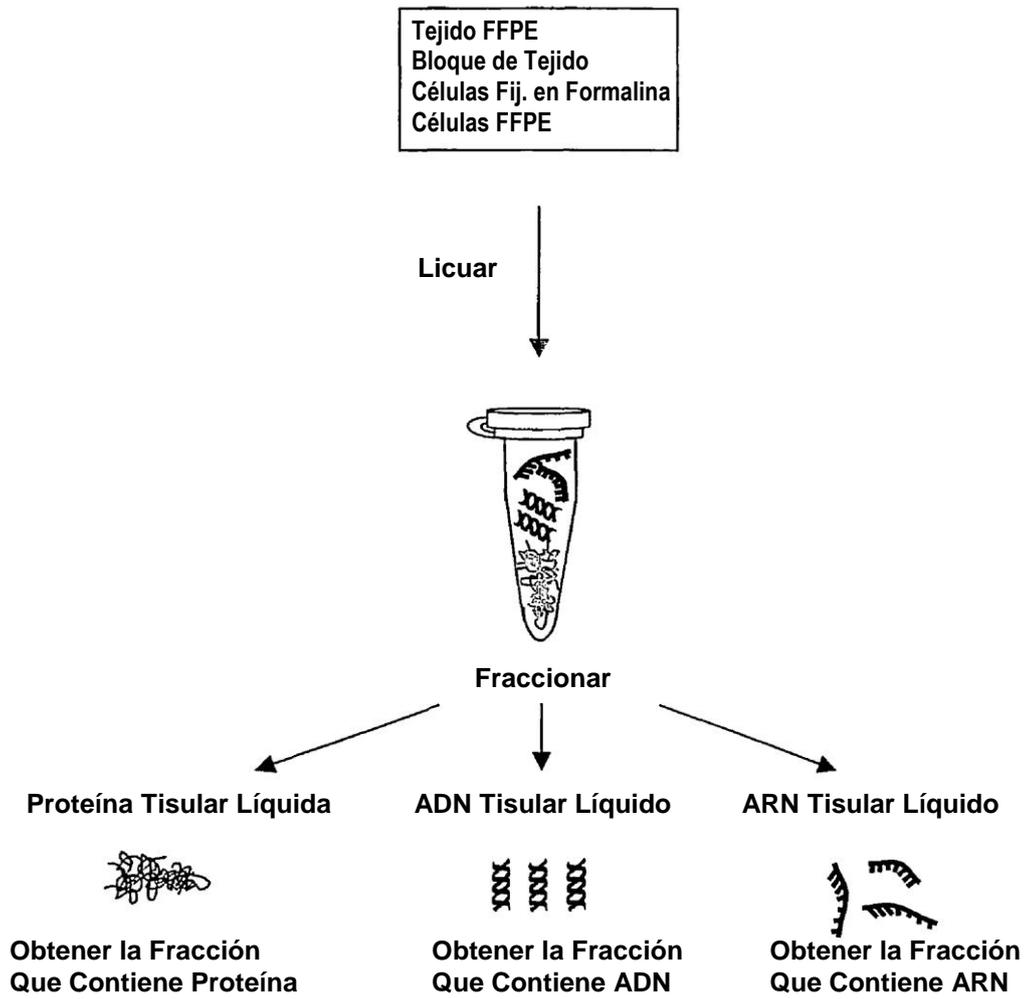


Figura 2

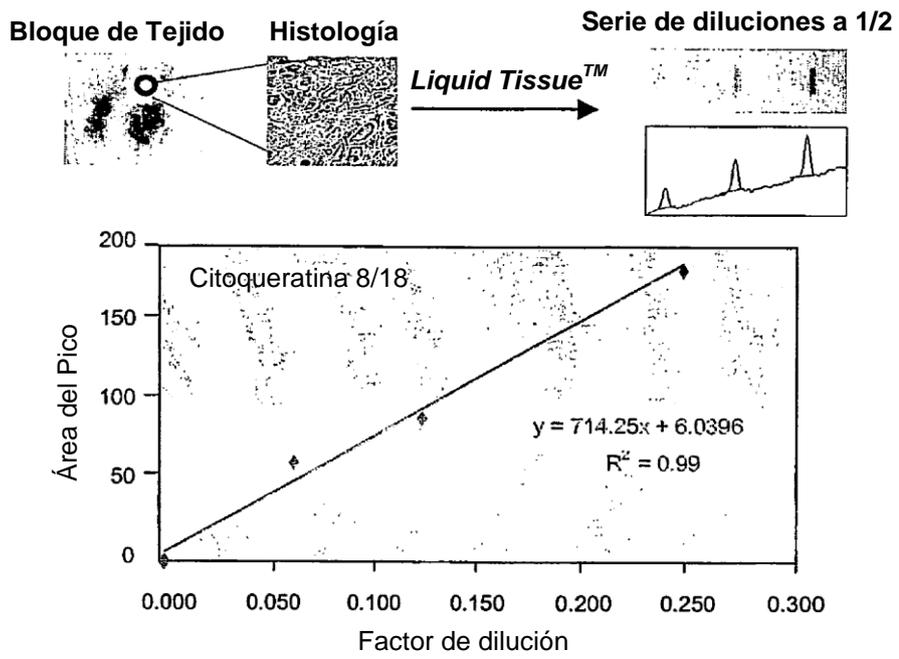
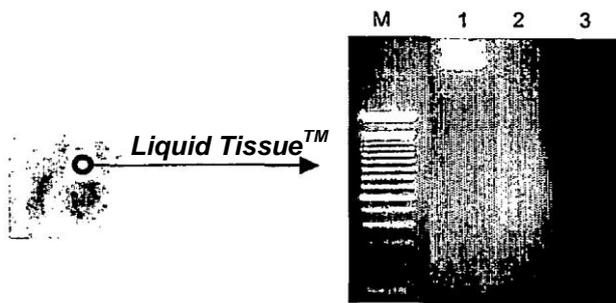


Figura 3



Carril 1. ADN de control genómico total

Carril 2. Fracción 1: contiene ADN

Carril 3. Fracción 2: contiene proteína en una preparación *Liquid Tissue™* habitual