

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 515**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2014 PCT/EP2014/051157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO2014114650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2014 E 14702215 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2948750**

54 Título: **Análisis de RT-qPCR de material microdisecionado a partir de la sección teñida de FFPET**

30 Prioridad:

24.01.2013 EP 13152579

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

24.05.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BAHLE, BEATRIX;
HEROLD, ANDREA;
LOHMANN, SABINE;
MOOSMANN, SABINE;
SCHUSTER, JULIAN y
SINGER, MONIKA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 613 515 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

Análisis de RT-qPCR de material microdisecionado a partir de la sección teñida de FFPET

5 Antecedentes de la invención

10 La presente descripción se refiere a un método para tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido embebida en parafina, fijada en formalina, que comprende las etapas de a) proporcionar un soporte sólido, b) montar la sección de tejido embebida en parafina y fijada en formalina sobre el soporte sólido, c) retirar la parafina de la sección de tejido embebida en parafina y fijada en formalina, d) calentar durante 12 a 24 h entre 50 a 70 °C la sección de tejido montada sobre el soporte sólido para recuperar los epítomos, y e) teñir la sección de tejido montada sobre el soporte sólido, en donde al menos la etapa e) se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. La presente descripción se refiere además a un equipo para llevar a cabo el método.

15 La fijación de formalina y la inclusión de parafina (FFPE) es un procedimiento bien conocido para la fijación de tejidos para la histología diagnóstica y el almacenamiento a largo plazo en la rutina clínica. Grandes archivos de muestras de tejido FFPE (FFPET) se utilizan para los estudios de descubrimiento de biomarcadores, así como los primeros estudios clínicos. Además, las muestras de FFPET pueden usarse para el aislamiento de RNA que puede aplicarse adicionalmente en análisis de expresión génica. Aunque, el RNA de muestras FFPET muestra un alto grado de degradación, todavía es suficiente para el análisis de RT-qPCR a condición de que una cantidad suficiente de material se utilice para el aislamiento de RNA. Dichos análisis pueden usarse para generar una primera hipótesis de biomarcador y simplemente para la prueba de hipótesis (Lohmann et al, Methods, 2013 Jan, 59 (1)).

20 Para poder separar los vasos sanguíneos y los nidos de células tumorales de las secciones de tejido FFPE y realizar el análisis RTqPCR, se combinaron las siguientes tecnologías: micro-disección por captura láser (LCM) de FFPET después de tinción inmunohistoquímica con análisis RT-qPCR después de Pre-amplificación del cDNA.

25 Los desafíos que experimenta la persona experta cuando se combinan LCM de secciones FFPET teñidas con IHC seguido de análisis RT-qPCR es la cantidad muy limitada de material después de LCM, la degradación del RNA después de la fijación del tejido de muestra y además la degradación de RNA durante el procedimiento de tinción inmunohistológica. El procedimiento de tinción clásico incluye la recuperación del epítomo (por ejemplo, el protocolo HIER a 98 °C) y los tiempos de incubación con tampones que no pueden producirse bajo condiciones libres de RNAasa (solución de anticuerpo, tampones de lavado, colorantes). La degradación de RNA descrita en combinación con la cantidad muy limitada de material después de LCM es el problema principal de este flujo de trabajo si se pretende que el RNA se utilice en análisis RT-qPCR. La degradación del RNA conduce a resultados no fiables en los análisis de expresión génica siguiendo LCM, por ejemplo, la relación entre un biomarcador de interés y un gen de referencia. La estabilidad del RNAm es específica del gen y por lo tanto se están degradando a una extensión diferente, dando lugar a resultados erróneos en la cuantificación relativa para el análisis de la expresión génica.

30 Para superar este problema de degradación de RNA, se han establecido procedimientos diferentes para mantener la degradación al mínimo. La mayoría de las publicaciones, por ejemplo, utilizan tejido recién congelado (FF) que tiene la ventaja de menos procesos de degradación cuando se usa para análisis RT-qPCR. El principal inconveniente, sin embargo, es el hecho de que el tejido FF es una fuente ampliamente limitada en comparación con FFPET (Buckanovich et al., Cancer Biol Ther. 2006 Jun; 5 (6): 635-42; Gjerdrum et al., Diagn Mol Pathol 2004 (13), página 224-233). A menudo es difícil obtener una cantidad suficiente de tejido FF para realizar un estudio que conduce a resultados estadísticamente significativos. Además, el material de muestra clínico disponible para pruebas retrospectivas es típicamente FFPET.

35 Por lo tanto, un foco principal en este campo fue el desarrollo de técnicas que utilizan FFPET en combinación con análisis LCM y RT-qPCR que minimizan la degradación del RNA. Se desarrollaron procedimientos de tinción ultrarrápidos para las secciones FFPET para minimizar la degradación del RNA durante la tinción. Sin embargo, al analizar el RNA de tales secciones microdisecionadas de FFPET teñidas de forma ultrarrápida, se demostró que después de la incubación de anticuerpos con períodos de incubación muy cortos (2x5 min.), aproximadamente el 90% del RNA se degradaba en comparación con una tinción histológica simple (Hematoxilina) (Gjerdrum et al., Diagn Mol Pathol 2004 (13)). Además, los protocolos de tinción ultrarrápidos no son aplicables a todos los anticuerpos, ya que algunos necesitan varias horas para incubar durante la noche (Brown et al., RNA Journal 2009 (15), Pág. 2364-2374). Tales procedimientos de incubación a largo plazo conducen a una degradación masiva del RNA, de tal manera que los análisis de expresión génica son simplemente imposibles.

40 Por lo tanto, el objeto de la presente descripción es proporcionar una técnica de tinción mejorada para las secciones de FFPET utilizadas posteriormente para el aislamiento de RNA, en donde la técnica de tinción mejorada conduce a un rendimiento y calidad del RNA aislado de secciones FFPET suficientes para el análisis de RNA, Tales como el análisis de la expresión génica.

65 Resumen de la invención

Se encontró que concentraciones elevadas de cloruro sódico de 0,5 a 3,0 M en el método de tinción descrito en este documento aplicado a las secciones de tejido montadas en el soporte sólido, previene la degradación de RNA aislado posteriormente de las secciones de tejido. El método de acuerdo con la descripción es adecuado para los procedimientos de tinción, en los que el RNA se aísla después de la tinción y en la que es necesaria una calidad muy alta del RNA, como para los análisis de expresión génica.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un método para tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina, que comprende las etapas de a) proporcionar un soporte sólido, b) montar la sección de tejido embebida en parafina y fijada en formalina sobre el soporte sólido, c) retirar la parafina de la sección de tejido embebida en parafina y fijada en formalina, d) calentar durante 12 a 24 h entre 50 a 70 °C la sección de tejido montada sobre el soporte sólido para recuperar los epítomos, y e) teñir la sección de tejido montada sobre el soporte sólido, en donde al menos la etapa e) se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M.

Además, la presente descripción se refiere a un equipo para realizar el método como se describe en la presente memoria, en el que el equipo comprende a) un soporte sólido revestido con poli-lisina, b) una solución para la recuperación de epítomos, y c) una solución para tinción inmunohistoquímica que comprende cloruro sódico en una concentración de 0,5 a 3,0 M.

Figuras

Fig. 1: La figura muestra el resultado de un análisis espectrofotométrico de la concentración de RNA aislado. Se representa la mediana +/- desviación estándar de las concentraciones de RNA de los extractos aislados de secciones FFPET sin teñir (no teñidas), aisladas de secciones FFPET teñidas con CD31 en ausencia de cloruro sódico (sin NaCl) y aisladas de secciones FFPET teñidas con CD31 en presencia de cloruro sódico (con NaCl). Los datos se obtuvieron a partir de tres repeticiones independientes cada una.

Fig. 2: La figura muestra los valores Cp de un análisis RT-qPCR del gen de referencia HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa). Se representa la mediana +/- desviación estándar de los valores Cp de los experimentos RT-qPCR. Se aisló RNA a partir de secciones FFPET sin teñir (no teñidas), aisladas de secciones FFPET teñidas con CD31 en ausencia de cloruro de sodio (sin NaCl) y aisladas de secciones FFPET teñidas con CD31 en presencia de cloruro sódico (con NaCl). Los datos se obtuvieron a partir de tres repeticiones independientes cada una.

Fig. 3: La figura muestra los valores de Cp de un análisis RT-qPCR del gen de referencia ALAS1 (deltaaminolevulinato sintasa 1). Se representa la mediana +/- desviación estándar de los valores de Cp de los experimentos RT-qPCR. Se aisló RNA a partir de secciones FFPET sin teñir (no teñidas), aisladas de secciones FFPET teñidas con CD31 en ausencia de cloruro de sodio (sin NaCl) y aisladas de secciones FFPET teñidas con CD31 en presencia de cloruro sódico (con NaCl). Los datos se obtuvieron a partir de tres repeticiones independientes cada una.

Fig. 4: La figura muestra la expresión del Marcador 1 y el Marcador 2 normalizados al gen de referencia HPRT, respectivamente. Se representa la expresión génica relativa de Marcador 1 y Marcador 2 a partir de células tumorales microdisecionadas y células vasculares, respectivamente. Los experimentos se realizaron en duplicados.

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y el alcance de diversos términos usados en la presente descripción.

Los términos "un", "una" y "el" generalmente incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "alrededor", tal como se usa aquí en conjunción con un valor numérico, modifica dicho valor extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores. En general, el término "alrededor" modifica un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado mediante una varianza de 5% más o menos. Por ejemplo, un valor de "alrededor de 100" significa un intervalo de "95 a 105".

El término "amplificación" se refiere generalmente a la producción de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico a partir de un ácido nucleico diana en el que los cebadores se hibridan a sitios específicos sobre las moléculas de ácido nucleico diana para proporcionar un sitio de iniciación para la extensión mediante una polimerasa. La amplificación puede llevarse a cabo por cualquier método generalmente conocido en la técnica, tal como, pero sin limitarse a: PCR estándar, PCR larga, PCR de inicio en caliente, qPCR, RT-PCR y amplificación isotérmica.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una inmunoglobulina completa, tal como una IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o a un fragmento de un anticuerpo, tal como un Fab, Fv o Fc o un anticuerpo

fusionado, un fragmento de anticuerpo fusionado o cualquier otro derivado de un anticuerpo. El término anticuerpo marcado se refiere a un anticuerpo que está marcado con una enzima, un colorante fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, biotina, avidina o un radioisótopo.

5 El término epítipo se refiere a una región antigénica de un compuesto, tal como una proteína, un carbohidrato o un lípido. La región antigénica típicamente consiste de 5 a 8 aminoácidos. El epítipo está específicamente reconocido por los sitios de unión al antígeno del anticuerpo correspondiente.

10 El término "tejido o célula fijada" se utiliza aquí como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a tejido biológico o células que se conservan de la descomposición mediante métodos de fijación química. Tales métodos impiden la autólisis o la putrefacción dentro de tales tejidos o células biológicas. La fijación termina reacciones bioquímicas y aumenta la estabilidad mecánica del tejido tratado.

15 El término "inmunohistoquímica" e "inmunohistoquímico" se refiere a una técnica para detectar la presencia de un antígeno con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicho antígeno en muestras histológicas. La detección del complejo anticuerpo-antígeno se produce generalmente por una reacción cromogénica con un anticuerpo marcado con enzima o por un anticuerpo marcado con fluorescencia.

20 El término "macrodissección" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso de raspar un área de interés desde una sección de tejido montada sobre un soporte sólido, tal como un portaobjetos de microscopio, utilizando una herramienta tal como un bisturí o una espátula.

25 El término "portaobjetos de membrana", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a soportes sólidos o portaobjetos de microscopio para su uso en la microdissección por captura láser (LCM). Para la microdissección se pueden usar portaobjetos de vidrio cubiertas con una membrana o portaobjetos que consisten en un marco metálico que puede cubrirse con varias membranas. El material de la membrana puede seleccionarse del grupo que consiste en sulfuro de polifenileno (PPS), naftalato de polietileno (PEN), poliéster (POL) y fluocarburo (FLUO).

30 El término "microdissección" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso de cortar y separar una o más células específicas o un área de interés de una muestra de tejido. Por ejemplo, la microdissección puede realizarse usando microdissección por captura láser (LCM) cortando el área relevante con un láser.

35 El término "ácido nucleico" se refiere generalmente a DNA o RNA, ya sea un producto de amplificación, creado sintéticamente, productos de transcripción inversa de RNA o de origen natural. Típicamente, los ácidos nucleicos son moléculas sencillas o bicatenarias y están compuestas por nucleótidos naturales. Las moléculas de ácido nucleico de doble cadena pueden tener salientes en 3' o 5' y, como tales, se asume que son de doble cadena por completo en toda su longitud. Además, el término ácido nucleico puede estar compuesto de nucleótidos no naturales y / o modificaciones de nucleótidos naturales. Los ejemplos se enumeran aquí, pero no se limitan a: fosforilación de nucleótidos 5' o 3' para permitir la ligación o prevención de la degradación de exonucleasa/extensión de polimerasa, respectivamente; modificaciones de amino, tiol, alquino o biotililo para uniones covalentes y casi covalentes; fluoróforos y bloqueadores; fosforotioato, metilfosfonatos, fosforoamidatos y enlaces fosforoéster entre nucleótidos para evitar la degradación; metilación; y bases modificadas tales como desoxilinosina, 5-bromo dU, desoxiuridina, 2-aminopurina, didesoxicitina, 5-metil dC, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), bases Iso-dC y -dG, bases de 2'-O-metil-RNA y bases de flúor modificadas.

45 El término "poli-lisina" se refiere a una molécula que contiene hasta varios cientos de unidades repetitivas y es adecuada para aumentar la afinidad entre una muestra, tal como una sección de tejido, y la corredera de membrana sobre la que está montada la muestra. Una poli-lisina según la descripción es poli-L-lisina. La poli-L-lisina según la descripción tiene un peso molecular de 70 a 300 kDa. La poli-L-lisina puede ser digerida por proteasas. Otra poli-lisina según la descripción es por ejemplo poli-D-lisina. La poli-D-lisina según la descripción tiene un peso molecular de 70 a 300 kDa. Poli-D-lisina es resistente a la digestión de proteasa.

50 El término "qPCR" se refiere generalmente a la técnica de PCR conocida como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o reacción en cadena de la polimerasa cinética. Esta técnica amplifica y cuantifica simultáneamente ácidos nucleicos diana usando PCR en la que la cuantificación es en virtud de un colorante fluorescente intercalante o sondas específicas de secuencia que contienen moléculas marcadoras fluorescentes que sólo son detectables una vez hibridadas con un ácido nucleico diana.

60 El término "RNA" se usa aquí como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a pre-RNAm, transcritos de pre-RNAm, RNAm, intermedios de procesamiento del transcrito, RNAm maduro utilizado para la traducción y transcripciones de un gen o genes, o ácidos nucleicos derivados de los mismos. El proceso de transcripción incluye procesos tales como corte y empalme, edición, modificación y degradación. El RNAm incluyendo las muestras incluyen, pero no se limitan a mRNA, transcritos de RNAm del gen o genes, cDNA que se origina a partir de RNAm usando transcripción inversa, RNA transcrito a partir de DNA amplificado, RNAc transcritos a partir de cDNA, DNA amplificado a partir de los genes y similares.

65

El término "soporte sólido" se usa aquí como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a cualquier material sólido, que tiene un área de superficie a la que pueden montarse o fijarse secciones de tejido. El soporte puede ser una combinación de materiales tales como plástico sobre vidrio, carbono sobre vidrio y similares. En una realización específica, el soporte sólido puede ser un "portaobjetos de membrana" como se ha definido anteriormente.

La presente descripción se refiere a un método para tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina, que comprende las etapas de a) proporcionar un soporte sólido, b) montar la sección de tejido embebida en parafina y fijada en formalina sobre el soporte sólido, c) retirar la parafina de la sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina, d) calentar a 50 a 70 °C durante 12 a 24 h la sección de tejido montada sobre el soporte sólido para recuperar los epítomos, y e) teñir la sección de tejido montada sobre el soporte sólido, en donde al menos la etapa e) se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. Como se conoce por el experto en la técnica, el término "cloruro sódico" y la fórmula empírica "NaCl" se pueden usar indistintamente dentro de la presente descripción. En una realización, el cloruro de sodio está presente en una concentración de 1,5 a 2,5 M. En una realización más específica, el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 1,8 a 2,2 M. En una realización aún más específica, el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 2 M.

Se encontró que, como puede tomarse también a partir de los Ejemplos, usando concentraciones altas de sal de 0,5 a 3,0 M de cloruro sódico en al menos la etapa de tinción de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido, previenen de la degradación al RNA aislado posteriormente del FFPET. Por lo tanto, el método según la descripción que usa altas concentraciones de sal de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M es adecuado para procedimientos de tinción, donde se aísla RNA después de la tinción y donde se requiere RNA de alta calidad, tal como para experimentos de RT-qPCR.

En una realización, el método comprende además las etapas de f) diseccionar un área de interés a partir de la sección de tejido teñido montada sobre el soporte sólido, g) aislar RNA del área de interés, h) analizar el RNA aislado. En una realización, el análisis del RNA aislado comprende cualquier método conocido en la técnica, tal como análisis de RNA, secuenciación de RNA y análisis de expresión génica. Por lo tanto, el método de acuerdo con la descripción puede usarse para aislar RNA con mayor calidad de la sección FFPET de tal manera que los resultados de básicamente cualquier método subsiguiente puede mejorarse significativamente mediante la aplicación de la estabilización de RNA en secciones FFPET como se describe en el presente documento.

En otra realización, el método comprende además las etapas de f) diseccionar un área de interés a partir de la sección de tejido teñida montada sobre el soporte sólido, g) aislar el RNA del área de interés, h) transcribir de forma inversa el RNA aislado en cDNA, i) amplificar y cuantificar el cDNA. En una realización, las etapas h) e i) se realizan como PCR de una sola etapa. En otra realización, las etapas h) e i) se realizan como PCR de dos pasos. En una realización específica, la etapa de amplificación y cuantificación del cDNA se realiza mediante PCR en tiempo real.

En una realización, el soporte sólido está recubierto con poli-L-lisina. En otra realización, el soporte sólido está recubierto con poli-D-lisina. En una realización específica, el soporte sólido se recubre con poli-L-lisina o poli-D-lisina aplicando una solución de poli-L-lisina o poli-D-lisina al soporte sólido. En una realización, el soporte sólido se incuba 15 a 45 minutos después de la aplicación de la solución de poli-L-lisina o poli-D-lisina. En una realización específica, el soporte sólido se incuba 30 min después de la aplicación de la solución de poli-L-lisina o poli-D-lisina. En una realización específica, la solución tiene una concentración de 0,05 a 2% de poli-L-lisina o poli-D-lisina. En una realización más específica, la solución tiene una concentración de 0,1% de poli-L-lisina o poli-D-lisina. En otra realización específica, la poli-L-lisina o poli-D-lisina tiene un peso molecular de 70 a 300 kDa. En otra realización específica, el soporte sólido es un portaobjetos de membrana.

En una realización, el soporte sólido se trata con 3-aminopropiltriethoxisilano (APES). Tal silanización puede realizarse para funcionalizar la superficie del soporte sólido con moléculas de alcóxido de silano dando como resultado una unión aumentada de las secciones de tejido sobre el soporte sólido.

En una realización, la sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina, montada sobre el soporte sólido tiene un espesor de 2 a 10 μm . En una realización específica, la sección de tejido embebida en formalina fijada en parafina montada sobre el soporte sólido tiene un espesor de 4 a 6 μm . En una realización más específica, la sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina montada sobre el soporte sólido tiene un espesor de aproximadamente 5 μm .

En una realización, la eliminación de la parafina se realiza incubando la sección de tejido montada sobre el soporte sólido en xilol. Posteriormente, la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se rehidrata en una serie de concentración decreciente de etanol, por ejemplo, varios segundos en cada uno de etanol al 100%, 96% y 70%, seguido por 2x1 min. en agua.

Con el fin de prevenir al máximo la degradación de RNA, se estableció un protocolo de recuperación de epítomo inducido por calor (LT-HIER) inducido por calor a baja temperatura. Se encontró que la recuperación del epítomo

proporciona los mejores resultados, cuando la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se calentó a 60 °C durante 16 h a pH 8. En una realización, el cloruro sódico puede estar presente en una concentración de 2 M en la solución para la recuperación del epítipo.

5 Así, en una realización, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. En una realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 1,5 a 2,5 M. En otra realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 1,8 a 2,2 M. En una realización aún más específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza en presencia de cloruro sódico aproximadamente 2,0 M.

15 En una realización, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza entre 50 y 70 °C. En una realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza entre 55 y 65 °C. En otra realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a 58 hasta 62 °C. En una realización aún más específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a aproximadamente 60 °C.

20 En una realización, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza durante 12 a 24 h. En una realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza durante 14 a 18 h. En una realización más específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza durante 15 a 17 h. En una realización aún más específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza durante aproximadamente 16 h.

25 En una realización, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a un pH de 5 a 9. En una realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a un pH de 7,5 a 8,5. En una realización más específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre soporte sólido se realiza a pH 7,8 a 8,2. En una realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a un valor de pH de aproximadamente 8.

30 En una realización específica, el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 16 horas a un valor de pH de aproximadamente 8. En una realización, el cloruro de sodio puede estar presente en una concentración de 2 M en la solución para la recuperación del epítipo.

35 Después de la etapa de calentamiento, la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se enfría en tampón con una concentración de 0,5 a 3,0 M de cloruro sódico. En una realización específica, el tampón es TBS-T. En otra realización específica, el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 2 M.

40 En una realización, la tinción de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido comprende una tinción basada en anticuerpos. En una realización específica, la tinción basada en anticuerpos comprende el uso de un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario. En una realización más específica, el anticuerpo primario es un anticuerpo que se une a CD31. En una realización aún más específica, el anticuerpo primario es el anticuerpo monoclonal CD31 (mAb) clon JC70. En una realización específica, el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-ratón. En una realización más específica, el anticuerpo secundario está unido covalentemente a una enzima capaz de transformar un sustrato en uno o más productos. En una realización aún más específica, el anticuerpo secundario está unido covalentemente a peroxidasa de rábano picante (HRP).

50 Se encontró que la tinción basada en anticuerpos proporcionaba los mejores resultados cuando la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se incubó con el anticuerpo primario a 37 °C durante 1 h, donde el cloruro de sodio estaba presente en una concentración de 2 M. En una realización, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza entre 34 y 40 °C. En una realización, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza durante 0,5 a 1,5 horas. En una realización, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. En una realización específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza a aproximadamente 37 °C. En otra realización específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza durante aproximadamente 1 h. En aún otra realización específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza en presencia de cloruro de sodio aproximadamente 2,0 M. En una realización más específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo primario se realiza a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 1 h, donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 2 M.

65 La incubación con el anticuerpo secundario se realizó a temperatura ambiente durante 2 h en una cámara de humedad, donde el cloruro de sodio estaba presente en una concentración de 2 M. En una realización, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario se realiza entre 16 y 24 °C. En una realización, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario

se realiza durante 1,5 a 2,5 h. En una realización, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario se realiza en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. En una realización específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario se realiza a aproximadamente 20 °C. En otra realización específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario se realiza durante aproximadamente 2 h. En aún otra realización específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario se realiza en presencia de cloruro sódico aproximadamente 2,0 M. En una realización más específica, la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido con el anticuerpo secundario se realiza a aproximadamente 20 °C durante aproximadamente 2 h, donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 2 M.

En una realización, la tinción de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido comprende además una reacción enzima-sustrato catalizada por una enzima unida covalentemente al anticuerpo secundario. Por lo tanto, en una realización específica, la tinción comprende el uso de un anticuerpo marcado. La enzima puede seleccionarse del grupo que consiste en peroxidases y fosfatasas alcalinas. Las peroxidases, tales como HRP, son capaces de transformar sustratos seleccionados del grupo que consiste en 3,3'-diaminobenzidina (DAB), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), 4-cloro-1-naftol (CN) y p-fenilendiamina. Las fosfatasas alcalinas son capaces de transformar sustratos seleccionados del grupo que consiste en naftol as-mx-fosfato, cloruro de triamino-trilolil-metano hexazotizado, naftol AS-BI-fosfato, naftol AS-TR-fosfato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxilfosfato (BCIP), nitroazul-tetrazolio (NBT), violeta de yodonitrotetrazolio (INT), Fast Red TR, Fast Red LB, Fast Blue BB y Fast Garnet GBC.

En una realización específica, la enzima capaz de transformar el sustrato es HRP. En una realización específica, el sustrato transformado por HRP es DAB. En una realización, la tinción con DAB se realiza en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. En una realización específica, el cloruro sódico está presente en una concentración de aproximadamente 2 M. En una realización, la tinción con DAB se realizó durante 5-20 minutos a temperatura ambiente. En una realización específica, la tinción con DAB se realizó durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

En una realización, el soporte sólido es un portaobjetos de membrana. En una realización específica, el soporte sólido es un portaobjetos de membrana adecuada para LCM. En una realización específica, el portaobjetos de membrana es una lámina de membrana de naftalato de polietileno. Se ha demostrado que los portaobjetos de membrana comercialmente disponibles, tales como portaobjetos de membrana de naftalato de polietileno, no son adecuados para el método de acuerdo con la presente descripción. Los portaobjetos de membrana comercialmente disponibles no proporcionan suficiente adherencia a las secciones de FFPET durante la etapa de calentar las secciones de tejido montadas en los portaobjetos de membrana recubiertos para recuperar los epítomos. Con el fin de mejorar la adhesión entre los portaobjetos de membrana y las secciones FFPET durante la etapa de calentamiento, los portaobjetos de membrana se recubrieron con poli-L-lisina que aumentó la adhesión entre los portaobjetos de membrana y las secciones FFPET de forma que las secciones FFPET estaban unidas de forma estable a los portaobjetos de membrana.

En una realización, la etapa de diseccionar área de interés desde la sección de tejido teñida montada sobre el soporte sólido comprende microdisseccionar o macrodisseccionar un área de interés. En una realización específica, la etapa de microdissección comprende el proceso de cortar y separar una o más células específicas o un área de interés de una muestra de tejido. Por ejemplo, la microdissección puede realizarse usando microdissección por captura láser (LCM) cortando el área relevante con un láser. En una realización específica, la etapa de macrodissección comprende el proceso de raspar un área de interés desde una sección de tejido montada sobre un soporte sólido, tal como un portaobjetos de microscopio, utilizando una herramienta tal como un bisturí o una espátula.

En el método según la descripción, se utilizó LCM en la sección FFPET teñida unida al portaobjetos de membrana para cortar un área de interés de la sección de tejido. El área de interés se utilizó posteriormente para el aislamiento de RNA. En una realización, el área de interés tiene un tamaño de 0,5 - 5 mm². En una realización específica, el área de interés tiene un tamaño de 1-2 mm². Se aisló RNA del área de interés usando métodos bien conocidos en la técnica, tal como utilizando el equipo de aislamiento de RNA FFPET de High Pure (Roche Diagnostics GmbH). El RNA aislado fue posteriormente transcrito inversamente con el fin de obtener cDNA. Debido a la cantidad limitada de cDNA y para proporcionar suficiente ácido nucleico para un experimento qPCR, puede realizarse una etapa de preamplificación en el cDNA antes de la amplificación por qPCR. Por lo tanto, en una realización, el método de acuerdo con la descripción comprende además las etapas de f) microdissección de un área de interés de la sección de tejido teñido montada sobre el portaobjetos de membrana recubierta, g) aislamiento del RNA del área de interés, h) transcripción inversa del RNA aislado en cDNA, i) preamplificar el cDNA, y j) amplificar y cuantificar el cDNA preamplificado. En una realización específica, la etapa de amplificación y cuantificación del cDNA preamplificado se realiza mediante PCR en tiempo real.

En una realización específica, la presente descripción se refiere a un método para tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido embebida en parafina, fijada en formalina, que comprende las etapas de a) proporcionar un portaobjetos de membrana cubierto con poli-L-lisina, b) montar la sección de tejido embebida en parafina fijada en formalina sobre un portaobjetos de membrana, c) retirar la parafina de la sección de tejido embebida en parafina

fijada con formalina mediante la incubación de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido en xilol, d) calentar la sección de tejido montada en el portaobjetos de membrana para recuperar epítomos a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 16 h, y e) tinción de la sección de tejido montada sobre el portaobjetos de membrana mediante el uso de un anticuerpo marcado, f) microdisecionar un área de interés de la sección de tejido teñida montada en el portaobjetos de membrana que tiene un tamaño de 1-2 mm², g) aislar el RNA del área de interés, h) transcribir de forma inversa el RNA aislado en cDNA, i) amplificar y cuantificar el cDNA, en donde al menos la etapa e) se realiza en presencia de cloruro de sodio aproximadamente 2 M y en el que la etapa de amplificación y cuantificación del cDNA se realiza mediante PCR en tiempo real.

La presente descripción se refiere además a un equipo para llevar a cabo el método como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la presente descripción se refiere además a un equipo para realizar un método para tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina que comprende las etapas de a) proporcionar un soporte sólido, b) montar la parafina fijada en formalina, c) retirar la parafina de la sección de tejido fijada con formalina, embebida en parafina, d) calentar entre 50 y 70 °C durante 12 a 24 h. la sección de tejido montada sobre el soporte sólido para recuperar los epítomos, y e) teñir la sección de tejido montada sobre el soporte sólido, en donde al menos la etapa e) se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M. En una realización, el cloruro de sodio está presente en una concentración de 1,5 a 2,5 M. En una realización más específica, el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 1,8 a 2,2 M. En una realización aún más específica, el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 2 M.

En una realización, el método realizado con el equipo comprende además las etapas de f) diseccionar un área de interés a partir de la sección de tejido teñido montado sobre el soporte sólido, g) aislar el RNA del área de interés, h) transcribir de manera inversa el RNA aislado en cDNA, i) amplificar y cuantificar el cDNA. En una realización, las etapas h) e i) se realizan como PCR de una sola etapa. En otra realización, las etapas h) e i) se realizan como PCR de dos etapas. En una realización específica, la etapa de amplificación y cuantificación del cDNA se realiza mediante PCR en tiempo real.

En una realización, el equipo para realizar el método de acuerdo con la descripción comprende a) un soporte sólido, b) una solución para la recuperación de epítomo, y c) una solución para tinción inmunohistoquímica que comprende cloruro de sodio en una concentración de 0,5 A 3,0 M. En otra realización, el equipo para realizar el método de acuerdo con la descripción comprende a) un portaobjetos de membrana revestido con poli-lisina, b) una solución para la recuperación de epítomo, y c) una solución para tinción inmunohistoquímica que comprende cloruro de sodio en una concentración de 0,5 a 3,0 M. En una realización específica, el equipo comprende además todos los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa a partir de RNA en cDNA, y la amplificación y cuantificación del cDNA. En otra realización específica, el equipo comprende todos los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa a partir de RNA en cDNA, preamplificar el cDNA, y amplificar y cuantificar el cDNA preamplificado.

Los siguientes ejemplos 1-3 se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo 1

Revestimiento de los portaobjetos de membrana con poli-L-lisina

Los portaobjetos de membrana PEN (MicroDissect GmbH) se cubrieron con aproximadamente 1 ml de solución de poli-L-lisina (0,1% p/v, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) y se incubaron durante 30 min. en una cámara de humedad a temperatura ambiente. La solución de poli-L-lisina se eliminó mediante una potente agitación. Posteriormente, las láminas de membrana PEN se secaron durante la noche bajo luz ultravioleta.

Resultados Observados (no mostrados):

El revestimiento de los portaobjetos de membrana PEN con poli-L-lisina conduce a un aumento de la unión de la sección de tejido al portaobjetos de membrana cuando se aplica a la recuperación de epítomo inducida por calor a baja temperatura (LT-HIER, 60 °C, 16 h, pH 8). Portaobjetos de membrana revestidos con poli-L-lisina: 0 de 3 secciones de tejido separadas del portaobjetos. Portaobjetos de membrana sin poli-L-lisina: 3 de 3 secciones de tejido separadas del portaobjetos.

Ejemplo 2

Tinción con CD31 sin/con cloruro sódico 2 M

Se usaron secciones FFPET de muestras tumorales para tinción basada en anticuerpos y posterior aislamiento de RNA. La siguiente descripción se refiere solamente al procedimiento realizado para teñir las secciones de FFPET en presencia de cloruro de sodio 2 M. Para experimentos sin cloruro de sodio, se realizó exactamente el mismo

procedimiento con las siguientes diferencias: 1) se omitió cloruro sódico en el procedimiento de tinción, 2) se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 30 min. (en lugar de 2 h. con 2 M de sodio cloruro). La alta concentración de sal requirió un mayor tiempo de incubación debido a la reducción del rendimiento de unión del anticuerpo secundario.

5 Se fijaron secciones FFPET de 5 μm sobre portaobjetos de membrana PEN recubiertos con poli-L-lisina y se secaron durante la noche en un entorno libre de polvo. Posteriormente, las secciones FFPET se incubaron durante 5 min. en H_2O_2 al 3% (Appli-Chem GmbH). A continuación, las secciones de FFPET se lavaron durante 2 minutos en H_2O de calidad para PCR. La incubación de las secciones se realizó durante 16 h. a 60 °C en solución de recuperación de epítipo (Leica Microsystems GmbH). Posteriormente, se realizó la tinción con CD31 anti-ratón de EnVision™ (DAKO GmbH). Se disolvió cloruro sódico (calidad de biología molecular, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) en todos los reactivos de tinción (Protein Block sin suero (DAKO GmbH), anticuerpo primario y secundario, DAB-Chromogen (Thermo Fisher Scientific GmbH) y tampón de lavado de solución salina Tris y Tween 20 (TBS-T)). La concentración final de cloruro de sodio fue de aproximadamente 2 M. Las secciones se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 min. en TBS-T / cloruro de sodio. Las secciones se incubaron con 100 μl de bloque de proteína / cloruro de sodio durante 5 minutos en la cámara de humedad. Posteriormente, se eliminaron las secciones del líquido y se añadieron 100 μl de anticuerpo primario / cloruro de sodio, se cubrió con parafilm y se incubó 1 h a 37 °C. Las secciones se lavaron 2 x 2 min. con TBS-T / cloruro de sodio y después se añadieron 100 μl de anticuerpo secundario / cloruro de sodio y se incubaron 2 h. a temperatura ambiente en la cámara de humedad. Después de lavar 2 x 2 min. con TBS-T / cloruro de sodio, se añadieron 100 μl de DAB-cromógeno / cloruro de sodio y se incubaron 5 - 10 min. a temperatura ambiente en la cámara de humedad. Las secciones se lavaron durante 2 min. con TBS-T / cloruro de sodio. Posteriormente, las secciones se lavaron 2 minutos con H_2O (calidad para PCR). Las secciones teñidas se diseccionaron y se aisló el RNA total (Equipo High Pure Paraffin RNA, Roche Diagnostics GmbH). La concentración de RNA se determinó mediante análisis fotométrico espectral (NanoDrop ND 1000 espectrofotómetro). El RNA se transcribió en DNAC por los métodos bien conocidos en la técnica. El DNAC se preamplificó. Posteriormente, la amplificación se realizó mediante PCR en tiempo real (LightCycler® Platform).

Resultados Observados:

30 Las concentraciones de RNA de las secciones teñidas con CD31 sin cloruro de sodio son significativamente más bajas en comparación con las secciones no teñidas. Las concentraciones de RNA de las secciones de FFPET teñidas con CD31 con cloruro de sodio no difieren significativamente de las secciones no teñidas (véase la figura 1).

35 Los valores de Cp (gen de referencia HPRT) de las secciones teñidas con CD31 sin cloruro de sodio son significativamente más altos en comparación con las secciones no teñidas. Los valores de Cp de las secciones de FFPET teñidas con CD31 con cloruro de sodio no difieren significativamente de las secciones no teñidas (véase la figura 2).

40 Los valores de Cp (gen de referencia ALAS1) de las secciones teñidas con CD31 sin cloruro de sodio son significativamente más altos en comparación con las secciones no teñidas. Los valores de Cp de las secciones de FFPET teñidas con CD31 con cloruro sódico no difieren significativamente de las secciones no teñidas (véase la figura 3).

Ejemplo 3

Análisis de la expresión génica de dos marcadores de secciones FFPET teñidas con CD31

El ejemplo muestra la idoneidad del RNA aislado de secciones FFPET teñidas con CD-31 con el método de acuerdo con la descripción para experimentos de expresión génica. El método descrito en el Ejemplo 2 se aplicó a secciones de FFPET a partir de tres muestras tumorales independientes. Las muestras se montaron en portaobjetos de membrana. Las áreas de interés (tumor y vasos) se microdiseccionaron realizando microdisecciones sucesivas de captura láser. Los datos sobre la expresión de dos marcadores diferentes (Marcador 1 y Marcador 2) en disecciones tumorales y disecciones vasculares, respectivamente, se obtuvieron analizando el RNA aislado. Los experimentos se realizaron en duplicado. El RNA se transcribió en cDNA usando métodos bien conocidos en la técnica. El cDNA fue preamplificado para obtener suficiente material de partida y para aumentar la sensibilidad. El cDNA preamplificado se analizó finalmente en duplicados usando PCR en tiempo real. La expresión relativa del Marcador 1 y del Marcador 2 se obtuvo normalizando la expresión del Marcador 1 y Marcador 2 al gen de referencia HPRT, respectivamente.

60 Resultados Observados:

En consistencia con experimentos previos realizados sobre muestras tumorales no teñidas (datos no mostrados), la Fig. 4 muestra datos relativos al patrón de la expresión relativa del Marcador 1 y Marcador 2 obtenidos a partir de tres muestras de tumor teñidas con CD31 independientes. Fig. 4 A) muestra que el Marcador 1 se expresa a una mayor extensión en células tumorales en comparación con las células vasculares. Además, la Fig. 4 B) muestra que

5 el Marcador 2 se expresa a una mayor extensión en las células vasculares en comparación con las células tumorales. En este caso, la expresión en células tumorales es muy baja en comparación con las células vasculares de tal manera que no se puede detectar una expresión (no detectada = nd). Como el análisis de las muestras tumorales no corregidas (datos no mostrados) podría ser reproducido, se puede concluir que el método de tinción de acuerdo con la descripción no influye significativamente en la calidad del RNA de forma que los resultados se vean afectados. Por consiguiente, con el método según la descripción, la degradación del RNA puede minimizarse de tal manera que la calidad del RNA de las muestras FFPET sea suficiente para el análisis de la expresión génica o cualquier otro método para analizar el RNA.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido fijada en formalina, embebida en parafina, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar un soporte sólido,
 - b) montar la sección de tejido embebida en parafina y fijada en formalina sobre el soporte sólido,
 - c) retirar la parafina de la sección de tejido embebida en parafina y fijada con formalina,
 - 10 d) calentar entre 50 y 70 °C durante 12 a 24 h. la sección de tejido montada sobre el soporte sólido para recuperar los epítomos, y
 - e) teñir la sección de tejido montada sobre el soporte sólido,
- en el que al menos la etapa e) se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio de 0,5 a 3,0 M.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
- f) diseccionar un área de interés a partir de la sección de tejido teñida montada sobre el soporte sólido,
 - g) aislar el RNA del área de interés,
 - h) transcribir de forma inversa el RNA aislado en cDNA,
 - 20 i) amplificar y cuantificar el cDNA.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el soporte sólido está recubierto con poli-L-lisina.
- 25 4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cloruro de sodio está presente en una concentración de 1,5 a 2,5 M.
5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 2 M.
- 30 6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la eliminación de la parafina se realiza incubando la sección de tejido montada sobre el soporte sólido en xilol.
7. El método de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza entre 55 y 65 °C durante 14 a 18 h.
- 35 8. El método de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el calentamiento de la sección de tejido montada sobre el soporte sólido se realiza a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 16 h.
9. El método de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la tinción comprende el uso de un anticuerpo marcado.
- 40 10. El método de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el soporte sólido es un portaobjetos de membrana.
11. El método de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la etapa f) comprende microdisseccionar o macrodisseccionar un área de interés.
- 45 12. El método de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el área de interés tiene un tamaño de 1 - 2 mm².
13. El método de las reivindicaciones 2 a 12, en el que la etapa de amplificación y cuantificación del cDNA se realiza mediante PCR en tiempo real.
- 50 14. Un equipo para realizar el método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13, en el que el equipo comprende:
- a) un soporte sólido revestido con poli-lisina,
 - b) una solución para la recuperación del epítomo, y
 - 55 c) una solución para tinción inmunohistoquímica que comprende cloruro de sodio en una concentración de 0,5 a 3,0 M.
15. El equipo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el equipo comprende además todos los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa a partir de RNA en cDNA, amplificación y cuantificación del cDNA.
- 60

Fig.1

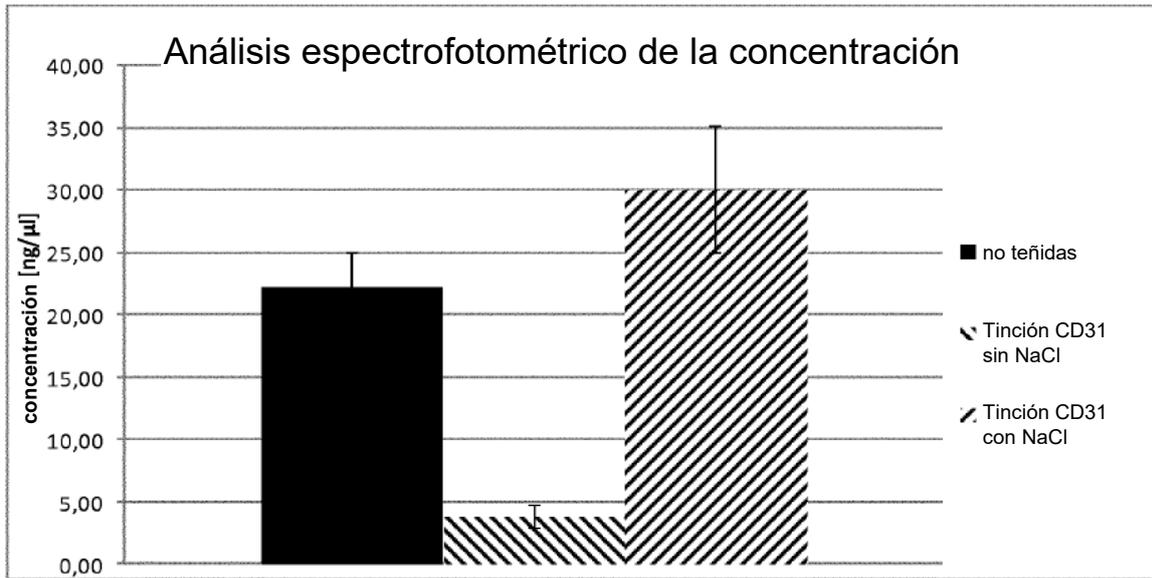


Fig.2

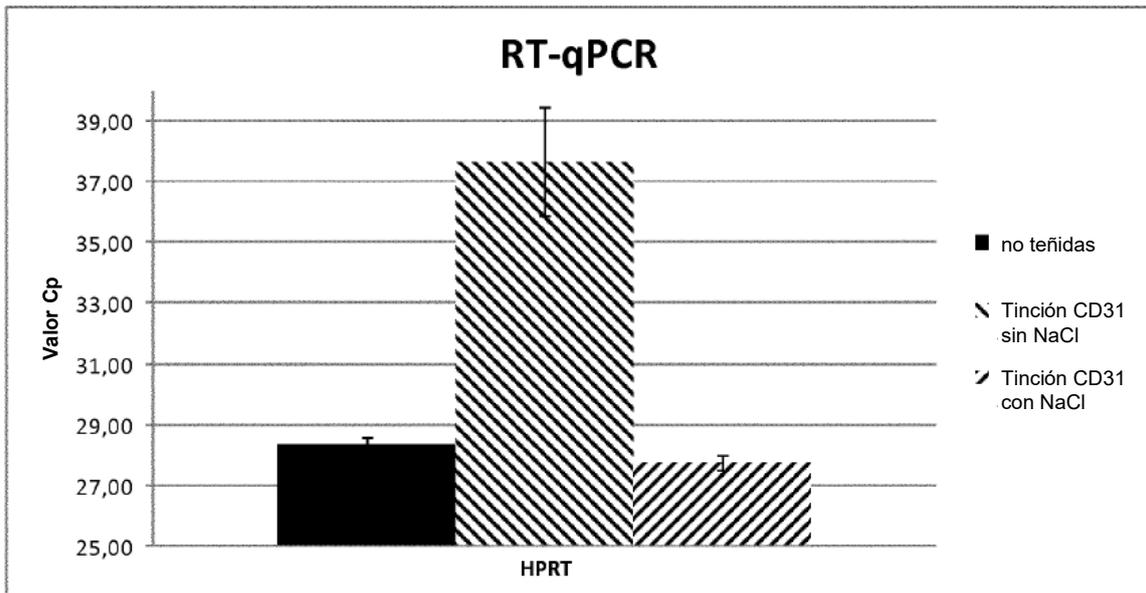
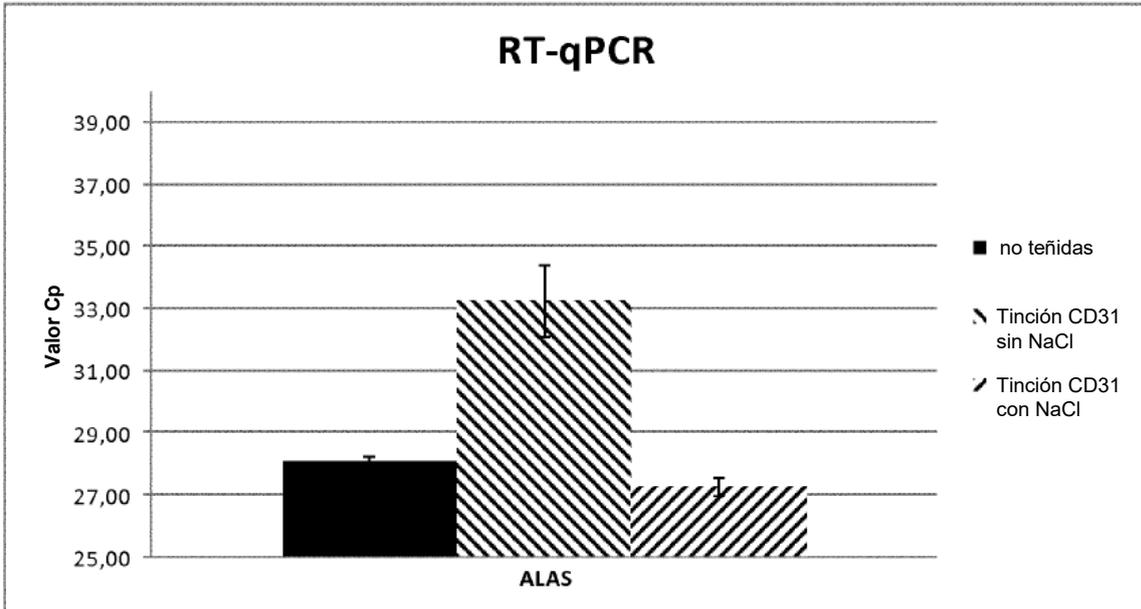
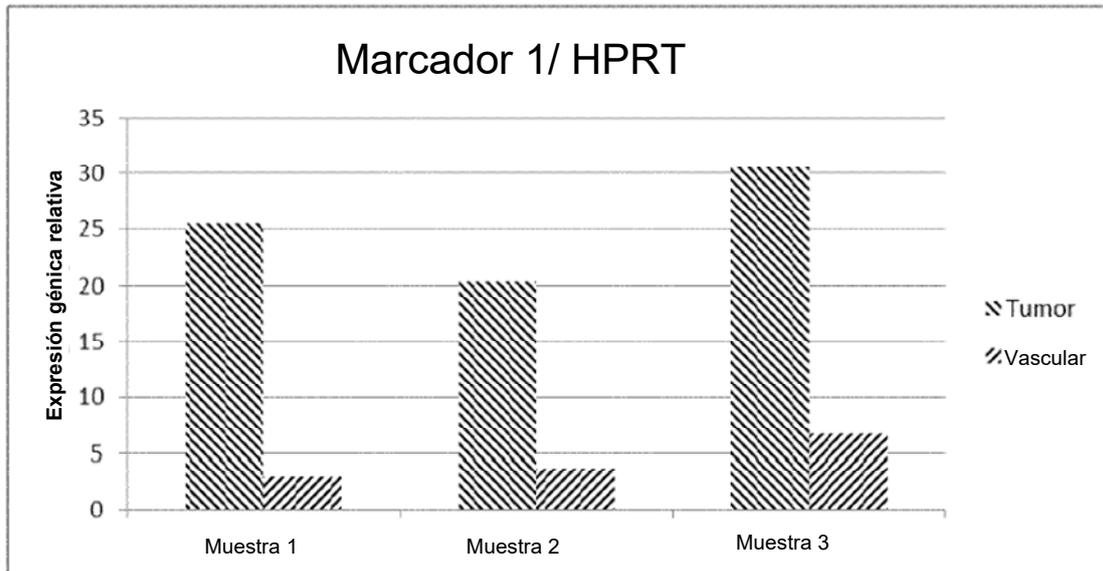


Fig.3



A)

Fig.4



B)

