

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 023**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008 E 08734758 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2132549**

54 Título: **Las alquilaminas mejoran la detección de compuestos en muestras biológicas fijadas con formaldehído**

30 Prioridad:

**30.03.2007 US 920939 P**

**08.08.2007 US 954721 P**

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

**26.12.2013**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**WILL, STEPHEN, GORDON;**

**BODEPUDI, VEERAI AH;**

**FISS, ELLEN, H. y**

**SHAHINIAN, RACHEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 436 023 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**

Las alquilaminas mejoran la detección de compuestos en muestras biológicas fijadas con formaldehído.

## 5 Antecedentes de la invención

10 Durante cientos de años los patólogos han preservado rutinariamente las muestras biológicas, tales como las muestras tisulares, mediante la fijación con formaldehído. Mientras que el tratamiento con formaldehído preserva las características celulares del tejido, el tratamiento con formaldehído también da como resultado entrecruzamientos químicos que provocan que la detección cuantificación y caracterización de muchos de los compuestos biológicos de la muestra resulten inaccesibles o difícilmente accesibles. El formaldehído preserva o fija el tejido o las células mediante el entrecruzamiento de grupos amina primarios de las proteínas con otros átomos de nitrógeno cercanos en la proteína o el DNA mediante un enlace -CH<sub>2</sub>-. Así, por ejemplo, mientras que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es útil para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos en las muestras biológicas, la PCR tiene una efectividad pobre o nula en relación al análisis de los ácidos nucleicos en las muestras entrecruzadas con formaldehído, especialmente cuando se desean resultados cuantitativos.

20 Por consiguiente, el entrecruzamiento de los ácidos nucleicos con compuestos celulares mediante la acción del formaldehído presenta dificultades relacionadas con la detección de varios compuestos celulares, incluyendo la detección de ácidos nucleicos y proteínas. Tales métodos se describen en la patente WO 9404906, la patente US 20040029184 o la patente WO 2006 066039, que describen tales dificultades. Mientras que algunos han descrito formas de mejorar la amplificación de ácidos nucleicos de las muestras entrecruzadas con formaldehído, habitualmente las mejoras incluyen la mera degradación de las proteínas en la muestra o la adición de detergentes que no suelen cambiar los enlaces covalentes que forman los entrecruzamientos. La presente invención se relaciona con este y otros problemas.

## 25 Breve resumen de la invención

30 La presente invención proporciona métodos para el análisis de uno o más compuestos de una muestra biológica entrecruzada con formaldehído. En algunas realizaciones, los métodos incluyen la puesta en contacto de la muestra con una cantidad suficiente de una alquilamina para liberar, al menos, una parte del compuesto entrecruzado y así mejorar la accesibilidad de tal uno o más compuestos para su análisis.

35 En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra tisular de un animal.

En algunas realizaciones, la cantidad de alquilamina es de entre el 0,01% (aproximadamente 2 mM) y el 5% (aproximadamente 800 mM).

40 En realizaciones preferibles, la muestra y la alquilamina se calientan durante un periodo de tiempo.

En algunas otras realizaciones preferibles, los métodos también incluyen la detección del compuesto.

45 En algunas realizaciones, la alquilamina se sustrae sustancialmente de la muestra antes del paso de detección. En algunas realizaciones, la concentración de alquilamina se reduce a menos de aproximadamente el 0,5% (aproximadamente 80 mM) (por ejemplo, menos de aproximadamente el 0,2% o el 0,1%) antes del paso de detección.

En algunas realizaciones, el paso de detección incluye la cuantificación del compuesto.

50 El compuesto es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es DNA. En algunas realizaciones, el compuesto es RNA.

55 En algunas realizaciones, los métodos también incluyen la detección del ácido nucleico. En algunas realizaciones, el paso de detección incluye la amplificación del ácido nucleico. En algunas realizaciones, el compuesto del ácido nucleico se pone en contacto con una sonda bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre la sonda y el ácido nucleico, y la detección de la presencia del dúplex. En algunas realizaciones, la sonda se enlaza a un soporte sólido. En algunas realizaciones, el paso de amplificación incluye la reacción en cadena de la polimerasa.

60 En algunas realizaciones no reivindicadas, el compuesto es una proteína. En algunas realizaciones, los métodos también incluyen la detección de la proteína. En algunas realizaciones, el paso de detección incluye la espectrometría de masas o electroforesis. En algunas realizaciones, la espectrometría de masas incluye la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).

65 En algunas realizaciones, la muestra se embebe en parafina antes del paso de contacto.

- En algunas realizaciones, la alquilamina se selecciona a partir del grupo que incluye etilendiamina, etanolamina, y propilamina.
- 5 En algunas realizaciones, la parte del compuesto disponible para el análisis aumenta, al menos, al doble en comparación a la parte accesible para el análisis si no se lleva a cabo en paso de contacto. En algunas realizaciones, la parte del compuesto disponible para el análisis incrementa, al menos, unas diez veces en comparación a la parte accesible para el análisis si no se lleva a cabo en paso de contacto.
- 10 En algunas realizaciones, los métodos también incluyen la puesta en contacto de la muestra con una proteasa para degradar la proteína en la muestra y así hacer que los ácidos nucleicos estén más disponibles para el análisis.
- 15 La presente invención también proporciona un equipo para la mejora de la disponibilidad de uno o más compuestos de una muestra biológica entrecruzada con formaldehído. En algunas realizaciones, el equipo incluye una alquilamina y medios para la sustracción de la alquilamina de una muestra biológica, por ejemplo, una proteasa o un reactivo o un aparato.
- En algunas realizaciones, el equipo incluye un reactivo o un aparato para sustraer la alquilamina de una muestra biológica. En algunas realizaciones, el aparato es una columna para la purificación de ácidos nucleicos.
- 20 En algunas realizaciones, el equipo incluye una proteasa. En algunas realizaciones, la proteasa es la proteinasa K.
- En algunas realizaciones, el equipo también incluye nucleótidos y/o una polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, la polimerasa termoestable es la Taq polimerasa.
- 25 La presente invención también proporciona mezclas de reacción. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción incluyen una muestra biológica entrecruzada con formaldehído, y una cantidad suficiente de una alquilamina para liberar al menos una parte del compuesto entrecruzado.
- 30 En algunas realizaciones, la cantidad de alquilamina es de entre el 0,01% y el 5%. En algunas realizaciones, la alquilamina se selecciona a partir del grupo que incluye etilendiamina, etanolamina, y propilamina. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra tisular de un animal.
- Definiciones
- 35 Una "muestra biológica entrecruzada con formaldehído" hace referencia a una muestra biológica que se ha tratado con formaldehído de modo que se forma un entrecruzamiento entre un nitrógeno de una proteína y otras proteínas y/o ácido nucleico que contiene nitrógeno. Habitualmente, una muestra biológica contiene células. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra tisular de un animal. Muchas muestras tratadas con formaldehído se almacenan embebidas en parafina.
- 40 Tal y como se utiliza aquí, el término "alquilamina" hace referencia a una molécula lineal o ramificada, saturada o insaturada de 1-10 o más átomos de carbono y uno o más grupos amino. La parte alquilo de la alquilamina puede ser metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, isobutilo, secbutilo, terbutilo, etc. Los grupos amino pueden ser primarios o secundarios. La alquilamina puede sustituirse adicionalmente con no más de dos (es decir, 0, 1 o 2)
- 45 sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a, uno o más grupos hidroxilo. Las alquilaminas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, etilamina, propilamina, isopropilamina, etilendiamina y etanolamina. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden utilizar otras alquilaminas en la presente invención.
- 50 La oración "la detección del compuesto" hace referencia a la determinación de, al menos, la presencia o ausencia del compuesto y puede incluir también la cuantificación u otra caracterización del compuesto o parte del compuesto.
- 55 Un "compuesto" de una muestra biológica hace referencia a una clase de molécula (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) o una diana específica tal como una proteína específica o una secuencia de ácido nucleico que se quiere detectar.
- Tal y como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico" hace referencia a polímeros de desoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa) (es decir, DNA), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) (es decir, RNA), y cualquier análogo del N-glucósido de una base de purina o pirimidina, o bases modificadas de purina o pirimidina.
- 60 La oración "para liberar, al menos, una parte del compuesto entrecruzado" hace referencia a alterar los enlaces covalentes que forman el entrecruzamiento entre los dos compuestos (por ejemplo, un ácido nucleico y una proteína) de la muestra biológica, de modo que los dos compuestos no se mantengan unidos mediante un enlace covalente. La oración incluye, pero no se limita a, la inversión completa del proceso de entrecruzamiento.
- 65 La oración "accesibilidad para el análisis", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a la capacidad de un método de detección para determinar la presencia o ausencia y/o la cantidad de una molécula diana particular. Por ejemplo,

muchos métodos de detección se inhiben, al menos, parcialmente en la detección de proteínas o ácidos nucleicos en una muestra entrecruzada con formaldehído y, por consiguiente, ciertos compuestos entrecruzados no son "accesibles" para su detección. Una vez que se libera el entrecruzamiento mediante el tratamiento con una alquilamina, se puede detectar y cuantificar una cantidad mayor del compuesto (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10% más y, habitualmente, al menos aproximadamente el doble, o a veces aproximadamente 10 o 100 veces más).

Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 ilustra un ejemplo del entrecruzamiento con formaldehído de ácidos nucleicos que contienen lisina, y la inversión del entrecruzamiento tras la adición de una alquilamina.

15 La figura 2 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del oligonucleótido no tratado descrito en el ejemplo 1.

La figura 3 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del oligonucleótido tratado con formalina descrito en el ejemplo 1.

20 La figura 4 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas de la mezcla tratada con formalina del oligonucleótido y la lisina, tal y como se describe en el ejemplo 1.

25 La figura 5 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas de la mezcla del oligonucleótido tratado con formalina y la lisina seguido del tratamiento con etanodiamina, lo que regenera el DNA de inicio a partir de los aductos de lisina y DNA entrecruzados, tal y como se describe en el ejemplo 1.

La figura 6 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del RNA sintético no tratado.

30 La figura 7 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del RNA sintético tras una hora de incubación con formalina.

La figura 8 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del RNA sintético tras cinco horas de incubación con formalina.

35 La figura 9 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del RNA sintético tras 24 horas de incubación con formalina.

La figura 10 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del RNA sintético tras una hora de incubación con formalina y lisina.

40 La figura 11 ilustra el análisis mediante espectrometría de masas del RNA sintético tras una hora de incubación con formalina y lisina, y la subsiguiente liberación de la reacción de entrecruzamiento con etanodiamina (EDA). La figura muestra que el RNA de inicio se regeneró a partir de los aductos de RNA y lisina entrecruzados.

45 La figura 12 ilustra el efecto de la etanodiamina (EDA). La concentración de EDA utilizada se muestra en porcentaje. Especialmente en este sistema, se observó que un 0,2% (aproximadamente 50 mM) de EDA o más inhibía la reacción de la PCR.

50 La figura 13 ilustra la inversión del entrecruzamiento con EDA en una muestra de tejido embebido en parafina y fijado con formalina (FFPET). La parte superior de la figura muestra que a concentraciones menores de EDA, la amplificación ocurre, se lleve a cabo o no la purificación con QIAquick™. No obstante, la cantidad de amplificación es menor en comparación a otros carriles. A concentraciones de EDA que inhiben la amplificación (por ejemplo, mayores a 0,1% (aproximadamente 25 mM)) no aparece amplificación cuando se lleva a cabo la purificación con QIAquick™, lo que representa una ventaja en la sustracción o inactivación de la EDA con anterioridad a la amplificación. La parte inferior de la figura proporciona un gráfico de los umbrales del ciclo frente a la señal, e ilustra que un aumento en la cantidad de EDA, en combinación con un paso de sustracción de la EDA, es efectivo en la mejora significativa de la cantidad de DNA en las muestras accesible para la amplificación mediante la PCR.

60 La figura 14 también ilustra que el tratamiento de las muestras FFPET con cantidades crecientes de EDA en la preparación de la muestra resulta en una accesibilidad mejorada de los ácidos nucleicos para su amplificación. En la parte superior de la figura se muestra un gráfico de los umbrales del ciclo (eje X) frente a la señal de amplificación. En la parte inferior el umbral del ciclo está en el eje Y y la concentración de EDA está en el eje X.

65 La figura 15 ilustra un gel de SDS-PAGE y muestra los resultados del entrecruzamiento con formalina de la albúmina sérica bovina (BSA) y la inversión subsiguiente del entrecruzamiento mediante el tratamiento con EDA.

Descripción detallada de la invención

## I. Introducción

5 Tal y como se muestra en la figura 1, el formaldehído resulta en el entrecruzamiento de los ácidos nucleicos con aminas primarias, principalmente aminoácidos tales como la lisina y la arginina en las proteínas. Como resultado del entrecruzamiento, varios compuestos biológicos de las muestras fijadas con formaldehído no son accesibles para los modernos métodos de detección. La presente invención proporciona métodos para invertir el entrecruzamiento y así permitir que más compuestos biológicos sean accesibles a la detección.

10 La inversión del entrecruzamiento en muestras tratadas con formaldehído se logra mediante la puesta en contacto de las muestras con una cantidad suficiente de una alquilamina para liberar la reacción de entrecruzamiento. En la figura 1 se ilustra una inversión ejemplar del entrecruzamiento (en este caso se muestran ácidos nucleicos entrecruzados mediante formaldehído a lisina, y la subsiguiente inversión de la reacción con una alquilamina).

15 Una vez que las muestras entrecruzadas se ponen en contacto con una alquilamina, el entrecruzamiento de los ácidos nucleicos y las proteínas se reduce o se elimina y se permite así la mejora en la detección de estos compuestos.

## II. Métodos para hacer que los compuestos entrecruzados sean más accesibles

20 La presente invención proporciona métodos para hacer que los compuestos entrecruzados con formaldehído de una muestra biológica sean más accesibles para la detección mediante la puesta en contacto de la muestra con una alquilamina. La cantidad de alquilamina utilizada para hacer que los compuestos sean más accesibles puede variar y dependerá, en parte, de la alquilamina específica utilizada, el compuesto que debe detectarse, y el método de  
25 detección que se utilice, dado que los diferentes métodos de detección tienen diferentes sensibilidades y pueden requerir que el compuesto sea más o menos accesible.

Idealmente, la cantidad de un compuesto accesible para un método de detección particular será la cantidad total del compuesto en la muestra. Sin embargo, generalmente la cantidad de compuesto accesible para la detección será  
30 menor a la cantidad total del compuesto en la muestra. En algunas realizaciones de la invención, se utiliza una cantidad suficiente de alquilamina bajo ciertas condiciones para hacer que la cantidad del compuesto accesible para la detección sea, al menos, el doble de la que sería accesible (utilizando el mismo método de detección) si la muestra no se tratara con la alquilamina. En algunas realizaciones, se utiliza una cantidad suficiente de alquilamina bajo ciertas condiciones para hacer que la cantidad del compuesto accesible para la detección sea, al menos 5, 10,  
35 20 o 100 veces mayor de la que sería accesible (utilizando el mismo método de detección) si la muestra no se tratara con la alquilamina. En algunas realizaciones, la concentración de alquilamina utilizada para liberar el entrecruzamiento de la muestra es de entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 5% (o mayor), por ejemplo, de entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 1%, de entre aproximadamente el 0,05% y aproximadamente el 2%, de entre aproximadamente el 0,05% y aproximadamente el 1%, y de entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 1%.

Los expertos en la materia apreciarán que las condiciones (por ejemplo, el tiempo y la temperatura) en las que se combinan la muestra y la alquilamina afectarán a la capacidad y a la cantidad de inversión del entrecruzamiento. El  
45 tratamiento con alquilamina es efectivo a temperatura ambiente (por ejemplo, entre 20-40 o 50°C) y, por consiguiente no requiere necesariamente un paso de calentamiento para liberar los entrecruzamientos. Esto puede ser particularmente útil cuando los compuestos de detección son relativamente lábiles, tal como el RNA. No obstante, temperaturas mayores (por ejemplo, 80-100°C, 90-100°C, 90-99°C, etc.) pueden mejorar de forma adicional la accesibilidad de los ácidos nucleicos o las proteínas para su detección.

Además, la cantidad de tiempo que la muestra se incuba con la alquilamina afectará a la cantidad de compuesto  
50 accesible para la detección. Por ejemplo, las muestras pueden incubarse con la alquilamina durante, al menos, aproximadamente 5, 10, 20, 30, 60, 120 minutos o más. Pese a que un tiempo de incubación superior puede aumentar la cantidad de compuesto que se libera del entrecruzamiento, esto debe equilibrarse con la labilidad de un compuesto particular. Por ejemplo, puede desearse utilizar un tiempo de incubación más corto cuando se debe  
55 detectar un compuesto lábil, tal como el RNA. Por otro lado, un compuesto menos lábil, tal como una proteína o un DNA, puede exponerse a una incubación más duradera sin dañar el compuesto.

Se reconocerá que se pueden utilizar diferentes alquilaminas para liberar el entrecruzamiento. Sin intención de  
60 limitar el ámbito de la presente invención, la alquilamina seleccionada generalmente será capaz de liberar los compuestos de los entrecruzamientos inducidos por el formaldehído y devolverá los compuestos (por ejemplo, los ácidos nucleicos y/o las proteínas) esencialmente en forma del mismo compuesto que existía con anterioridad al entrecruzamiento con el formaldehído. Se cree que la reacción de entrecruzamiento es un proceso reversible que procede mediante la reacción del formaldehído y una primera amina para formar un hemiaminal, seguido de la deshidratación para lograr una imina. La imina reacciona con una segunda amina para lograr el producto amina. El  
65 proceso se revierte hasta lograr los materiales de inicio mediante la reacción de la imina con agua en vez de con una segunda imina. Se cree que la alquilamina de la presente invención libera los compuestos de los entrecruzamientos

inducidos por el formaldehído actuando como reactivo competitivo en la formación de la imina y el amina. Cuando los entrecruzamientos se liberan como parte del proceso de equilibrio, el intermediario imina y el formaldehído reaccionan con la alquilamina para liberar los compuestos de los entrecruzamientos inducidos por el formaldehído. Generalmente, cualquier alquilamina con una amina primaria (y a veces una amina secundaria) será efectiva. Se podrá apreciar que pueden realizarse varias sustituciones en la alquilamina sin afectar sustancialmente a la capacidad de la amina de revertir el entrecruzamiento o sin crear otras porciones reactivas que pudieran reaccionar con los compuestos de la muestra, siempre que dichas sustituciones no interfieran con la capacidad de reacción del grupo funcional amina. Por ejemplo, la etanolamina es efectiva en la inversión de los entrecruzamientos. La etilendiamina también es efectiva, pero se reconocerá que otras diaminas también serán efectivas de modo similar en los métodos de la invención. Además, mientras que las cadenas alquilo cortas (por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5 carbonos) pueden ser preferibles, también se pueden utilizar cadenas de carbono más largas.

Se puede utilizar cualquier tipo de muestra biológica entrecruzada con formaldehído, de acuerdo con los métodos de la invención. Generalmente, las muestras tisulares derivarán de tejidos animales. En algunas realizaciones, las muestras se embeberán en parafina. Por ejemplo, las muestras pueden ser tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPET). En algunas realizaciones, las muestras se obtienen de un animal (por ejemplo, un humano) y luego se almacenan en una solución que contiene formaldehído para estabilizar la muestra con anterioridad al análisis, y por consiguiente se entrecruzan los ácidos nucleicos y/o las proteínas en la muestra. Por ejemplo, se puede almacenar una torunda cervical u otra torunda ginecológica (por ejemplo, para la detección de enfermedades de transmisión sexual) en una solución que contiene formaldehído y entrecruzar así los ácidos nucleicos y/o las proteínas en la muestra. El entrecruzamiento puede revertirse subsiguientemente mediante la utilización de una alquilamina, de acuerdo con los métodos de la invención.

Para lograr que los compuestos de la muestra sean más accesibles para la detección se pueden incluir pasos adicionales de purificación u otros pasos en los métodos de la invención. Por ejemplo, si se debe detectar un compuesto de ácido nucleico en la muestra, puede ser útil tratar la muestra (por ejemplo, antes o después del tratamiento con la alquilamina) con una proteasa, o degradar de otro modo la proteína en la muestra. Una proteasa ejemplar es la proteinasa K, aunque se apreciará que se puede sustituir con otras proteasas.

También en relación al método de detección que se utilice, puede ser deseable la sustracción o, al menos, la reducción de la cantidad de alquilamina asociada a la muestra antes de la detección de un compuesto. Por ejemplo, los inventores observaron la utilidad de purificar los ácidos nucleicos en la muestra del resto de compuestos de la muestra, así como de la alquilamina, mediante la utilización de un reactivo o dispositivo tal como una columna de centrifugación para purificar los ácidos nucleicos de las otras partes de la muestra. Un aparato ejemplar es una columna de centrifugación basada en sílice con afinidad por los ácidos nucleicos (tal como una columna de centrifugación QIAquick™ de QIAgen, Valencia, CA), aunque pueden utilizarse otros métodos de purificación métodos para sustraer la alquilamina.

De modo alternativo, la amina puede neutralizarse químicamente para que no sea capaz de interferir significativamente con la detección de un compuesto particular.

## II. Detección de compuestos en muestras biológicas entrecruzadas

Puede utilizarse cualquier método de detección en combinación con el tratamiento con alquilamina descrito con anterioridad para detectar un compuesto en la muestra previamente entrecruzada. Tal y como se describe con más detalle más adelante, los compuestos ejemplares de la muestra en los cuales el entrecruzamiento interfiere con la detección incluyen los ácidos nucleicos y las proteínas. La detección de compuestos puede incluir la simple determinación de la presencia o ausencia de un compuesto particular o parte del compuesto (por ejemplo, una proteína particular o una secuencia de un ácido nucleico). De manera alternativa, la detección puede incluir la cuantificación del compuesto y/o la caracterización del compuesto. La caracterización puede incluir, por ejemplo, la secuenciación del péptido o ácido nucleico y/o la determinación de las modificaciones postraduccionales o traduccionales, que incluyen por ejemplo la glicosilación, la fosforilación, etc.

### A. Ácidos nucleicos

En la materia se conocen muchos métodos para la detección de ácidos nucleicos. Se puede detectar, DNA, RNA (incluyendo mRNA, rRNA, etc.) o ambos. La detección puede incluir la cuantificación de una secuencia particular o RNA, y/o la caracterización de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante la secuenciación de nucleótidos o mediante técnicas de hibridación específicas de secuencia (por ejemplo, como las que se utilizan para detectar polimorfismos de nucleótido simples (SNP) y similares).

Debido a que la mayoría de las muestras tratadas con formaldehído embebidas en parafina son relativamente pequeñas, habitualmente es deseable la utilización de métodos de amplificación para amplificar un ácido nucleico particular y así ayudar a la detección de los ácidos nucleicos. Se puede utilizar cualquier tipo de método de amplificación, y se incluyen métodos de amplificación exponencial, amplificaciones lineales, métodos de termociclado o isotérmicos, etc. Los métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, la reacción

en cadena de la polimerasa (PCR) (Principles and Applications for DNA Amplification (editores, H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (editores, Innis, et al., Academic Press, San Diego, California, 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, que incluye las actualizaciones suplementarias de abril de 2004; Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª edición, 2001)), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (patentes de EE.UU. N° 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907; la patente EP 0 320 308 B1; la patente WO 90/01069; la patente WO 89/12696; y la patente WO 89/09835), la tecnología de sondas de ciclado (patentes de EE.UU. N° 5.011.769, 5.403.711, 5.660.988, y 4.876.187, y las solicitudes de patente publicadas en PCT WO 95/05480, WO 95/1416, y WO 95/00667), la tecnología Invader™ (patentes de EE.UU. N° 5.846.717; 5.614.402; 5.719.028; 5.541.311; y 5.843.669), la tecnología de la replicasa Q-Beta (patente de EE.UU. N° 4.786.600), NASBA (patente de EE.UU. 5.409.818; patente EP 0 329 822), TMA (Patentes de EE.UU. N° 5.399.491, 5.888.779, 5.705.365, 5.710.029), SDA (Patentes de EE.UU. N° 5.455.166 y 5.130.238). Se pueden utilizar varios tipos diferentes de polimerasa en las amplificaciones. En la patente de EE.UU. N° 4.889.818 se describe una enzima termoestable representativa, aislada a partir de *Thermus aquaticus* (Taq), y en Saiki et al., 1988, Science 239: 487- 91 se describe un método para su utilización en la PCR convencional. Otra enzima termoestable representativa incluye la DNA polimerasa de *Thermus species* Z05. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.674.738. De manera opcional, se puede utilizar la PCR a tiempo real u otras técnicas de amplificación cuantitativa para cuantificar una secuencia particular de ácido nucleico. Los métodos de amplificación cuantitativa se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, así como, por ejemplo, en Gibson et al., Genome Research 6: 995- 1001 (1996); DeGraves, et al., Biotechniques 34 (1): 106-10, 112- 5 (2003); Deiman B, et al., Mol Biotechnol. 20 (2): 163- 79 (2002). Esto puede ser particularmente útil a continuación de las reacciones de transcripción inversa (RT-PCR) para que se puedan medir los niveles de RNA de uno o más genes en una muestra. Los expertos en la materia conocen los métodos de RT-PCR (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., editores, 2002)) y estos se pueden adaptar fácilmente a los métodos de amplificación cuantitativa.

También se pueden utilizar otros métodos para detectar ácidos nucleicos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de una muestra e hibridarse con una sonda. En algunos ejemplos, la sonda estará unida a un soporte sólido (por ejemplo, un microchip).

#### B. Proteínas

Los compuestos proteicos de una muestra también pueden detectarse tras un tratamiento con una alquilamina. Se puede utilizar cualquiera de los muchos métodos de detección y caracterización de proteínas, de acuerdo con el método de la presente invención.

Un método de detección de proteínas ejemplar es la espectrometría de masas. Algunos métodos ejemplares de espectrometría de masas incluyen, pero no se limitan a, la ionización por pulverización y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), que incluye los métodos de MALDI con tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Véase, por ejemplo, Karas, M.; Hillencamp, F. Anal. Chem. 60: 2301 1988); Beavis, R. C. Org. Mass Spec. 27: 653 (1992); Creel, H. S. Trends Poli. Sci. 1 (11): 336 (1993) .

Una alternativa a la detección con espectrometría de masas es la utilización de electroforesis para separar y subsiguientemente detectar proteínas de interés. Los métodos de electroforesis incluyen métodos de electroforesis bidimensionales. De modo opcional, los métodos incluyen la detección subsiguiente de proteínas mediante Western Blot con anticuerpos.

Otras opciones incluyen la inmunodetección de proteínas. Se conocen varios ELISA y otros formatos para la inmunodetección de proteínas.

#### III. Equipos

La presente invención también proporciona equipos útiles para realizar los métodos de la invención descritos con anterioridad. Como tales, los equipos pueden incluir uno o más de los reactivos descritos aquí. Opcionalmente, los equipos pueden incluir instrucciones escritas (en papel) o electrónicas relacionadas con su utilización.

En algunas realizaciones, los equipos de la invención incluirán una alquilamina con, al menos, un reactivo adicional para detectar o mejorar la detección de un ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los equipos incluyen una alquilamina y una proteasa (que incluye, pero no se limita a la proteinasa K) para degradar la proteína y obtener ácidos nucleicos aún más accesibles para la detección. Otros reactivos para la detección o la mejora de la detección de un ácido nucleico o proteína incluyen, por ejemplo, reactivos útiles para las amplificaciones. Por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa típica puede incluir como reactivos, sin limitaciones, cebadores ascendentes y descendentes, al menos un molde, desoxirribonucleósidos trifosfato (que incluyen dATP, dCTP, dGTP, TTP, dUTP), una enzima polimerasa, tampones, cationes y sales metálicas. Un equipo para una reacción de RT-PCR también puede incluir una transcriptasa inversa y/o cebadores. Para la amplificación cuantitativa (por ejemplo, "a tiempo real") se utilizan una o más sondas de polinucleótido para que se hibriden con la diana deseada. Habitualmente, las sondas se marcan con un marcador detectable, por ejemplo, un marcador

fluorescente. Una sonda ejemplar es una sonda Taqman™, pese a que se apreciará que se pueden utilizar otros tipos de sonda para monitorizar una diana en una reacción de amplificación cuantitativa. Una reacción de amplificación basada en una secuencia de ácido nucleico (NASBA) puede incluir cebadores, una transcriptasa inversa, una RNasa H, y una DNA polimerasa. Una reacción de amplificación mediada por la transcripción (TMA) pueden incluir cebadores, una transcriptasa inversa y una RNA polimerasa. Una reacción de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) puede incluir un nucleótido modificado y una endonucleasa de restricción. Ciertas reacciones de amplificación también pueden incluir desoxiUridina N-glicosilasa (UNG) como reactivo de amplificación auxiliar (por ejemplo, Amperasa®, Roche Molecular Sciences, Alameda, CA) (véase, Kleiboeker, Virol J (2005) 11: 29).

Otros reactivos para la detección o la mejora de la detección de un ácido nucleico o proteína incluyen, por ejemplo, reactivos o aparatos para la purificación de proteínas o ácidos nucleicos, por ejemplo, tal y como se describe aquí.

#### IV. Mezclas de reacción

La presente invención también proporciona mezclas de reacción. Una mezcla de reacción ejemplar incluirá una muestra fijada con formaldehído (opcionalmente se incluye parafina) y una alquilamina, tal y como se describe aquí. Las mezclas de reacción pueden incluir las concentraciones de alquilamina que se describieron con anterioridad. Además, las mezclas de reacción se encuentran de manera opcional a las temperaturas mencionadas con anterioridad. Opcionalmente, las mezclas de reacción también pueden incluir una proteasa (por ejemplo, la proteinasa K).

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la inversión de la reacción de entrecruzamiento de los ácidos nucleicos con alquilaminas.

Se trató un oligonucleótido sintético (secuencia de DNA: AAG TCA GAA GGE AAA [E = 5-metil-dC], Id. de Sec. N° 1; 3 mM) o una secuencia de RNA: FCC CUC GCA GCC GUC CAA CAA CUC A [F = fluoresceína], Id. de Sec. N° 2; 3 mM) con formalina (solución tamponada de formalina al 10%, Sigma-Aldrich, HT50-1-1) en presencia de lisina (0,3 M) y se incubó a 4 °C durante 24 horas. La cinética de la reacción de entrecruzamiento se monitorizó mediante el análisis con CL-EM. Los datos de la MS sugieren que los productos en la mezcla de reacción consisten en oligonucleótidos entrecruzados con lisina mediante un puente de metileno y también aductos de formalina-oligonucleótido. Tras 24 horas, se observó que todos los oligonucleótidos detectados estaban entrecruzados en la mezcla de reacción. Se separaron el exceso de formalina y lisina del resto de la mezcla de reacción con anterioridad al tratamiento con etilendiamina. A esta mezcla de reacción (400 ml) se añadió etilendiamina (100 ml, 2,0 M) y se incubó a temperatura ambiente durante 1,0 hora. El análisis con CL-EM de la muestra confirma la inversión cuantitativa de la reacción de entrecruzamiento, lo que regenera los oligonucleótidos de inicio de todos los aductos entrecruzados. Los resultados del análisis con CL-EM en varios pasos de este procedimiento se ilustran en las figuras 2- 5.

Un ejemplo adicional de la inversión del entrecruzamiento se ilustra en las figuras 6-11, y esta vez se utiliza una molécula de RNA sintética como ejemplo.

##### Ejemplo 2

A continuación se proporciona un protocolo ejemplar para la detección de DNA:

##### Paso 1: seccionamiento del tejido

Cortar una sección de tejido de 20  $\mu$  mediante la utilización del microtomo RM2255 y colocar la sección en un tubo Eppendorf o un tubo de tapón de rosca de 1,5 ml.

##### Paso 2: reactivo de lisis

Añadir EDA al reactivo de lisis para obtener una concentración final de 500  $\mu$ M/225  $\mu$ l. Añadir 200  $\mu$ l del reactivo de lisis/EDA a cada tubo que contiene el espécimen.

##### Paso 3: paso de calentamiento

Incubar cada espécimen durante 30 minutos en un bloque térmico configurado a 98°C. Tras los primeros cinco minutos, sustraer cada espécimen del bloque térmico y agitar brevemente. Tras la agitación, centrifugar a 20.817 fcr (por ejemplo, Eppendorf 5417C, a 14.000 rpm) durante 5 segundos para convertir toda la parafina y el tejido en una solución. Asegurarse de que no queda parafina o tejido en las paredes del tubo. Devolver al bloque térmico durante los 25 minutos restantes.



Tras 25 minutos, sustraer los especímenes del bloque térmico y centrifugar a 20.817 fcr (por ejemplo, Eppendorf 5417C, 14.000 rpm) durante 5 segundos para formar una solución a partir de la parafina y el tejido. Enfriar cada espécimen durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5

Paso 4: pasos de lisis + proteinasa K

Añadir 20  $\mu$ l de PK en cada uno de los tubos que contienen el espécimen. Agitar brevemente y luego centrifugar a 20.817 fcr (por ejemplo, Eppendorf 5417C, 14.000 rpm) durante 5 segundos para formar una solución a partir de la parafina y el tejido. Asegurarse de que no queda parafina o tejido en las paredes del tubo.

10

Incubar cada espécimen durante 1 hora en un bloque térmico configurado a 65°C. Agitar brevemente y luego centrifugar a 20.817 fcr (por ejemplo, Eppendorf 5417C, 14.000 rpm) durante 5 segundos para formar una solución a partir de la parafina y el tejido. Asegurarse de que no queda parafina o tejido en las paredes del tubo.

15

Paso 5: paso de inactivación de la proteinasa K

Incubar cada espécimen lisado en un bloque térmico configurado a 98°C durante 10 minutos.

20

Tras el periodo de incubación de 10 minutos, sustraer rápidamente cada espécimen del bloque térmico configurado a 98°C y centrifugar durante 20 minutos a 20.817 fcr (por ejemplo, Eppendorf 5417C, 14.000 rpm) para sustraer los residuos del lisado. Si se deja que el lisado se refrigere demasiado antes de la centrifugación, no se formará una capa superior de parafina solidificada y la parafina se sustraerá junto al lisado. Preferiblemente, la parafina forma una capa superior solidificada.

25

Paso 6: pasos de centrifugación para sustraer los residuos

Marcar un nuevo tubo con tapón de rosca de 1,5 ml para cada espécimen con una identificación de muestra adecuada.

30

Transferir el lisado al tubo de 1,5 ml recién marcado. Evitar la capa superior de parafina y los residuos celulares del sedimento que se encuentra en el fondo del tubo.

35

Si se necesitara aclarar más la muestra se debería centrifugar el lisado durante 15 minutos más a 20.817 fcr (por ejemplo, Eppendorf 5417C, 14.000 rpm). Transferir el lisado a un nuevo tubo marcado de 1,5 ml.

Limpieza del lisado previa a la PCR

40

Transferir 100  $\mu$ l del lisado a un nuevo tubo marcado de 1,5 ml. Procesar de acuerdo al equipo de purificación de PCR de QIAquick® (QIAGEN Sciences). Eluir la muestra con un volumen final de 100  $\mu$ l.

Ejemplo 3

45

Este ejemplo ilustra la inversión de la reacción de entrecruzamiento proteína-proteína con etilendiamina.

Se añadió la proteína albúmina sérica bovina (BSA) (100  $\mu$ g, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l) a una solución de formalina (65  $\mu$ l, solución tamponada de formalina al 10%, Sigma-Aldrich, HT50-1-1) y se incubó a 4°C. Se tomaron alícuotas de la muestra tras 14 horas y 36 horas (25  $\mu$ l en cada momento). Entonces se añadió etilendiamina (25  $\mu$ l, 2,0 M) a estas alícuotas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras se analizaron mediante gel de SDS (figura 15).

50

Tal y como se muestra en el carril 4 (incubación de la proteína en formalina a 4°C durante 14 horas) de la figura 15, el entrecruzamiento proteína-proteína se completó. El carril 5 (incubación del producto entrecruzado proteína-proteína con etilendiamina a temperatura ambiente durante 1 hora) de la figura 15 indica que la reacción de entrecruzamiento proteína-proteína es reversible en presencia de etilendiamina. Sin embargo, si el tiempo de entrecruzamiento en formalina se extiende, el entrecruzamiento se revierte de modo incompleto (carriles 6-8 de la figura 15).

55

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas aquí sólo tienen propósitos ilustrativos y se sugerirán varias modificaciones o cambios a los expertos en la materia.

Listado de secuencias

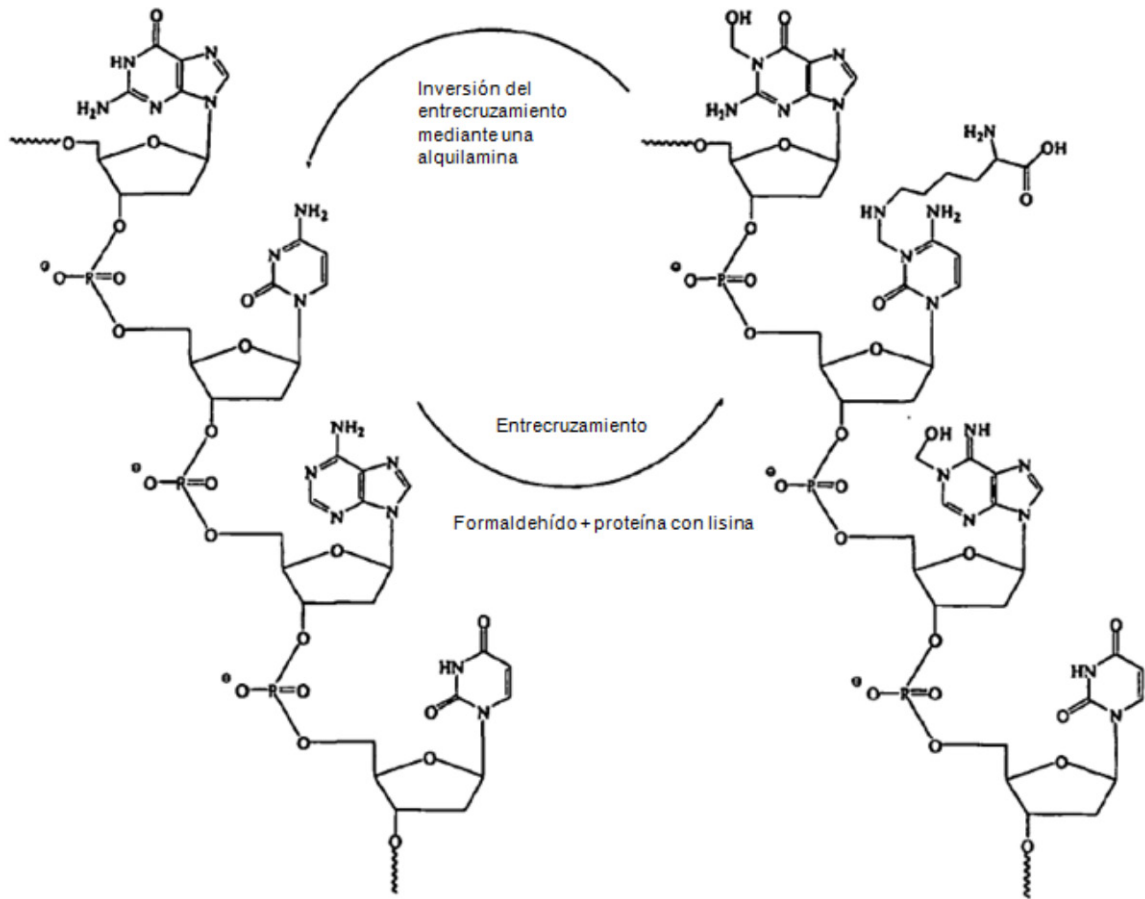
- <110> Roche Diagnostics GmbH, F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Las alquilaminas mejoran la detección de compuestos de muestras biológicas fijadas con formaldehído
- <130> Patente 24201WO
- 10 <140> US Sin asignación  
<141> Sin asignación
- <150> Patente US 60/920.939  
<151> 30-03-2007
- 15 <150> Patente US 60/954.721  
<151> 08-08-2007
- <160> 2
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 15  
<212> DNA
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Secuencia de DNA de oligonucleótido sintético
- 30 <220>  
<221> base modificada  
<222> (12) .. (12)  
<223> n = m5c
- 35 <400> 1  
aagtcagaag gnaaa 15
- <210> 2  
<211> 25
- 40 <212> RNA  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Secuencia de RNA de oligonucleótido sintético
- 45 <220>  
<221> base modificada  
<222> (1) .. (1)  
<223> c modificada mediante fluoresceína (F)
- 50 <400> 2  
cccucgcagc cguccaacca acuca 25

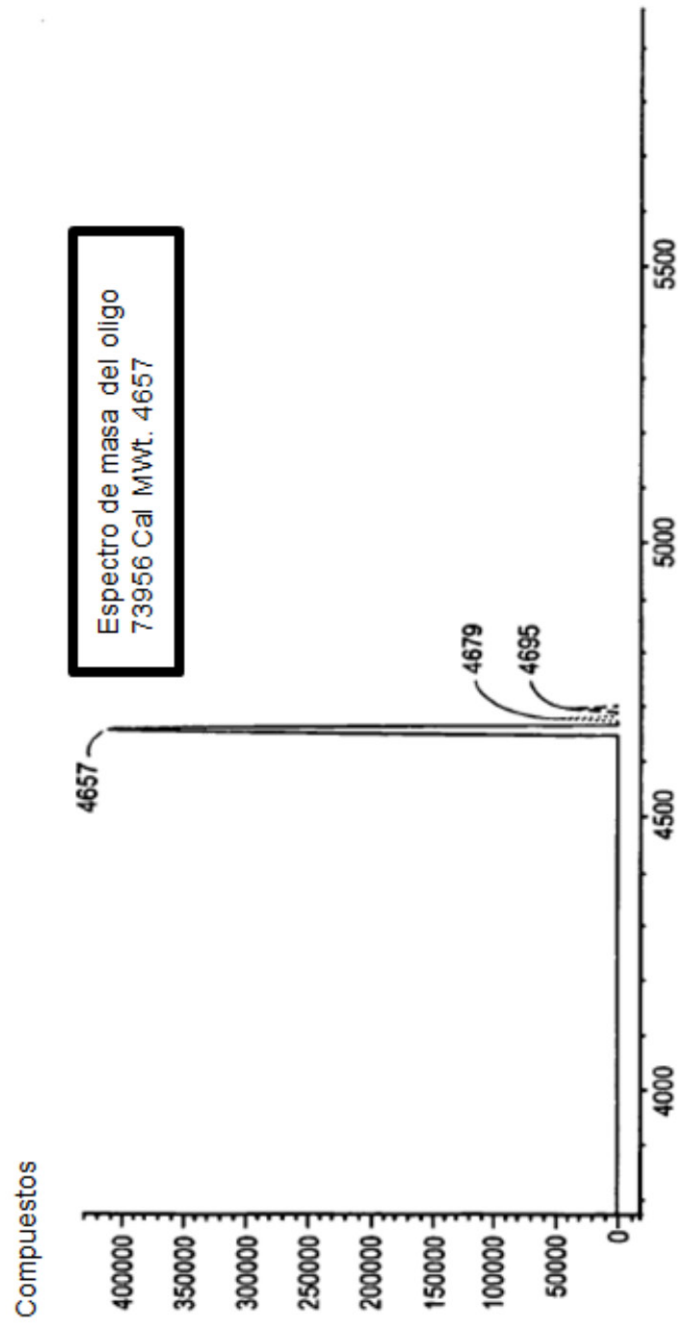
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para el análisis de uno o más compuestos de una muestra biológica entrecruzada con formaldehído, y el método incluye
- 10 (1) la puesta en contacto de la muestra a temperatura ambiente con una cantidad suficiente de una alquilamina seleccionada a partir del grupo que incluye etilendiamina, etanolamina, y propilamina para liberar, al menos, una parte del compuesto entrecruzado y así mejorar la accesibilidad de uno o más compuestos para el análisis,
- (2) la sustracción sustancial de la alquilamina de la muestra con anterioridad al paso de detección, y
- (3) la detección del(de los) compuesto(s), en el que los compuestos son ácidos nucleicos.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de alquilamina es de entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 800 mM.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de la alquilamina se reduce a menos de aproximadamente 80 mM antes del paso de detección
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que el paso de detección incluye la amplificación del ácido nucleico.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto de ácido nucleico se pone en contacto con una sonda bajo condiciones para permitir la formación de un complejo entre la sonda y el ácido nucleico, y la detección de la presencia del dúplex.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra se embebe en parafina antes del paso de puesta en contacto.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la parte disponible de los ácidos nucleicos para el análisis aumenta, al menos, aproximadamente el doble en comparación a la parte accesible para el análisis si no se lleva a cabo el paso de puesta en contacto.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que también incluye la puesta en contacto de la muestra con una proteasa para degradar la proteína de la muestra y así hacer que los ácidos nucleicos estén más disponibles para el análisis.
- 35 9. Un equipo para mejorar la disponibilidad de uno o más compuestos de ácido nucleico de una muestra biológica entrecruzada con formaldehído, y el equipo incluye
- 40 (1) una alquilamina seleccionada a partir del grupo que incluye etilendiamina, etanolamina, y propilamina;
- (2) un medio de sustracción de la alquilamina de la muestra biológica, en el que dicho medio de sustracción es una columna para la purificación de ácidos nucleicos; y
- (3) un reactivo para la detección o la mejora de la detección de dichos compuestos de ácido nucleico.
- 45 10. El equipo de la reivindicación 9, que también incluye nucleótidos y/o una polimerasa termoestable.
- 50 11. Una mezcla de reacción que incluye la muestra biológica entrecruzada con formaldehído; y una cantidad suficiente de una alquilamina seleccionada a partir del grupo que incluye etilendiamina, etanolamina, y propilamina para liberar, al menos, una parte de un compuesto entrecruzado de ácidos nucleicos, en el que la cantidad de alquilamina es de entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 800 mM.

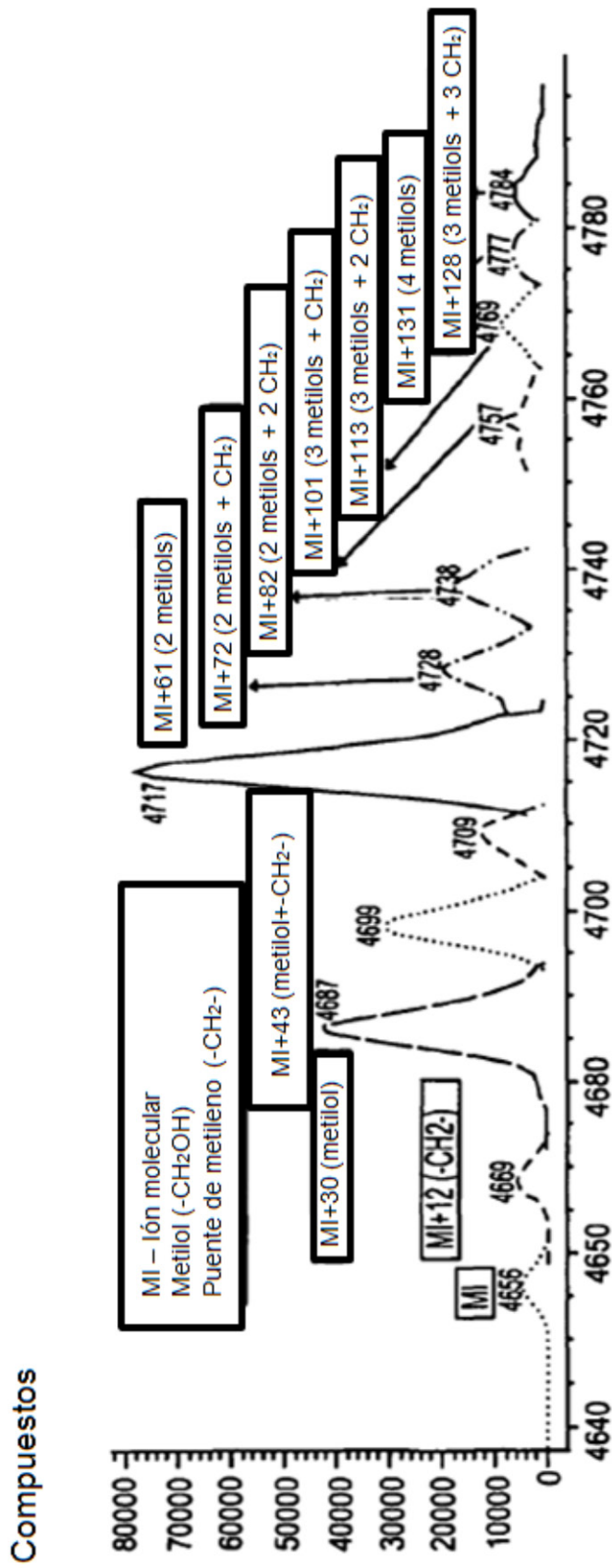
Figura 1

Reacción de entrecruzamiento

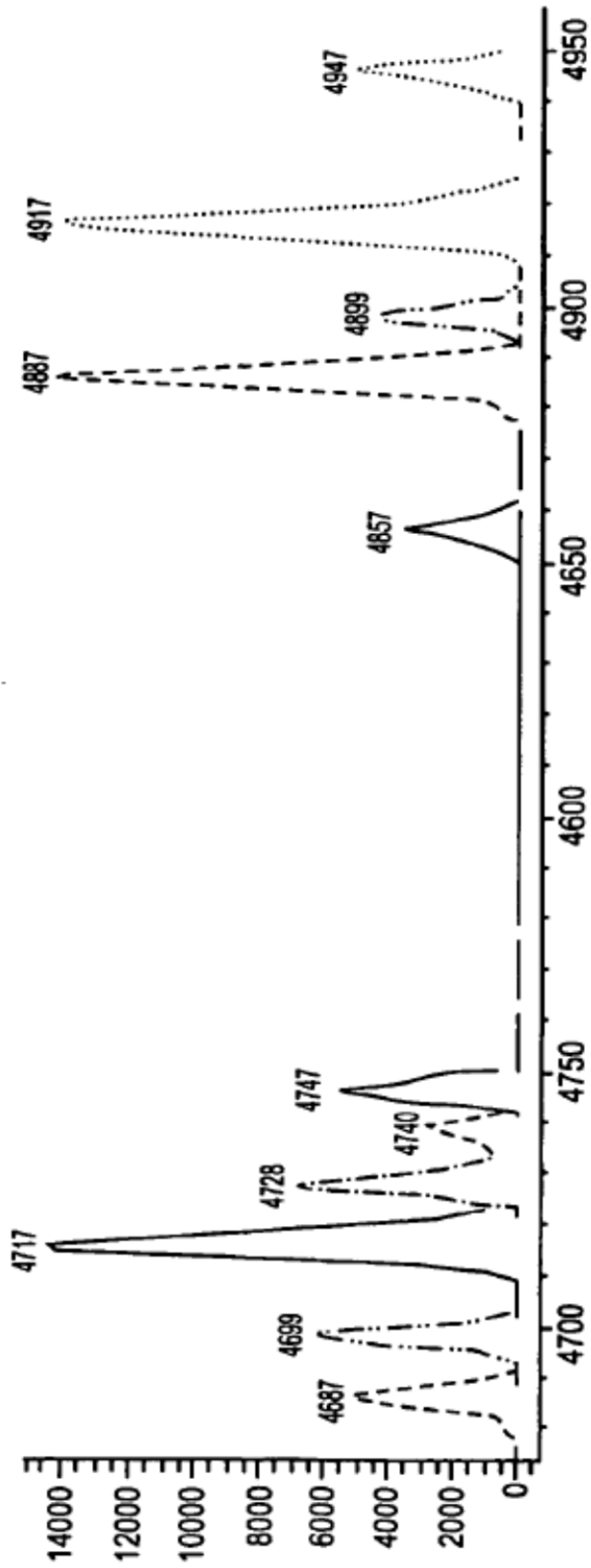




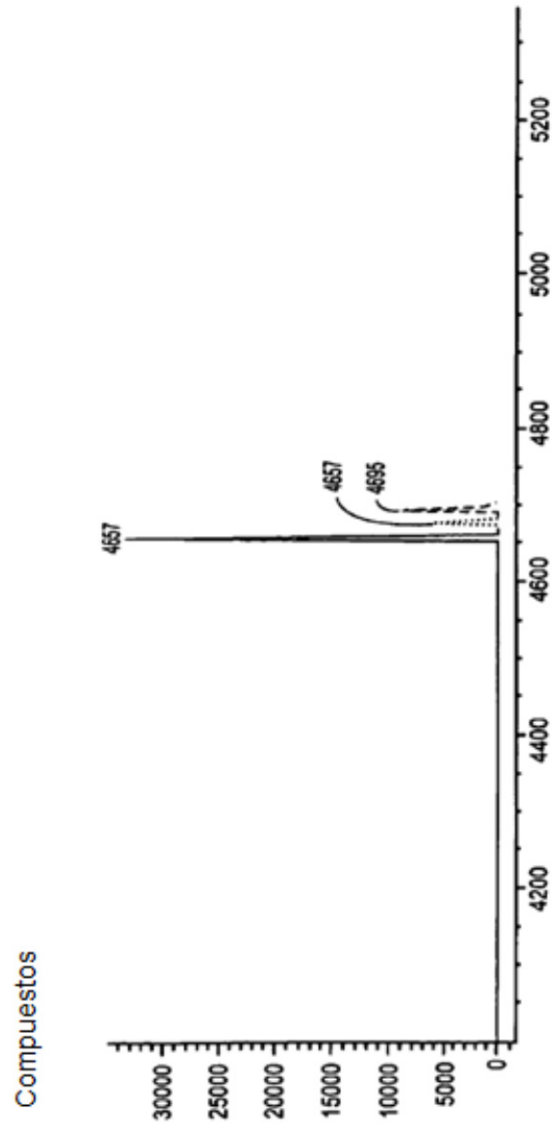
**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



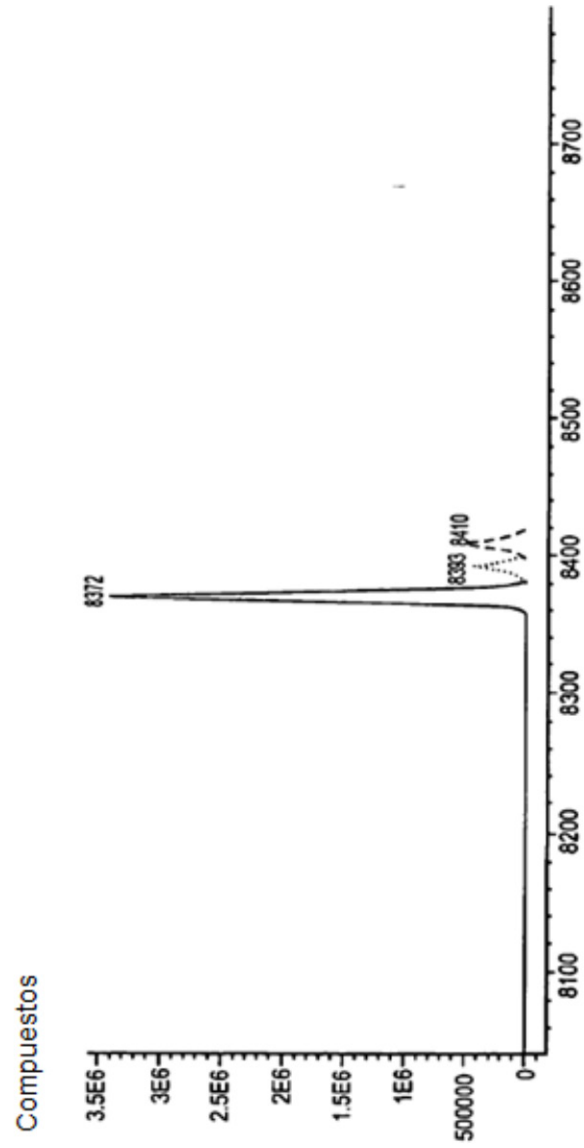
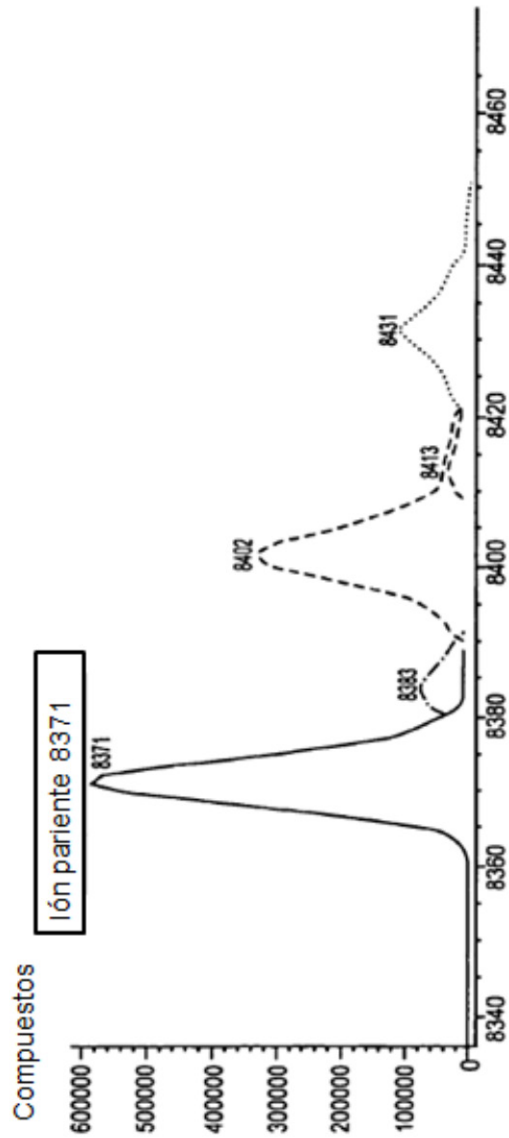
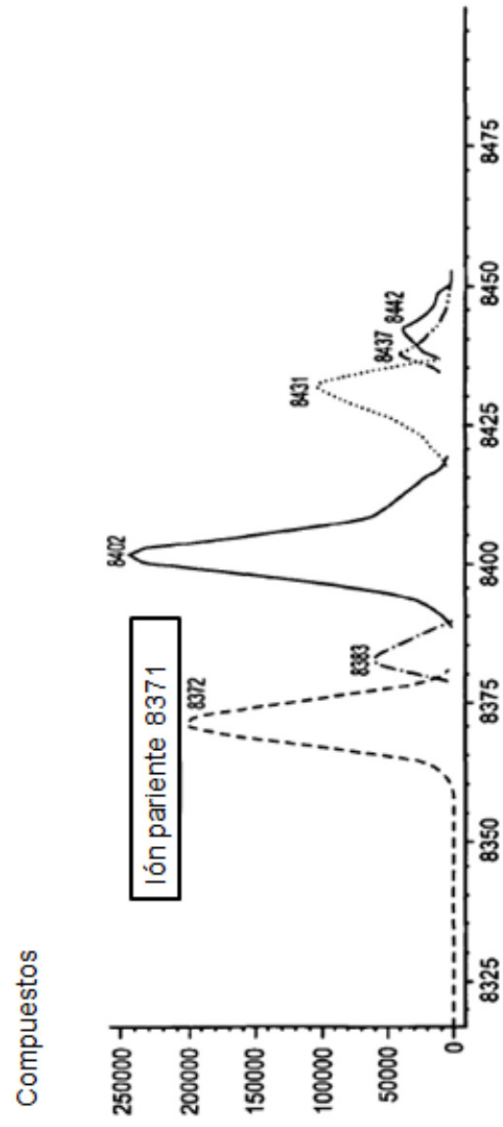


FIG. 6



**FIG. 7**



**FIG. 8**

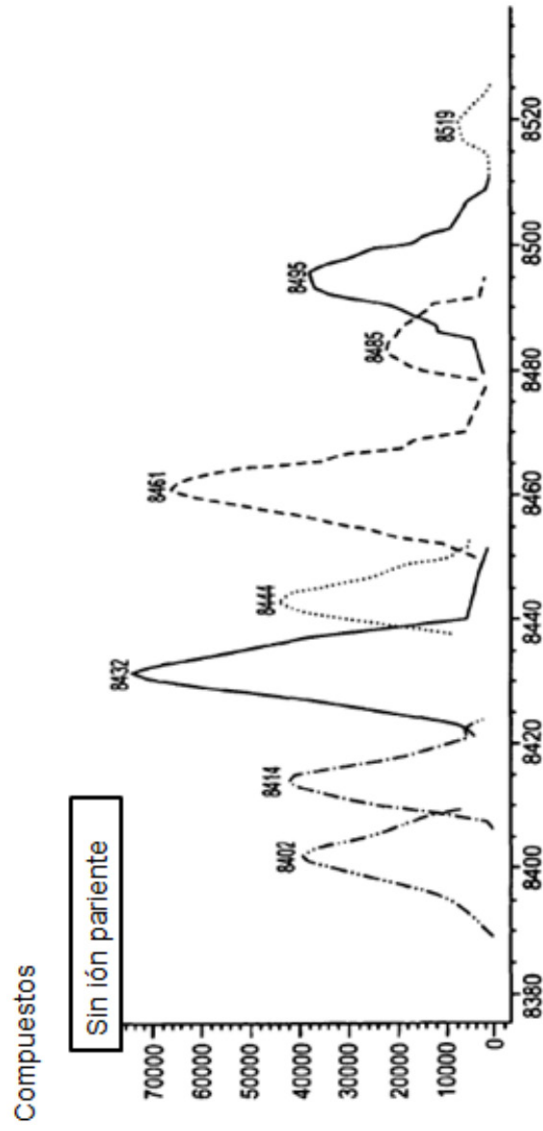
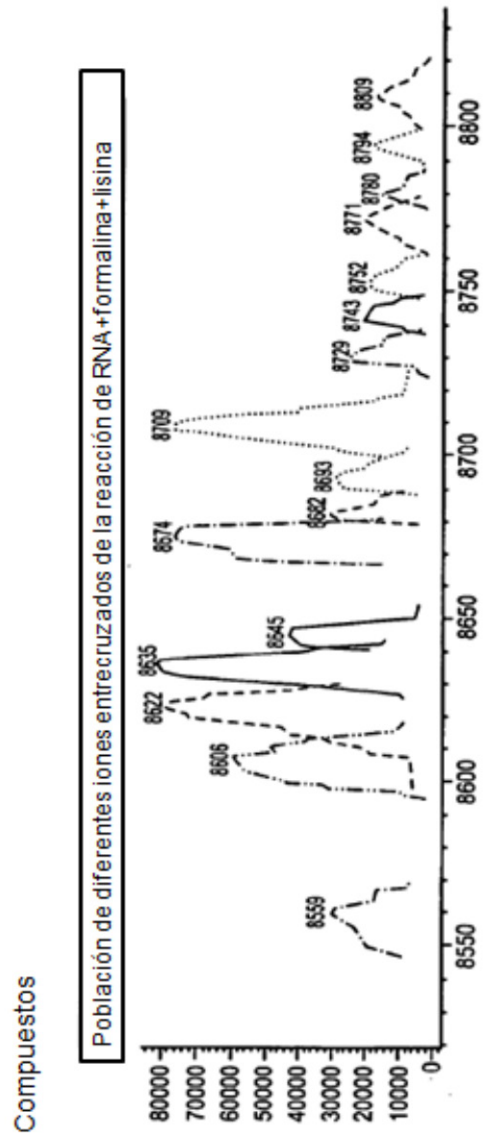
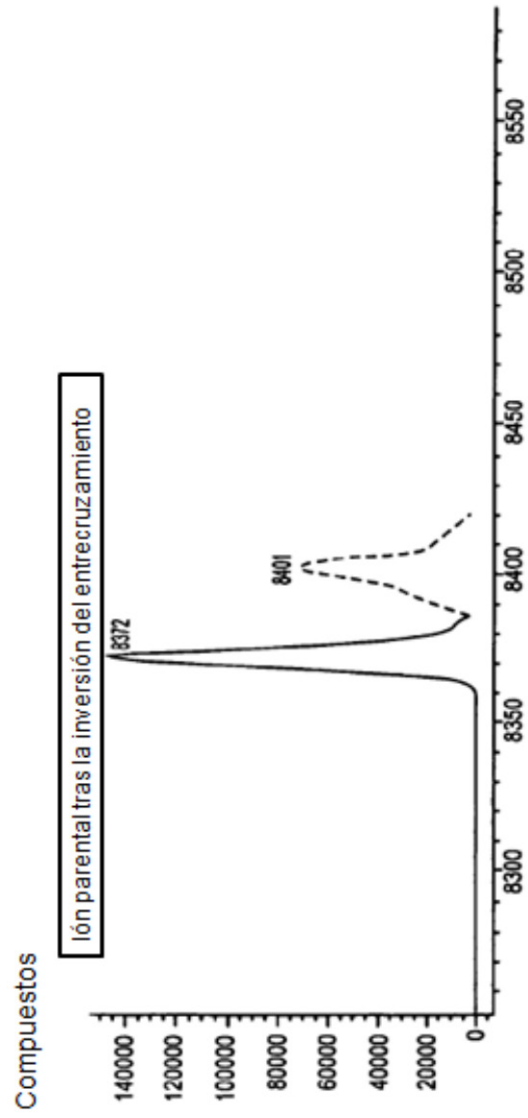


FIG. 9

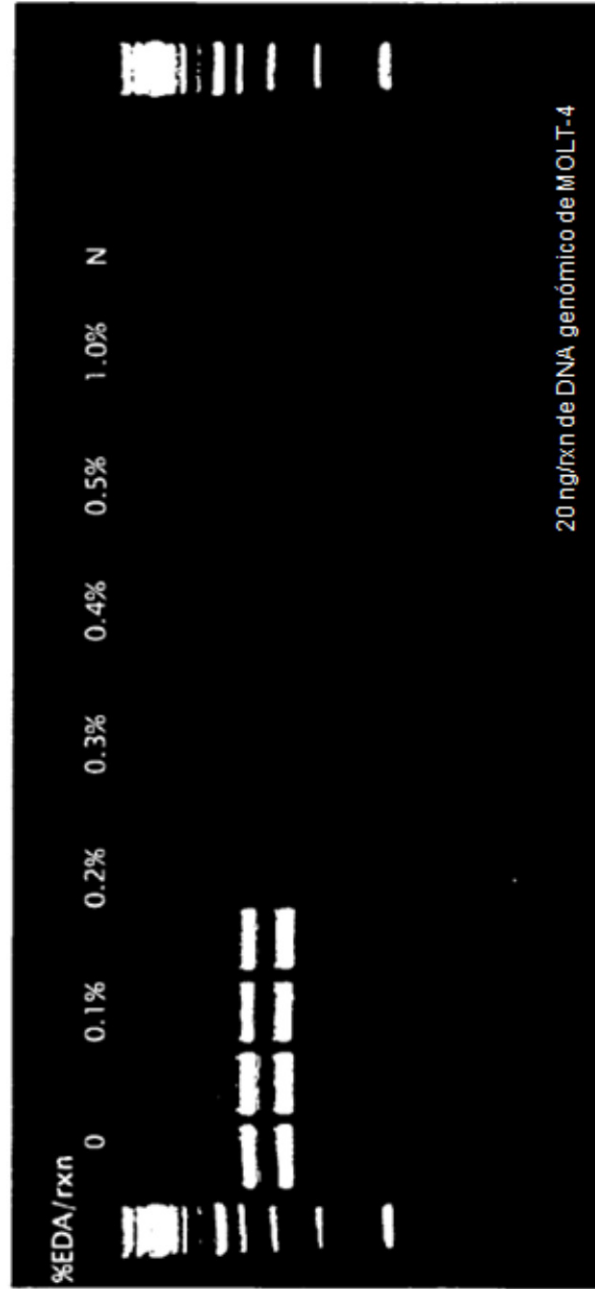


**FIG. 10**



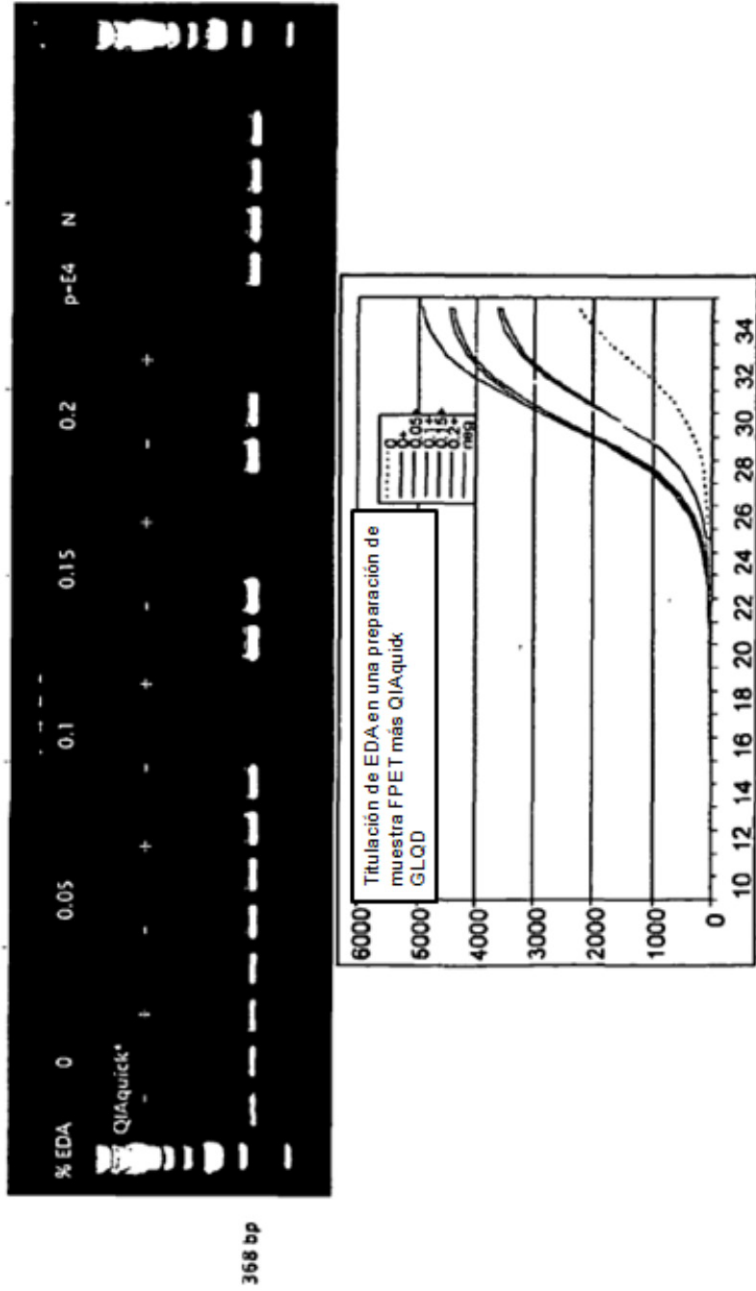
**FIG. 11**

Figura 12



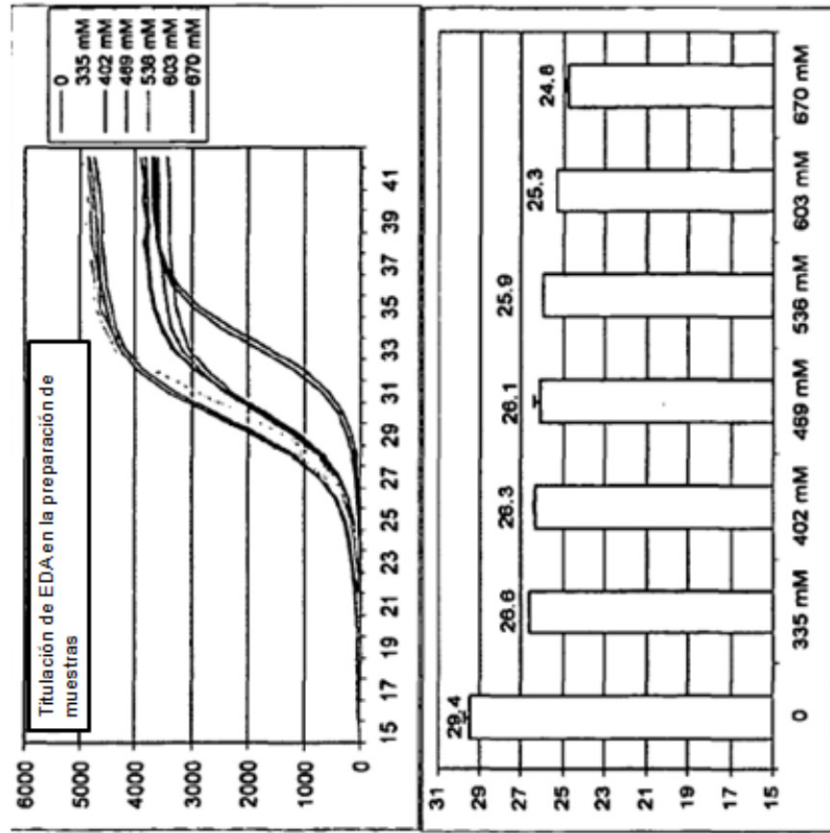
# Figura 13

Muestra de FPET: inversión del entrecruzamiento con la EDA

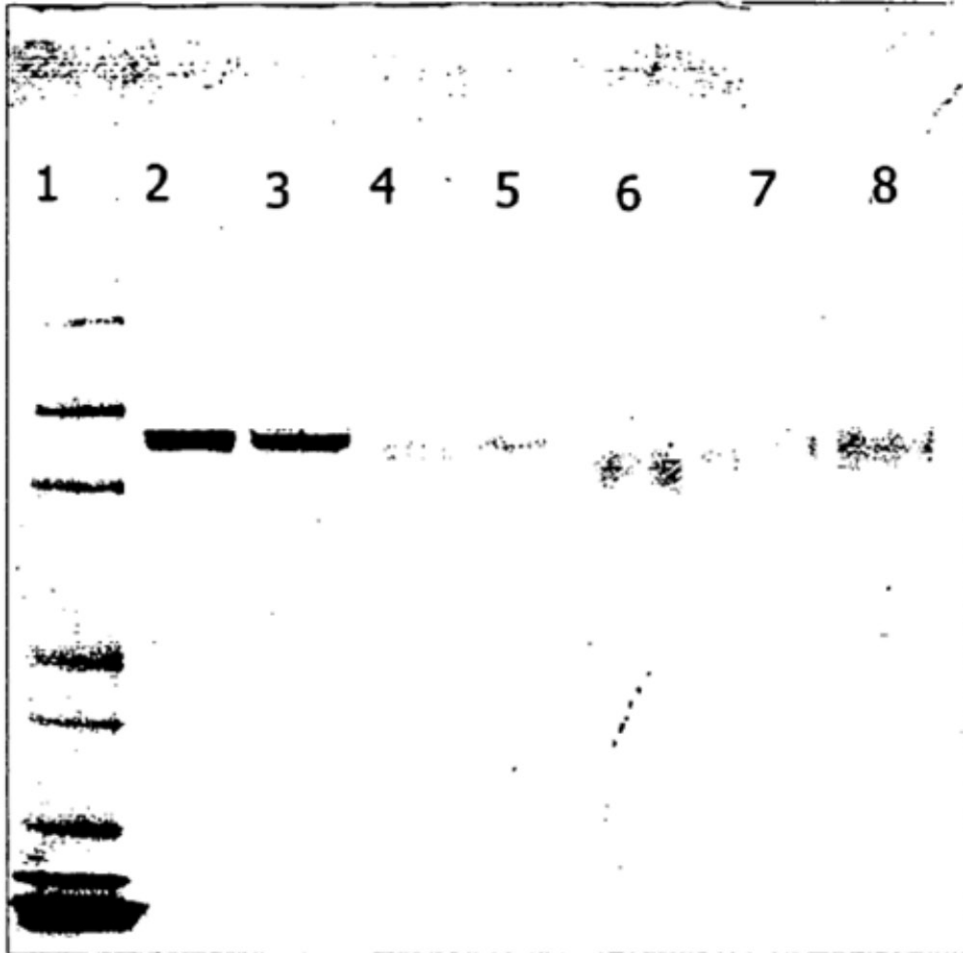




**Figura 14**  
**Tratamiento de las muestra de FPET con cantidades crecientes de EDA en la preparación de muestras**



## Figura 15



Línea 1: marcador

Líneas 2 y 3: BSA

Línea 4: BSA + formalina, 14 horas

Línea 5: BSA + formalina (14 horas) + EDA

Línea 6: BSA + formalina (36 horas) + EDA

Línea 7: BSA + formalina (36 horas) + EDA

Línea 8: BSA + formalina (36 horas) + EDA