

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 697**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2011 PCT/EP2011/073912**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2011 E 11804700 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2655617**

54 Título: **Método y kit para procesar muestras biológicas inmersas en cera**

30 Prioridad:

23.12.2010 EP 10016021

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

17.07.2017

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Str. 1
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

SCHLUMBERGER, MARTIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 697 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

Método y kit para procesar muestras biológicas inmersas en cera

La presente invención se refiere a un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera, al uso de poli(organosiloxanos) para licuar el medio de inmersión de una muestra biológica inmersa en cera y a un kit para procesar una muestra biológica inmersa en cera.

Tras retirar un material biológico de un organismo vivo, por ejemplo, un fragmento de un tejido o células aisladas, las células se destruyen al poco tiempo, a menos que se tomen medidas habituales, tales como, por ejemplo, la incubación en un medio nutriente. Además, las células destruidas sufren rápidamente una descomposición fermentativa autolítica inicial y después una descomposición bacteriana, de modo que las estructuras originales que forman las células dentro de los tejidos se destruyen. Por tanto, es necesario fijar la muestra biológica retirada para evitar su descomposición, si está previsto un examen histológico de la muestra. Con la fijación se pretende conservar sustancialmente las estructuras biológicas de una manera similar a la que aparece en los tejidos vivos para permitir una "evaluación real". Además, los especímenes fijados pueden conservarse y archivarse durante largo tiempo. Además, muchas investigaciones morfológicas solo son posibles con un material fijado.

La fijación normalmente se logra precipitando o reticulando compuestos, tales como ácidos, alcoholes, cetonas, o aldehídos. Para la fijación se emplea, en particular, formaldehído (habitualmente en forma de una disolución acuosa al 4-10% en peso, denominada "formol"), y después normalmente se realiza la etapa de sumergir el material fijado en una cera, habitualmente parafina, lo cual produce un material denominado "fijado en formol, sumergido en parafina" ("formalin-fixed, paraffin-embedded" (FFPE)). El principal objetivo del medio de inmersión es permitir que los especímenes se corten en secciones y se monten en estado natural para aplicaciones microscópicas y/o histoquímicas. Sin embargo, para muchas aplicaciones es necesario, o al menos resulta ventajoso, retirar el medio de inmersión antes de seguir procesando la muestra, por ejemplo, para la tinción histológica o el aislamiento de biomoléculas específicas, por ejemplo, ácidos nucleicos, tales como ADN y/o ARN, a partir de un lisado que se obtiene después de lisar la muestra desparafinada.

Tradicionalmente, la desparafinización implica el uso de disolventes aromáticos, tales como tolueno y, en particular, xileno. Generalmente, un corte fresco o un espécimen montado en un portaobjetos para microscopio se sumerge en un baño de xileno hasta que la parafina se solubiliza. En posteriores etapas, el espécimen desparafinado se lava por medio de una serie de disoluciones alcohólicas acuosas de concentración decreciente de alcohol para eliminar el xileno antes de un lavado final empleando agua, para que la muestra sea accesible al reactante acuoso o las disoluciones de reactante, tales como, por ejemplo, tampones de lisis o disoluciones de tinción. Sin embargo, el xileno es un disolvente orgánico inflamable, volátil y tóxico.

Por esta razón, en los últimos años se han realizado considerables esfuerzos por reemplazar el xileno por agentes desparafinantes menos tóxicos. Los ejemplos de sustitutos del xileno en aplicaciones histoquímicas incluyen aceites de terpeno, tales como d-limoneno, hidrocarburos isoparafínicos o disoluciones de lavavajillas acuosas (R. J. Buesa, M. V. Peshov, *Annals of Diagnostic Pathology*, 2009, 13, 246-256). Varios de estos agentes desparafinantes tienen la misma actuación que el xileno con respecto a la eliminación de la cera, y son menos tóxicos o incluso no son tóxicos. Sin embargo, en muchos casos aún son necesarios una serie de lavados con alcohol para eliminar el disolvente/agente desparafinante antes del lavado con agua para lograr la compatibilidad con la mayoría de los tipos de tinciones inmunohistoquímicas o tampones de lisis acuosos.

En algunos métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/153299 A1 o el protocolo del kit de aislamiento de ARN total PureLink™ FFPE Total RNA Isolation Kit, proporcionado por el fabricante Invitrogen, Carlsbad, Calif., EE.UU.), la muestra inmersa en cera simplemente se calienta en una disolución acuosa para fundir la cera y después se centrifuga para separar la fase acuosa de la fase cerosa. Después de volver a solidificar la fase cerosa, la cera se deposita como una capa por encima de la disolución acuosa y/o en las paredes del recipiente/tubo, desde donde puede recogerse y, así, separarse de la muestra biológica. Sin embargo, la cera resolidificada puede interferir con posteriores etapas de procesamiento de la muestra, por ejemplo, obturando las puntas de las pipetas, lo cual complica la manipulación automática de la muestra.

Con los avances en las técnicas biomoleculares, no solo la inspección en un microscopio óptico de las muestras inmersas en cera, sino también el análisis de biomoléculas, en particular ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, recuperadas de las muestras inmersas en cera, cada vez tiene más importancia. Los ácidos nucleicos recuperados de dichas muestras después pueden analizarse empleando técnicas muy sensibles, tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Sin embargo, si se contempla la extracción de los ácidos nucleicos de una muestra inmersa en cera en lugar de una tinción histoquímica, o además de esta, es muy importante que los agentes desparafinantes no interfieran con ninguna etapa posterior de concentración, purificación, aislamiento y/o análisis de los ácidos nucleicos, o que dichos agentes puedan ser eliminados completamente de la muestra después de la desparafinización. Para la recuperación de los ácidos nucleicos de muestras FFPE, dichas muestras habitualmente se desparafinizan empleando xileno y se lavan una serie de veces con disolución alcohólicas acuosas de concentración decreciente de alcohol, tal como se describió anteriormente, antes de ser lisadas con un tampón de digestión/lisis apropiado. En posteriores etapas, los ácidos nucleicos habitualmente se aíslan de estos tampones

empleando métodos de extracción orgánicos, tales como extracción con fenol/cloroformo, y opcionalmente después se concentran mediante precipitación empleando, por ejemplo, etanol o isopropanol.

Otra estrategia para desparafinar muestras biológicas emplea aceites minerales no polares casi inertes. Aunque el aceite mineral tiene un punto de ebullición muy por encima de 100°C y una baja volatilidad a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 80 a 100°C, posee un inconveniente grave con respecto al procesamiento rápido de la muestra, que es su viscosidad cinemática bastante alta. Aunque el valor exacto de la viscosidad cinemática depende del aceite mineral específico empleado, la viscosidad cinemática de los aceites minerales empleados para desparafinar habitualmente es bastante mayor que $10 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (R. J. Buesa, M. V. Peshov, *Annals of Diagnostic Pathology*, 2009, 13, 246-256), lo cual complica el pipeteado y las posteriores etapas necesarias para eliminar dicho disolvente de la muestra.

Así, en la solicitud EP10 165 799.7, en tramitación junto con la presente, el aceite mineral ha sido sustituido por alcanos lineales, por ejemplo, hexadecano. Esta estrategia incluso permite el posterior procesamiento de la muestra biológica en presencia del medio de inmersión licuado, por ejemplo, la lisis de las estructuras celulares empleando un tampón de lisis acuoso. Sin embargo, en los alcanos lineales existe una relación entre el punto de ebullición y la viscosidad cinemática del alcano. Cuanto mayor punto de ebullición tenga el alcano, mayor es su viscosidad cinemática. Por tanto, no es posible utilizar alcanos lineales puros para obtener un agente desparafinante que tenga una viscosidad cinemática comparable a la del agua ($1 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, igual a 1 cSt), pero que tenga un punto de ebullición muy por encima de 100°C.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método rápido y automático para procesar una muestra biológica inmersa en cera que evite el uso de agentes tóxicos desparafinantes, tales como, por ejemplo, xileno, y también el uso de etapas de lavado laboriosas y largas para retirar el agente desparafinante de la muestra. En particular, el método preferiblemente debe ser compatible con las máquinas automáticas de pipeteado convencionales para que pueda automatizarse y con etapas de calentamiento de hasta 95°C en presencia del agente desparafinante.

Este objeto se logra por medio del método de la presente invención. En la presente invención, se ha descubierto, de modo sorprendente, que los poli(organosiloxanos) son particularmente útiles para la desparafinación de muestras biológicas inmersas en cera.

En términos de la presente invención, el término “desparafinado” se refiere a cualquier secuencia de etapas que comprende al menos una etapa de licuar y/o solubilizar el medio de inmersión de una muestra biológica inmersa en cera, y al menos una etapa de separar el medio de inmersión licuado y/o solubilizado de al menos una parte de la muestra biológica. Las etapas de licuar y/o solubilizar el medio de inmersión y de separar el medio de inmersión licuado y/o solubilizado de al menos una parte de la muestra biológica pueden realizarse (casi) simultáneamente o una detrás de otra. Sin embargo, puede preferirse, en particular, que la muestra biológica se procese posteriormente en presencia del medio inmersión licuado y/o solubilizado, antes de que dicho medio por último se retire de al menos una parte de la muestra biológica.

En términos de la presente invención, la expresión “se retira de al menos una parte de la muestra biológica” significa que no es necesario retirar completamente el medio de inmersión de las partes de la muestra biológica que son de interés para un posterior análisis. Por ejemplo, si una sección de un tejido se procesa según el método de la presente invención para preparar dicha sección para la tinción histológica, el medio de inmersión licuado y/o solubilizado habitualmente se eliminará de (esencialmente) toda la muestra. Si, por otra parte, solo se tiene interés en biomoléculas específicas de la muestra para un posterior análisis, tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas, no es obligatorio separar el medio de inmersión licuado y/o solubilizado de a muestra biológica completa, sino solo de esas biomoléculas de interés.

Los poli(organosiloxanos) son eficaces para licuar y/o solubilizar el medio de inmersión de una muestra biológica inmersa en cera en un amplio intervalo de temperaturas sin comprometer la integridad del material biológico. Generalmente, la muestra biológica puede someterse a unas temperaturas de procesamiento que varían de aproximadamente 15°C a aproximadamente 95°C en presencia del agente desparafinante. Además, el uso de poli(organosiloxanos) también es compatible con una diversidad de protocolos diferentes conocidos en la técnica para el posterior procesamiento del material biológico desparafinado, por ejemplo, el kit QIAamp DNA FFPE, el kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite.

Así, la presente invención se refiere a una método para procesar una muestra biológica inmersa en cera, que comprende una etapa (1) de licuar el medio de inmersión exponiendo la muestra biológica inmersa a un agente desparafinante, en el que el agente desparafinante comprende un poli(organosiloxano) o una mezcla de poli(organosiloxanos).

En términos de la presente invención, la expresión “exponer la muestra biológica inmersa a un agente desparafinante” comprende cualquier etapa de poner en contacto la muestra biológica inmersa con el agente desparafinante, concretamente mediante la adición del agente desparafinante a la muestra biológica inmersa o viceversa. Por ejemplo, la muestra biológica inmersa puede sumergirse en la disolución desparafinante. Como

alternativa, puede añadirse a dicha muestra una cantidad suficiente de la disolución desparafinante para revestir completamente la muestra inmersa, por ejemplo, mediante pipeteado. Debe entenderse que durante la inmersión en cera, la muestra biológica debe estar preferiblemente en estado sólido hasta que se ponga en contacto con el agente desparafinante. Para acelerar el proceso de licuación y/o solubilización del medio desparafinante, puede potenciarse el mezclado del agente desparafinante y la muestra biológica inmersa mediante remoción, agitación en vórtice, agitación, pipeteado, empleando ultrasonido y similares. Como alternativa, o además, puede aplicarse calor. En particular, si no se requiere un análisis histológico de una sección de tejido, sino un análisis de biomoléculas específicas presentes en un lisado obtenido por la lisis de la muestra biológica desparafinada, la muestra biológica inmersa también puede romperse de modo mecánico antes o durante su exposición al agente desparafinante, por ejemplo, mediante homogenización, agitación en vórtice o similares. Para los materiales más espesos, pueden ser útiles, por ejemplo, punzones de núcleo de aguja, ruptura mecánica mediante molinos de bolas o dispositivos Polytron.

Una ventaja concreta del uso de poli(organosiloxanos) para la desparafinización es el hecho de que, después de licuar el medio de inmersión, puede añadirse una disolución acuosa a la muestra que todavía comprende el medio de inmersión licuado. Puesto que la disolución acuosa no es miscible con la fase de poli(organosiloxano), que comprende el medio de inmersión licuado, se obtienen dos fases líquidas inmiscibles. Estas fases pueden separarse con facilidad empleando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, decantación, pipeteado y similares, sin limitarse a estas. Si, por ejemplo, se añade un tampón de lisis acuoso a la muestra que aún comprende el medio de inmersión licuado disuelto en dicho poli(organosiloxano), incluso puede llevarse a cabo la lisis de la muestra biológica en la muestra bifásica resultante sin comprometer el resultado de la lisis. Puesto que la mayor parte de la muestra biológica (o sus componentes, respectivamente, tales como, por ejemplo, los ácidos nucleicos liberados durante la lisis) pasa a la fase acuosa, el material biológico deseado puede separarse con facilidad del medio de inmersión licuado empleando técnicas convencionales para la separación de fases líquidas.

Empleando el método de la presente invención no son necesarios disolventes orgánicos tóxicos y/o inflamables, tales como, por ejemplo, xileno, ni unas etapas de lavado laboriosas para licuar y eliminar el medio de inmersión de una muestra biológica inmersa en cera.

Puesto que los poli(organosiloxanos) son bastante inertes desde el punto de vista químico, incluso a temperaturas elevadas, por ejemplo, 100°C y mayores, la muestra biológica incluso puede someterse a etapas de calentamiento en presencia del medio de inmersión líquido, por ejemplo, para eliminar las reticulaciones de muestra fijadas con formol, que puede realizarse calentando la muestra a hasta aproximadamente 70 a aproximadamente 95°C. En este escenario, el poli(organosiloxano) también sirve para limitar la evaporación del tampón de muestra.

En términos de la presente invención, el término “aproximadamente” se emplea para indicar un margen de error del valor respectivo de hasta 5%.

En la presente invención, se prefiere en particular emplear poli(organosiloxanos) que tengan una viscosidad cinemática bastante baja a temperatura ambiente (23 +/-2°C), pero que mantengan un punto de ebullición bastante alto en comparación con disolventes orgánicos no polares de viscosidad comparable. Estos agentes desparafinantes que tienen una baja viscosidad (por ejemplo, <5 mm²·s⁻¹), pero un punto de ebullición bastante alto (por ejemplo, >90°C, preferiblemente >120°C), son muy adecuados para la automatización del procesamiento de muestras, por ejemplo, empleando robots de pipeteado. También pueden emplearse mezclas de diferentes poli(organosiloxanos). En este caso, la mezcla preferiblemente puede tener una viscosidad cinemática de 5 mm²·s⁻¹ o menor, mientras que los componentes individuales presentes en la mezcla pueden tener una viscosidad cinemática mayor que 5 mm²·s⁻¹. La viscosidad cinemática es la medida del flujo de volumen en un líquido, que se indica en Stokes (St), siendo un Stoke equivalente a 1 cm²·s⁻¹, y un centistoke (1 cSt = 0,01 St) equivalente a 1 mm²·s⁻¹. La viscosidad cinemática (en Stokes) puede convertirse en viscosidad, puesto que es una medida de flujo de masa del líquido (en Poises; 1 Poise equivale a 0,1 Pas en unidades del SI), multiplicando por la densidad del fluido.

Por ejemplo, el octametiltrisiloxano, por ejemplo, tiene una viscosidad cinemática de aproximadamente 1 mm²·s⁻¹ (1 cSt), igual al agua, mientras que tiene un punto de ebullición de 153°C. Debido a su baja viscosidad, su densidad de 0,82 g/ml at 25°C, y su punto de ebullición bastante alto, puede añadirse y retirarse de una muestra incluso con sistemas automáticos que comprenden una unidad de dosificación, por ejemplo, una máquina automática de pipeteado.

Por consiguiente, el método de la presente invención puede representar preferiblemente un método automático.

En términos de la presente invención, un “método automático” es un método en el que al menos una de las etapas comprendidas en dicho método se realiza de modo automático, es decir, fundamentalmente dirigida por una máquina o por ordenador sin acción humana directa (aparte de los ajustes iniciales necesarios). El método de la presente invención puede ser realizado con facilidad en una serie de estaciones de trabajo para el procesamiento automático de muestras, que incluyen, por ejemplo, el QIAsymphony SP. La baja viscosidad del agente desparafinante no solo facilita su administración y su eliminación y, por tanto, la automatización del método, sino que también asegura que se distribuya con rapidez sobre la muestra, así como su penetración en una muestra de tejido.

- En términos de la presente invención, el término “poli(organosiloxano)” se refiere a un compuesto o a una mezcla de compuestos que contienen átomos de silicio y oxígeno directamente alternantes en una disposición lineal, ramificada o cíclica con uno o más grupos orgánicos unidos a cada átomo de silicio. Los poli(organosiloxanos) de la presente invención preferiblemente son compuestos lipófilos no miscibles con agua. Los ejemplos de poli(organosiloxanos) incluyen polidimetilsiloxanos, polidietilsiloxanos, metil hidrógeno polisiloxanos, metil alquil polisiloxanos, metil aril polisiloxanos, metil fluoroalquil polisiloxanos, fluidos de fluorosilicona, como por ejemplo trifluoropropil heptametil trisiloxano, y metilpolisiloxanos organofuncionales, tales como aminoalquil metil polisiloxanos, cianoalquil metil polisiloxanos, haloalquil metil polisiloxanos, y vinil metil polisiloxanos, sin limitarse a estos. Los siloxanos preferidos son insolubles en agua. Los siloxanos aún más preferidos son líquidos a temperatura ambiente (23 +/-2°C.).
- En términos de la presente invención, “alquilo” significa cualquier hidrocarburo lineal, ramificado o, cuando sea apropiado, cíclico que tiene, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de C, y “arilo” significa un anillo (o un sistema de anillos) hidrocarbonado insaturado que tiene 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más, preferiblemente 5, 6, 9, 10, 13 o 14 miembros, en el que al menos un C puede estar sustituido por un heteroátomo, tal como N o S.
- Los ejemplos de polisiloxanos cíclicos pueden incluir octametilciclotetrasiloxano (D 4), decametilciclopentasiloxano (D 5), y dodecametilciclohexasiloxano (D 6). Sin embargo, pueden preferirse los poli(organosiloxanos) lineales. Los ejemplos preferidos de poli(organosiloxanos) lineales no ramificados incluyen polidimetilsiloxanos terminados en trimetilsiloxi, en particular hexametildisiloxano (L 2), octametiltrisiloxano (L 3), decametiltetrasiloxano (L 4), y dodecametilpentasiloxano (L 5).
- Se prefieren en particular fluidos de trisiloxano de baja viscosidad, por ejemplo, 3-octilheptametiltrisiloxano (que tiene una viscosidad cinemática de $3 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), 3-fenilheptametiltrisiloxano (que tiene una viscosidad cinemática de $2 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), trifluoropropilheptametiltrisiloxano (que tiene una viscosidad cinemática de $2 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), clorometilheptametiltrisiloxano (que tiene una viscosidad cinemática de $1 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), u octametiltrisiloxano (L 3) (que tiene una viscosidad cinemática de $1 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), siendo particularmente preferido el octametiltrisiloxano (L 3).
- Otros ejemplos pueden incluir aceite de polidimetilsiloxano, aceite de metil hidrógeno polisiloxano, aceite de metil fenil silicona, aceite de silicona modificado con flúor, aceite de silicona modificado con amino, aceite de silicona modificado con epoxi, aceite de silicona modificado con hidroxilo, y aceite de silicona modificado con grupos orgánicos, tales como aceites de silicona modificados con alquilo. Estos aceites habitualmente son una mezcla de los poli(organosiloxanos) mencionados anteriormente con diferente longitud de cadena.
- El agente desparafinante utilizado en el método de la presente invención puede comprender o preferiblemente consiste en uno de los poli(organosiloxanos) mencionados anteriormente o una mezcla de dos o más de estos poli(organosiloxanos). En dichas mezclas, cada poli(organosiloxano) puede ser, independientemente, lineal, cíclico o ramificado. Están disponibles en el mercado poli(organosiloxanos) individuales, así como mezclas de dos o más poli(organosiloxanos) diferentes, por ejemplo, en Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., EE.UU. También pueden emplearse mezclas de uno o más poli(organosiloxanos) y uno o más compuestos que no contienen silicio lipófilos que incluyen, por ejemplo, disolventes orgánicos miscibles con los poli(organosiloxanos), tintes lipófilos. Preferiblemente, el agente desparafinante empleado en la presente invención no comprende ningún componente hidrófilo ni componentes que comprendan porciones hidrófilas, tales como, por ejemplo, tensioactivos. El agente desparafinante utilizado en la presente invención preferiblemente representa, más preferiblemente consiste en un compuesto lipófilo o una mezcla de compuestos lipófilos no solubles ni miscibles con agua. En particular, el agente desparafinante utilizado en la presente invención preferiblemente no representa una emulsión. Debe advertirse que, aunque el agente desparafinante empleado en el método de la presente invención debe ser líquido a temperatura ambiente, los componentes individuales presentes en la mezcla empleada como agente desparafinante pueden representar, no obstante, compuestos que son sólidos en forma pura a temperatura ambiente, por ejemplo, hexametilciclotrisiloxano (D 3), con la condición de que la mezcla, como un todo, sea líquida a temperatura ambiente.
- En términos de la presente invención, la expresión “muestra inmersa en cera” comprende cualquier muestra biológica inmersa en una cera, por ejemplo, para un análisis histoquímico y/o microscópico. La cera habitualmente comprende o consiste en una mezcla compleja de hidrocarburos superiores, es sólida a temperatura ambiente y puede incluir otros componentes, tales como ésteres de ácidos grasos superiores, glicoles y similares. La cera puede tener un origen natural y/o sintético y puede contener además aditivos que potencien sus propiedades de inmersión de muestras, tales como, por ejemplo, pequeñas cantidades de DMSO, poliolefinas superiores u otros polímeros orgánicos. Preferiblemente, la cera puede representar parafina. La parafina es una mezcla principalmente de hidrocarburos saturados que es sólida a temperatura ambiente. La parafina habitualmente se prepara por medio de la destilación del petróleo. Independientemente del tipo de parafina utilizada, tanto una parafina de alto punto de fusión como una parafina de bajo punto de fusión o una mezcla de ambas, la muestra puede procesarse empleando el método y/o el kit de la presente invención.
- La muestra biológica puede representar un organismo completo, o una parte de un organismo, en particular un fragmento de un tejido o una sección de un tejido, procedentes de seres humanos, animales o plantas o microorganismos, tales como, por ejemplo bacterias, virus u hongos. También pueden emplearse células inmersas aisladas, por ejemplo, a partir de cultivos celulares o torundas, sangre u otros fluidos corporales. La muestra biológica inmersa en cera que se va a procesar según la presente invención preferiblemente se selecciona del grupo

que comprende tejidos y/o células inmersas. Preferiblemente, dicha muestra representa una muestra inmersa en parafina, más preferiblemente una muestra inmersa en parafina y fijada con formol (muestra FFPE).

El agente desparafinante utilizado en el método de la presente invención preferiblemente tiene un punto de ebullición mayor que 75°C, más preferiblemente mayor que 90°C, aún más preferiblemente mayor que 120°C y lo más preferiblemente mayor que 140°C. A menos que se indique lo contrario, los valores para todas las variables físicas se determinan a una presión de 1013,25 milibares, y, cuando sea aplicable, a temperatura ambiente. El uso de un agente desparafinante basado en un poli(organosiloxano) químicamente inerte que tiene un punto de ebullición bastante alto minimiza el riesgo de que el medio de inmersión pueda volver a solidificarse tras una evaporación no intencionada del disolvente/agente desparafinante y, así, permite una manipulación cómoda de la muestra y también minimiza la exposición del usuario a los vapores del disolvente. Además, la muestra se puede calentar en el agente desparafinante, por ejemplo, para eliminar de modo térmico las reticulaciones presentes en la muestra que son el resultado de la fijación con formol. Además, se prefiere que el agente desparafinante tenga un punto de vertido (determinado según DIN/ISO 3016) menor que 0°C, preferiblemente menor que -20°C, más preferiblemente menor que -40°C, aún más preferiblemente menor que -60°C y lo más preferiblemente menor que -80°C. El punto de vertido de un líquido es la temperatura más baja a la cual se puede verter o puede fluir bajo condiciones prescritas.

El agente desparafinante preferiblemente tiene una viscosidad cinemática igual o menor que 5 mm²·s⁻¹, preferiblemente igual o menor que 3 mm²·s⁻¹, más preferiblemente igual o menor que 2 mm²·s⁻¹ y lo más preferiblemente igual o menor que 1,5 mm²·s⁻¹. Cuanto menor sea la viscosidad cinemática del agente desparafinante, con más facilidad puede añadirse y retirarse dicho agente de la muestra, por ejemplo, mediante pipeteado. Se prefieren en particular los agentes desparafinantes que tienen una viscosidad cinemática comparable a la del agua, es decir, de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 mm²·s⁻¹, preferiblemente de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1 mm²·s⁻¹ y lo más preferiblemente igual a aproximadamente 1 mm²·s⁻¹.

Los poli(organosiloxanos) comprendidos o que forman el agente desparafinante de la presente invención preferiblemente se seleccionan del grupo que comprende poli(organosiloxanos) lineales, preferiblemente polidialquilsiloxanos terminados en trialquilsiloxi, en los que "alquil" comprende preferiblemente cadenas hidrocarbonadas C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆ lineales o ramificadas, más preferiblemente del grupo que comprende polidimetilsiloxanos terminados en trimetilsiloxi lineales de fórmula CH₃[Si(CH₃)₂O]_nSi(CH₃)₃, en la que n es el número de unidades repetidas. Preferiblemente, n está en el intervalo de 1 a 5. Lo más preferiblemente, el poli(organosiloxano) representa octametiltrisiloxano (n = 2). Tal como se describió anteriormente, el agente desparafinante también puede consistir en una mezcla de diferentes poli(organosiloxanos). El agente desparafinante también puede comprender uno o más poli(organosiloxanos) en combinación con compuestos que no contienen silicio, tales como, por ejemplo, disolventes orgánicos lipófilos. Sin embargo, puede preferirse en particular que el agente desparafinante consista fundamentalmente en un único poli(organosiloxano), es decir, el agente desparafinante comprende al menos 95% (en p/p), preferiblemente al menos 97% (en p/p) de dicho poli(organosiloxano). Lo más preferiblemente, el agente desparafinante puede consistir fundamentalmente en octametiltrisiloxano.

La cantidad de agente desparafinante añadida a una muestra inmersa en cera depende del tipo y la cantidad de muestra inmersa en cera, lo cual es muy conocido por los expertos en la técnica. La cantidad de agente desparafinante debe ser suficientemente alta para cubrir al menos completamente la muestra que se va a desparafinar. Por supuesto, la cantidad necesaria también depende del recipiente o tubo en el que se procesa la muestra, pero puede ser determinada con facilidad. Por ejemplo, una sección de microtomo típica de un tejido FFPE que tiene un espesor de 5-20 µm, 1-2 cm de largo, puede desparafinarse empleando de 250 a 750 µl de agente desparafinante, preferiblemente de 300 a 500 µl, cuando se procesa en un tubo de muestras de laboratorio convencional de 1,5-2 ml o en placas de múltiples pocillos.

En el método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la presente invención, puede preferirse que la etapa de exponer la muestra biológica inmersa a un agente desparafinante incluya la incubación de la muestra biológica inmersa en presencia del agente desparafinante a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 95°C, preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 75°C y lo más preferiblemente de aproximadamente la temperatura ambiente (23 +/- 2°C) a aproximadamente 65°C. Durante la incubación, puede emplearse un mezclado mecánico mediante agitación, agitación en vórtice, pipeteado y similares. La incubación preferiblemente puede realizarse durante aproximadamente 5 segundos a 12 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 3 horas, aún más preferiblemente durante aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora, aún más preferiblemente durante aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 30 min, y lo más preferiblemente durante aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos.

El método de la presente invención preferiblemente incluye además una etapa (2) de exponer la muestra obtenida en la etapa (1), que aún comprende el medio de inmersión licuado, a una disolución acuosa, repartiendo o separando con ello el medio de inmersión licuado y la muestra desparafinada. La muestra biológica (o sus componentes, respectivamente) fundamentalmente pasa a la fase acuosa, mientras que el medio de inmersión licuado permanece fundamentalmente en la fase que comprende el agente desparafinante. La muestra biológica y el

5 medio de inmersión licuado están presentes en dos fases líquidas diferentes y, por tanto, se separan fundamentalmente, incluso aunque la fase acuosa y el agente desparafinante puedan mantenerse en contacto físico entre sí. Así, el agente desparafinante se separa de la muestra tras ponerse en contacto con la disolución acuosa y sube a la superficie de la disolución acuosa, si se emplea un agente desparafinante con una densidad menor que la del agua, es decir, menor que 1,00 g/ml a temperatura ambiente. Para potenciar la disolución de la parafina y su separación, puede emplearse un mezclado físico, por ejemplo, mediante agitación, agitación en vórtice, pipeteado y similares, sin limitarse a estos.

10 De modo sorprendente, no son necesarias unas etapas de lavado con alcohol para eliminar la cera licuada y/o el agente desparafinante de la muestra, que normalmente se emplean en muchos métodos conocidos en la técnica. Esto evidentemente acelera y simplifica cualquier método para procesar una muestra biológica inmersa en cera que comprenda una etapa de retirar el medio de inmersión. Además, se reduce la cantidad de desechos.

15 La disolución acuosa a la cual se expone la muestra preferiblemente puede representar un tampón de lisis acuoso, que preferiblemente puede comprender al menos una sustancia tamponante y un detergente. La sustancia tamponante preferiblemente mantiene el pH de la disolución acuosa en el intervalo entre 4 y 9. También puede emplearse una mezcla de diferentes sustancias tamponantes. El detergente puede ser no iónico, catiónico, aniónico o bipolar. También puede emplearse una mezcla de diferentes detergentes. Los agentes tamponantes y tensioactivos preferidos son, por ejemplo, TRIS, MOPS, MES, HEPES u Tween-20, SDS, Triton X-100 o similares, respectivamente, etc. Además, el tampón de lisis puede comprender al menos un reactivo nucleófilo.

20 A este respecto, un reactivo nucleófilo adecuado son todas las bases de Lewis capaces de transferir electrones a un orbital vacío o a orbitales vacíos de un ácido de Lewis. Entre las bases de Lewis particularmente preferidas se encuentran los reactivos que tienen al menos un grupo funcional que tiene una carga negativa, que está negativamente polarizado o que tiene al menos un par de electrones libres.

25 Los compuestos que comprenden un grupo funcional que tiene una carga negativa son, por ejemplo, óxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, hidróxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, haluros de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, cianuros de metales alcalinos o metales alcalinotérreos y similares.

Los reactivos que tienen al menos un grupo funcional que está negativamente polarizado son, en particular, reactivos que tienen al menos un grupo funcional en el que dos átomos que se diferencian en su negatividad de electrones de Alfred y Rochow en al menos 0,25, en particular preferiblemente en al menos 0,5 y aún más preferiblemente en al menos 1,0, están conectados covalentemente entre sí.

30 Sin embargo, los reactivos nucleófilos que son particularmente preferidos según la invención son los que tienen al menos un grupo funcional con uno o dos, en particular preferiblemente con un par de electrones libres, y los más preferidos entre estos compuestos, a su vez, son los que tienen al menos un grupo amino primario, secundario o terciario de estructura I:



35 en la que R1 es un grupo hidrocarbonado C_1 a C_{20} , en particular preferiblemente un grupo hidrocarbonado C_2 a C_{15} y aún más preferiblemente un grupo hidrocarbonado C_2 a C_{10} , un grupo hidrocarbonado C_1 a C_{20} que tiene al menos un heteroátomo, un grupo hidrocarbonado C_2 a C_{15} que tiene al menos un heteroátomo y más preferiblemente un grupo hidrocarbonado C_2 a C_{10} que tiene al menos un heteroátomo, o un sistema de anillos aromáticos opcionalmente sustituido con heteroátomos,

40 R2 es un grupo alquilo C_1 - C_{20} , en particular preferiblemente un grupo alquilo C_1 - C_{10} y más preferiblemente un grupo alquilo C_1 - C_2 , en particular un grupo metilo o un grupo etilo, un grupo hidroxialquilo C_1 - C_{20} , en particular preferiblemente un grupo hidroxialquilo C_1 - C_{10} y más preferiblemente un grupo hidroxialquilo C_1 - C_2 , o un átomo de hidrógeno, siendo lo más preferido un átomo de hidrógeno, y

45 R3 es un grupo alquilo C_1 - C_{20} , en particular preferiblemente un grupo alquilo C_1 - C_{10} y más preferiblemente un grupo alquilo C_1 - C_2 , en particular un grupo metilo o un grupo etilo, un grupo hidroxialquilo C_1 - C_{20} , en particular preferiblemente un grupo hidroxialquilo C_1 - C_{10} y más preferiblemente un grupo hidroxialquilo C_1 - C_2 , o un átomo de hidrógeno, siendo lo más preferido un átomo de hidrógeno.

50 Los reactivos nucleófilos que son particularmente preferidos según la invención y que tienen un grupo funcional con la estructura I mostrada arriba son, en particular, aquellos que tienen al menos un grupo funcional de estructura I en el que al menos uno de los radicales R2 y R3, más preferiblemente ambos radicales R2 y R3, es o son un átomo de hidrógeno. Otros reactivos nucleófilos particularmente preferidos son los que tienen al menos un grupo funcional de estructura I en el que el átomo de nitrógeno está unido covalentemente solo a los átomos en los radicales R1, R2 y R3 que están sp^3 hibridados. En particular, ninguno de los radicales R1, R2 o R3 debe ser capaz de deslocalizar el par de electrones libres sobre el átomo de nitrógeno más allá de los radicales R1, R2 y R3. Así, se prefiere en particular que ninguno de los radicales R1, R2 y R3 tenga, por ejemplo, la estructura II:



Los reactivos nucleófilos que son particularmente preferidos según la invención y que tienen al menos un grupo funcional de estructura I se seleccionan del grupo que consiste en metilamina, etilamina, etanolamina, n-propilamina, n-butilamina, isobutilamina, terc-butilamina, dimetilamina, dietilamina, dietanolamina, di-n-propilamina, diisopropilamina, dibutilamina, trimetilamina, trietilamina, trietanolamina, hexametilentetramina, 2-etilhexilamina, 2-amino-1,3-propandiol, hexilamina, ciclohexilamina, 1,2-dimetoxipropanamina, 1-aminopentano, 2-metiloxipropilamina, tri(hidroximetil)aminometano, ácidos aminocarboxílicos, en particular glicina o histidina, o aminoguanidina, y, entre estos, los más preferidos son etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, amino-1,3-propandiol, aminoguanidina y tri(hidroximetil)aminometano. Otros reactivos nucleófilos preferidos que tienen al menos un grupo funciona con la estructura I son aminas aromáticas seleccionadas del grupo que consiste en anilina, toluidina, naftilamina, bencilamina, xilideno, xilendiaminas, naftalendiaminas, toluendiaminas, 3,3'-dimetil-4,4'-difenildiamina, fenilendiaminas, 2,4'-metilendianilina, 4,4'-metilendianilina, sulfonildianilina, y dimetilbencilamina.

El reactivo nucleófilo puede tener al menos un grupo amino primario de estructura I, y el reactivo nucleófilo es una alquilamina C1-C6, una alquildiamina C1-C6, una alquiltriamina C1-C6, un aminoalcohol C1 a C15, o un aminodiol C1 a C15, o un ácido aminocarboxílico C1 a C15.

El reactivo nucleófilo además puede ser un compuesto heterocíclico que comprende un átomo de nitrógeno seleccionado del grupo que comprende pirrol, piridina, quinolina, indol, azaciclopentano, azaciclohexano, morfolina, piperidina, imidazol o un derivado de esos compuestos, en el que un derivado de estos compuestos preferiblemente significa un derivado en el que un grupo alquilo C1-C3, en particular preferiblemente un grupo metilo o un grupo etilo, está unido en lugar de un átomo de hidrógeno a uno o más átomos de carbono o al átomo de nitrógeno en los compuestos mencionados anteriormente.

Los reactivos nucleófilos particularmente preferidos entre los mencionados anteriormente son, en particular, aquellos que son solubles en agua, en especial los que muestran una solubilidad de al menos 1 g/l, en particular preferiblemente de al menos 10 g/l y aún más preferiblemente de la menos 100 g/l en agua a una temperatura de 25 °C y un pH de 7.

La disolución acuosa preferible que comprende el reactivo nucleófilo descrito anteriormente puede basarse en agua pura, preferiblemente desionizada o en otros sistemas acuosos, en particular en mezclas de agua y disolventes orgánicos, tales como alcoholes, en especial mezclas de agua y etanol o metanol, siendo la cantidad de agua preferiblemente de al menos 50% en peso, en particular preferiblemente de al menos 75% en peso, y lo más preferiblemente de al menos 90% en peso, en cada caso basado en el peso total del agua y el disolvente orgánico, disoluciones salinas fisiológicas, en tampones, en especial tampones que comprenden componentes tamponantes conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, TRIS, HEPES, PIPES, CAPS, CHES, AMP, AMPD o MOPS en una cantidad en un intervalo de 0,1 a 1000 mmol/l, en particular preferiblemente de 1 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente de 10 a 200 mmol/l, siendo posible, cuando sea apropiado para dicho componente de tampón y dependiendo de su estructura, que también actúe simultáneamente como reactivo nucleófilo. Otra posibilidad es emplear también un medio nutriente, tal como, por ejemplo, medio MEM y medio DMEM, como sistema acuoso. La disolución acuosa que comprende el reactivo nucleófilo preferiblemente se prepara simplemente mezclando agua o un sistema acuoso apropiado con el reactivo nucleófilo.

La concentración del reactivo nucleófilo en la disolución acuosa se encuentra preferiblemente en un intervalo de 0,1 a 10 000 mmol/l, más preferiblemente de 1 a 5000 mmol/l, aún más preferiblemente de 5 a 2500 mmol/l y lo más preferiblemente de 20 a 1000 mmol/l. En una realización particularmente ventajosa del método de la invención, la concentración del reactivo nucleófilo en la disolución acuosa es mayor que 20 mmol/l, en particular preferiblemente mayor que 50 mmol/l y lo más preferiblemente mayor que 100 mmol/l.

El pH de la disolución acuosa se encuentra preferiblemente en un intervalo de 2 a 12, en particular preferiblemente de 4 a 9 y lo más preferiblemente de 5 a 8, en cada caso medido a la temperatura ambiente.

También según el método de la invención, la muestra biológica puede ponerse en contacto, preferiblemente incubarse, con compuestos que estimulen la destrucción de un tejido biológico y/o la lisis de las células. Este compuesto preferiblemente es una enzima, un detergente, una sustancia caotrópica o una mezcla de al menos dos de estos componentes.

Las enzimas preferidas a este respecto son, en particular, las proteasas, y entre estas la tripsina, proteinasa K, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa y endoproteinasa lys-C son particularmente preferidas, y la proteinasa K es la más preferida. Sin embargo, en una realización concreta del método de la invención también es posible emplear como enzima una proteasa termoestable, según se describe, por ejemplo, en el documento WO-A-91/19792 (aislada a partir de *Thermococcus celer*, *Thermococcus* sp.AN1, *Thermococcus stetteri* o *Thermococcus litoralis*) o en el documento WO-A-91/19792 (aislada a partir de *Staphylothermus marinus*). La descripción de estas publicaciones con respecto a las proteasas termoestables se introduce en la presente como referencia y forma parte de la descripción de la presente invención.

En una realización del método de la invención que puede utilizarse para analizar proteínas de la muestra fijada, no se emplea ningún compuesto que tenga actividad proteolítica, tal como una proteasa. En una realización en la que

deben analizarse ácidos nucleicos, no se incluirá ninguna nucleasa, tal como ADNasa y/o ARNasa.

La concentración de la enzima en la disolución acuosa se encuentra preferiblemente en un intervalo del 0,001 al 5% en peso, en particular preferiblemente del 0,01 al 2,5% en peso y lo más preferiblemente del 0,05 al 0,2% en peso, en cada caso basado en el peso total de la disolución acuosa.

- 5 Los detergentes preferiblemente empleados son compuestos seleccionados del grupo que comprende dodecilsulfato de sodio (SDS), polietilenglicol fenol éteres, tales como, por ejemplo, Triton-X-100, Tween, NP-40 o sus mezclas, prefiriéndose en particular el SDS y Triton-X-100 como detergentes. La cantidad de detergente empleado para lisar las células presentes en la muestra biológica depende de la naturaleza y la cantidad de la muestra biológica y puede ser calculada por los expertos en la técnica mediante experimentos habituales sencillos.
- 10 La lisis de la muestra biológica desparafinada preferiblemente puede realizarse en presencia del agente desparafinante que comprende el medio de inmersión licuado. Preferiblemente, la lisis puede realizarse incubando la mezcla obtenida en la etapa (2), que comprende el tampón de lisis acuoso, que comprende la muestra biológica desparafinada, y el agente desparafinante, que incluye el medio de inmersión licuado. La incubación preferiblemente puede realizarse a una temperatura o una sucesión de etapas de temperatura en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 95°C, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 90°C. La incubación preferiblemente puede realizarse durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas, más preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 12 horas, y lo más preferiblemente de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 3 horas. Una "sucesión de etapas de temperatura" significa que la temperatura a la cual se incubaba la mezcla puede variar durante la incubación, es decir, la mezcla puede incubarse a dos o más temperaturas diferentes de modo consecutivo, estando ambas o todas en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 95°C, preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 90°C. Por ejemplo, la mezcla puede incubarse primero a una temperatura de aproximadamente 50 a aproximadamente 65°C, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 min o hasta 24 h, y la temperatura después puede aumentar, por ejemplo, hasta aproximadamente 70 a aproximadamente 95°C, y la muestra se mantiene a esa temperatura durante aproximadamente 10 a aproximadamente 30 min. Esta sucesión de etapas de temperatura puede preferirse en particular si se añade una proteasa a la muestra.
- 20
- 25

Además, debe entenderse que cualquier etapa de la presente invención, así como dos o más de estas etapas, puede realizarse a una temperatura elevada, es decir, a una temperatura por encima de la temperatura ambiente. Dicha temperatura puede estar preferiblemente en el intervalo de por encima de la temperatura ambiente e igual o menor que 95°C, por ejemplo, a 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, o 90°C. Para realizar una etapa a una temperatura elevada, la propia muestra puede calentarse hasta dicha temperatura y/o cualquier agente combinado con la muestra durante el procesamiento puede calentarse antes de combinarlo con la muestra.

30

Si se contempla la tinción histológica de la muestra desparafinada, la disolución acuosa preferiblemente puede representar una disolución de tinción acuosa, que comprende un tinte o una sustancia, que preferentemente se une a cierto tipo de célula y/o componente celular. Estos tintes histológicos pueden comprender tintes de acridina, tintes de antraquinona, tintes de arilmetano, tintes azoicos, tintes de diazonio, tintes de nitro, tintes de ftalocianina, tintes de quinina imina, tintes de tetrazolio, tintes de tiazol y/o tintes de xanteno. Los tintes histológicos también pueden incluir hematoxilina y eosina o violeta de cresilo, aunque no se limitan a estos. Preferiblemente puede estar presente un agente proteolítico durante la etapa de lisis mencionada anteriormente. Por consiguiente, el tampón de lisis acuoso descrito anteriormente puede comprender además un agente proteolítico o puede añadirse un agente proteolítico a la mezcla del tampón de lisis acuoso y el agente desparafinante obtenida en la etapa (2). Dicho agente proteolítico preferiblemente puede seleccionarse del grupo que comprende proteasas y compuestos proteolíticos no enzimáticos. Más preferiblemente, dicho agente proteolítico puede representar la proteinasa K, tripsina, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa, endoproteinasa Lys-C, proteinasa alfa-lítica, elastasa, colagenasa, bromociano, proteasas de *Bacillus* recombinante, lisozima o sus mezclas.

35

40

45

Preferiblemente, el método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la presente invención puede comprender además una etapa opcional (3) de reducir el número de reticulaciones remanentes en la muestra, preferiblemente calentando la mezcla del tampón de lisis acuoso y el agente desparafinante hasta una temperatura de aproximadamente 70 a aproximadamente 95°C y/o añadiendo a dicha mezcla un agente de eliminación de reticulaciones, que comprende al menos un reactivo nucleófilo, tal como se mencionó anteriormente.

50

Preferiblemente, el método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la presente invención puede comprender una etapa adicional (4) de separar opcionalmente la fase acuosa del agente desparafinante, estando comprendido este en el medio de inmersión licuado. Preferiblemente, el método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la presente invención también puede comprender una etapa adicional (5) de aislar selectivamente al menos una clase de biomoléculas, seleccionadas del grupo que comprende proteínas, ARN y ADN, que preferiblemente representa ARN monocatenario y/o bicatenario (ARNmc y ARNbc, respectivamente), que incluye ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), microARN (miARN) y/o ARN nuclear pequeño (ARNnp), otro tipo de ARN no codificador (corto o largo) y/o ADN monocatenario y/o bicatenario (ADNmc y ADNbc, respectivamente), que incluyen ADN genómico (ADNg), ADN complementario

55

60

(ADNc), ADN mitocondrial (ADNm), ADN nuclear pequeño (ADNnp) y ADN plasmídico, procedente de la muestra biológica lisada.

Debe entenderse que los números (1) a (5) se emplean solo para indicar el orden en el cual estas etapas (si están presentes) se realizan. Sin embargo, no implica que todas las etapas 1 a 5 deban estar presentes en todas las realizaciones del método de la presente invención. Los métodos de la presente invención también pueden incluir realizaciones que pueden comprender las etapas (1) y (2), pero no las etapas (3), (4), y (5); las etapas (1), (2) y (3), pero no las etapas (4) y (5); las etapas (1), (2), (3), y (4), pero no la etapa (5); las etapas (1), (2), (3), y (5), pero no la etapa (4); (1), (2) y (4), pero no las etapas (3) y (5); (1), (2), (4), y (5), pero no la etapa (3); (1), (2) y (5), pero no las etapas (3) y (4). Además, pueden estar presentes una o más etapas intermedias entre dos de las etapas consecutivamente numeradas listadas anteriormente. Si, por ejemplo, se contempla el aislamiento del ARN de la muestra, puede emplearse una etapa de digerir el ADN presente en la muestra, por ejemplo empleando una ADNasa, después de separar la fase acuosa del agente desparafinante según la etapa (4), pero antes de aislar selectivamente y purificar el ARN de los otros componentes presentes en la muestra, concretamente uniéndolo selectivamente a una membrana de sílice en presencia de sales caotrópicas. Como alternativa, puede realizarse una "digestión de ADN en columna" cuando el ARN ya esté unido a la membrana de sílice. Sin embargo, las etapas de desparafinado que emplean xileno o las etapas de lavado alcohólico antes de poner en contacto la muestra con la disolución de tinción acuosa o el tampón de lisis acuoso preferiblemente no se incluyen en el método de la presente invención. Sin embargo, esto no excluye las etapas de lavado alcohólico después de separar la disolución acuosa de los agentes de desparafinado, tales como, por ejemplo, las etapas de lavado con etanol para precipitar selectivamente los ácidos nucleicos sobre una membrana de sílice durante la purificación.

Para facilitar la detección óptica y el control de la separación de fases, el agente desparafinante puede comprender un tinte lipófilo, que es soluble en el agente desparafinante, pero insoluble en el tampón acuoso. Preferiblemente, la etapa (5) de aislar al menos una clase de biomoléculas puede comprender al menos una etapa de purificación cromatográfica y/o basada en una fase sólida, la unión a esferas magnéticas o una etapa de precipitación basada en una fase sólida. Preferiblemente, dicha etapa de precipitación o de purificación cromatográfica y/o basada en una fase sólida puede seleccionarse del grupo que comprende (a) una cromatografía de filtración en gel, (b) una cromatografía de intercambio iónico, (c) una cromatografía en fase inversa, y (d) la precipitación y la unión a una fase sólida, preferiblemente una fase de sílice. Estos métodos son conocidos en la técnica. En términos de la presente invención, la expresión "precipitación y unión a una fase sólida" se refiere a cualquier método basado en una fase sólida en el que las biomoléculas, en particular los ácidos nucleicos, se precipitan de una disolución en presencia de una fase sólida añadiendo un agente precipitante, de modo que las biomoléculas de interés precipitan selectivamente sobre la fase sólida y, así, se unen a dicha fase sólida. La fase sólida puede estar presente en forma de una membrana, un relleno de columna, un filtro, esferas, partículas, un revestimiento de superficie, una varilla de inmersión o un bastoncillo, sin limitarse a estas. Si se emplean partículas o esferas, pueden emplearse preferiblemente partículas o esferas magnéticas como fase sólida, para facilitar la separación de la fase o fases líquidas. La fase sólida puede representar sílice, silicio, vidrio, plástico, nitrocelulosa, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), o nailon, carburo de silicio, aluminio y otro óxido metálico, sin limitarse a estas. La superficie de dicha fase sólida opcionalmente puede funcionalizarse con grupos funcionales para ajustar o potenciar la selectividad y/o la potencia de unión a las biomoléculas, lo cual resulta muy conocido por los expertos en la técnica. Se prefieren en particular las fases sólidas fabricadas de sílice, a las cuales los ácidos nucleicos pueden unirse selectivamente en presencia de tampones de unión caotrópicos. En el mercado están disponibles una serie de kits para purificar ácidos nucleicos de una disolución acuosa, en particular un lisado de células, basados en este principio y pueden emplearse en el método de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los kits QIAGEN RNeasy QIAamp FFPE DNA, EpiTect FFPE, QIASymphony RNA de QIAGEN, Hilden, Alemania. La presente invención se refiere además al uso de un poli(organosiloxano) o de una mezcla de poli(organosiloxanos) para licuar el medio de inmersión en una muestra biológica inmersa en cera.

La presente descripción se refiere además a un kit para procesar una muestra biológica inmersa en cera, que comprende (1) un agente desparafinante, que comprende un poli(organosiloxano) o una mezcla de poli(organosiloxanos), y (2) al menos otro componente seleccionado del grupo que comprende (a) una disolución acuosa para separar la muestra desparafinada y el medio de inmersión licuado, (b) un dispositivo cromatográfico y/o una fase sólida para aislar al menos una clase de biomoléculas, y (c) instrucciones para emplear el kit.

El kit de la presente invención preferiblemente puede ser un kit para procesar una muestra biológica inmersa en cera según el método de la presente invención, tal como se describió anteriormente. En dicho kit, los poli(organosiloxanos) preferiblemente pueden representar los poli(organosiloxanos), tal como se describió anteriormente. En dicho kit, la disolución acuosa preferiblemente puede representar un tampón de lisis, tal como se describió anteriormente. En dicho kit, el dispositivo cromatográfico y/o la fase sólida preferiblemente pueden representar un dispositivo cromatográfico y/o una fase sólida para realizar una etapa de precipitación o de purificación cromatográfica y/o basada en una fase sólida, según se describió anteriormente, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende (a) una cromatografía de filtración en gel, (b) una cromatografía de intercambio iónico, (c) una cromatografía en fase inversa, y (d) la precipitación y la unión a una fase sólida.

Ejemplos

Cuestiones generales

5 En todos los experimentos se emplearon secciones de tejido con un espesor de 5 µm, obtenidas a partir de bloques de tejido humano fijado con formol e inmerso en parafina (riñón e hígado, respectivamente), que se habían conservado a temperatura ambiente durante al menos 26 meses. A menos que se indique lo contrario, cada experimento se realizó por triplicado. Las disoluciones de lisis y digestión, los tampones de unión, lavado y elución y las columnas de centrifugado empleadas están disponibles en el mercado en QIAgen (Hilden, Alemania).

10 Como agentes desparafinantes se emplearon hexadecano (A; ejemplo comparativo), aceite mineral (B; ejemplo comparativo) y aceite de silicona (C; según la presente invención, octametiltrisiloxano al 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., EE.UU.)).

Protocolo general para la desparafinización y lisis celular:

1. Se añadieron 400 µl de uno de los agentes desparafinantes indicados anteriormente (A, B, o C, respectivamente) a una sección de tejido FFPE. La mezcla se sometió a una agitación en vórtice durante 10 s, después se agitó durante 10 s más y, por último, se centrifugó a velocidad máxima durante 2 min de 20 a 25°C.
- 15 2. La mezcla se incubó a 60°C durante 3 min y después se agitó en vórtice durante 10 s.
3. La mezcla se dejó en reposo para que se enfriase hasta la temperatura ambiente.
4. Se añadieron 150 µl del tampón de lisis PKD (QIAgen) a la muestra. La mezcla resultante se sometió a una agitación en vórtice durante 10 s y después se centrifugó a 11.000×g durante 1 min de 20 a 25°C.
- 20 5. Se pipetearon 10 µl de proteinasa K (Qiagen, Hilden, Alemania) a la fase acuosa inferior, y dicha fase se mezcló pipeteando la fase hacia arriba y hacia abajo tres veces.
6. La muestra se incubó durante 15 min a 56°C, seguida de una segunda etapa de incubación a 80°C durante 15 min más.
7. La fase acuosa (inferior) se separó empleando una pipeta y se trasladó a un nuevo tubo.
- 25 8. La fase acuosa se incubó en hielo durante 3 min, y después se centrifugó a 20.200×g durante 15 min. El sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo, mientras que el sedimento remanente se rechazó. El posterior procesamiento de las muestras se realizó según los siguientes ejemplos 1 y 2, respectivamente.

Ejemplo 1: Aislamiento y purificación del ARN total, que incluye miARN, a partir de muestras FFPE con una digestión de ADN en columna

30 En este experimento se emplearon muestras de hígado. Las muestras se prepararon como se describió en el anterior protocolo general. Después:

9. Se añadieron 320 µl de tampón RBC (QIAgen) a la muestra obtenida en la anterior etapa 8, y la mezcla se agitó en vórtice a fondo.
10. Se añadieron 1,12 ml de EtOH puro y se mezcló con la muestra pipeteando arriba y abajo.
- 35 11. Se aplicaron 700 µl de la disolución obtenida en la etapa 10 a una columna de centrifugado RNeasy MinElute equipada con un tubo de recolección de 2 ml (QIAgen). La columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s, y la corriente se rechazó.
12. Se repitió la etapa 11 hasta que se trasladó toda la muestra.
13. Se aplicaron 350 µl de tampón RDF (QIAgen) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s. La corriente se rechazó.
- 40 14. Para una digestión de ADN en columna, se aplicaron directamente 80 µl de mezcla de ADNasa I, que comprende 10 µl de ADNasa 1 (2,7 unidades Kunitz/µl) y 70 µl de tampón buffer RDD (QIAgen), a la membrana de sílice. La membrana se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.
15. Se añadieron 500 µl de tampón RDF (QIAgen) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s. La corriente se recogió.
- 45 16. La columna de centrifugado se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y la corriente recolectada en la etapa 15 se aplicó a la columna. La columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s, y la corriente se rechazó.
17. Se añadieron 500 µl de tampón RPE (QIAgen) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s.

La corriente se rechazó.

18. Se añadieron 500 µl de tampón RPE (QIAgen) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 2 min. La corriente se rechazó.

5 19. La columna de centrifugado se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Para secar la columna, la columna abierta se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min. La corriente se rechazó.

20. La columna se colocó en un tubo con cierre de seguridad de 1,5 ml (Eppendorf). El ARN se eluyó de la columna aplicando 20 µl de agua sin ARNasa a la membrana y centrifugando la columna a velocidad máxima durante 1 min. La corriente se recolectó y se analizó como se describe a continuación.

10 Los eluatos se analizaron con espectroscopía de UV/visible en Nanodrop (ThermoSCIENTIFIC, Wilmington, Del., EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. El promedio de rendimiento de ARN obtenido de tres muestras individuales de hígado fue el siguiente, empleando hexadecano 0,56 µg, empleando aceite mineral 0,49 µg, y empleando aceite de silicona 0,63 µg.

15 Las muestras individuales se analizaron en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) según la guía Agilent 6000 Nano Kit Guide, edición 08/2006. El número de integridad del ARN (RIN) fue casi el mismo para todas las muestras empleando aceite mineral (1,20) y empleando aceite de silicona (1,20).

20 Se realizó una PCR a tiempo real con transcriptasa inversa en un Rotor-Gene Q (QIAgen, Hilden, Alemania), empleando un kit de transcripción inversa QuantiTect (QIAgen, Hilden, Alemania) para la síntesis de ADN con eliminación del ADN genómico integrado empleando el tampón gDNA Wipeout. Se mezclaron 6,25 µl de tampón de lavado QuantiFast gDNA (QIAgen) y 4,75 µl de agua sin ARNasa con 2 µl de la disolución de muestra, que se había diluido empleando agua sin ARNasa para obtener una concentración de ARN de aproximadamente 25 ng/µl o 2 µl de agua sin ARNasa como blanco, respectivamente. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min.

25 El posterior procesamiento de la muestra se realizó en hielo. Se mezclaron 1,25 µl de las mezclas de muestras con 6,25 µl de mezcla maestra QuantiFast Probe RT-PCR Plus (QIAgen), 1,25 µl de un cebador directo y 1,25 µl de un cebador inverso. Después se añadieron a las muestras 0,25 µl de mezcla QuantiTect Fast RT Mix (QIAgen) y 1,75 µl de agua sin ARNasa (la muestra con transcriptasa inversa), o 2,0 µl de agua sin ARNasa (la muestra sin transcriptasa inversa). Las mezclas de PCR resultantes (12 µl) se trasladaron a tubos de PCR y se amplificaron. Las condiciones del ciclador térmico fueron las siguientes: 20 min a 50°C, fusión durante 5 min a 95°C, y después 40 ciclos de 15 s a 95°C y reasociado y extensión durante 30 s a 60°C. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

30

Tabla 1

Agente desparafinante	sin/con TI (valor promedio)	TI (valor promedio)	Δ ct
hexadecano	40,00	33,49	6,51
aceite mineral	40,00	32,28	7,72
aceite de silicona	40,00	33,45	6,55

Ejemplo 2: Aislamiento y purificación del ARN total, que incluye miARN, a partir de muestras FFPE con una digestión de ADN en columna antes de aplicar las muestras a la columna

35 En este experimento se emplearon muestras de riñón. Las muestras se prepararon como se describió en el anterior protocolo general. Después:

9. Se añadieron 16 µl de tampón de refuerzo de ADNasa (QIAgen) y 10 µl de ADNasa (QIAgen) a la muestra obtenida en la anterior etapa 8. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 min.

10. Se añadieron 320 µl de tampón RBC (QIAgen) y la mezcla se agitó en vórtice a fondo.

11. Se añadieron 1,12 ml de EtOH puro y se mezcló con la muestra pipeteando arriba y abajo.

40 12. Se aplicaron 700 µl de la disolución obtenida en la etapa 11 a una columna de centrifugado RNeasy MinElute equipada con un tubo de recolección de 2 ml (QIAgen). La columna de tubo se centrifugó a 8.000×g durante 15 s, y la corriente se rechazó.

13. Se repitió la etapa 12 hasta que se trasladó toda la muestra.

45 14. Se aplicaron 700 µl de tampón RDF (QIAgen) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s. La corriente se rechazó.

15. Se añadieron 500 µl de tampón RPE (QIAGEN) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 15 s. La corriente se rechazó.
16. Se añadieron 500 µl de tampón RPE (QIAGEN) a la columna y la columna se centrifugó a 8.000×g durante 2 min. La corriente se rechazó.
- 5 17. La columna de centrifugado se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Para secar la columna, la columna abierta se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min. La corriente se rechazó.
18. La columna se colocó en un tubo con cierre de seguridad de 1,5 ml (Eppendorf). El ARN se eluyó de la columna aplicando 20 µl de agua sin ARNasa a la membrana y centrifugando la columna a velocidad máxima durante 1 min. La corriente se recolectó y se analizó como se describe a continuación.
- 10 Los eluatos se analizaron con espectroscopía de UV/visible en Nanodrop (ThermoSCIENTIFIC, Wilmington, Del., EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. El promedio de rendimiento de ARN obtenido de tres muestras individuales de riñón fue el siguiente, empleando hexadecano 1,38 µg, empleando aceite mineral 1,11 µg, y empleando aceite de silicona 1,89 µg.
- 15 Las muestras individuales se analizaron en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) según la guía Agilent 6000 Nano Kit Guide, edición 08/2006. El número de integridad del ARN (RIN) fue el siguiente: empleando hexadecano 2,00, empleando aceite mineral 2,50 y empleando aceite de silicona 2,50. Se realizó una PCR a tiempo real con transcriptasa inversa en un Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Alemania), empleando un kit de transcripción inversa QuantiTect (QIAGEN, Hilden, Alemania) para la síntesis de ADN con eliminación del ADN genómico integrado empleando el tampón gDNA Wipeout. La preparación de las muestras para la PCR se realizó como se describió en el ejemplo 1. Los resultados se presentan en la tabla 2.
- 20

Tabla 2

Agente desparafinante	sin/con TI (valor promedio)	TI (valor promedio)	Δ ct
hexadecano	40,00	33,08	6,92
aceite mineral	40,00	32,29	7,71
aceite de silicona	40,00	32,85	7,15

- 25 Tal como puede observarse de los resultados de los ejemplos 1 y 2, el aceite de silicona puede emplearse para desparafinar muestras de tejidos FFPE con la posterior lisis de las células en presencia del agente desparafinante. Las disoluciones de muestras obtenidas pueden procesarse posteriormente de modo conveniente empleando kits de purificación y análisis disponibles en el mercado bien establecidos. Pueden aislarse los ácidos nucleicos, por ejemplo, ARN, que incluye miARN, de estas muestras con un rendimiento y una calidad comparables, y a veces superior, a los resultados obtenidos empleando métodos conocidos en la técnica.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera, que comprende una etapa (1) de licuar el medio de inmersión exponiendo la muestra biológica inmersa a un agente desparafinante, en el que el agente desparafinante comprende un poli(organosiloxano) o una mezcla de poli(organosiloxanos).
- 5 2.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica inmersa en cera se selecciona del grupo que comprende tejidos y/o células inmersas y, preferiblemente, es una muestra inmersa en parafina, preferiblemente una muestra inmersa en parafina y fijada con formol (muestra FFPE).
- 10 3.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente desparafinante tiene un punto de ebullición mayor que 75°C, preferiblemente mayor que 90°C, más preferiblemente mayor que 120°C y lo más preferiblemente mayor que 140°C.
- 15 4.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente desparafinante tiene una viscosidad cinemática igual o menor que 5 mm²·s⁻¹, preferiblemente igual o menor que 3 mm²·s⁻¹, más preferiblemente igual o menor que 2 mm²·s⁻¹ y lo más preferiblemente igual o menor que 1,5 mm²·s⁻¹.
- 20 5.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el poli(organosiloxano) o los poli(organosiloxanos) se seleccionan del grupo que comprende poli(organosiloxanos) lineales, preferiblemente polidialquilsiloxanos terminados en trialkilsiloxi, en los que "alquil" comprende cadenas hidrocarbonadas C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆ lineales o ramificadas, más preferiblemente del grupo que comprende polidimetilsiloxanos terminados en trimetilsiloxi lineales de fórmula CH₃[Si(CH₃)₂O]_nSi(CH₃)₃, en la que el número de unidades repetidas n está en el intervalo de 1 a 5, y lo más preferiblemente, el poli(organosiloxano) representa octametiltrisiloxano (n = 2).
- 25 6.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de exponer la muestra biológica inmersa a un agente desparafinante incluye la incubación de la muestra biológica inmersa en presencia del agente desparafinante a una temperatura en el intervalo de 15 a 95°C, preferiblemente de 20 a 75°C y lo más preferiblemente de la temperatura ambiente (23 +/- 2°C) a 65°C.
- 30 7.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método incluye una etapa (2) de exponer la muestra obtenida en la etapa (1), que aún comprende el medio de inmersión licuado, a una disolución acuosa, separando con ello el medio de inmersión licuado y la muestra desparafinada.
- 35 8.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la reivindicación 7, en el que la disolución acuosa es un tampón de lisis acuoso, que preferiblemente comprende al menos una sustancia tamponante y un detergente, y la lisis de la muestra biológica desparafinada se realiza en presencia del agente desparafinante que comprende el medio de inmersión licuado, preferiblemente mediante la incubación de la muestra del tampón de lisis acuoso, que comprende la muestra biológica desparafinada, y el agente desparafinante, que comprende el medio de inmersión licuado, obtenida en la etapa (2), a una temperatura o a una sucesión de etapas de temperatura en el intervalo de 15 a 95°C, preferiblemente de 20 a 90°C, preferiblemente durante un periodo de tiempo de 1 minuto a 24 horas, más preferiblemente de 5 minutos a 12 horas, y lo más preferiblemente de 15 minutos a 3 horas.
- 40 9.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la reivindicación 8, en el que el tampón de lisis acuoso comprende además un agente proteolítico o un agente proteolítico se añade a la mezcla del tampón de lisis acuoso y el agente desparafinante obtenida en la etapa (2), y dicho agente proteolítico se selecciona del grupo que comprende proteasas y compuesto proteolíticos no enzimáticos, y preferiblemente representa proteinasa K, tripsina, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa, endoproteinasa Lys-C, proteinasa alfa-lítica, elastasa, colagenasa, bromociano, proteasas de *Bacillus* recombinante, lisozima o sus mezclas.
- 45 10.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la reivindicación 8 o 9, que comprende además una etapa opcional (3) de reducir el número de reticulaciones remanentes en la muestra, preferiblemente calentando la mezcla del tampón de lisis acuoso y el agente desparafinante hasta una temperatura de aproximadamente 70-95°C y/o añadiendo a dicha mezcla un agente de eliminación de reticulaciones, que comprende al menos un reactivo nucleófilo.
- 50 11.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende las etapas adicionales de (4) separar opcionalmente la fase acuosa del agente desparafinante, que comprende el medio de inmersión licuado, y (5) aislar selectivamente al menos una clase de biomoléculas, seleccionadas del grupo que comprende proteínas, ARN y ADN, que representa preferiblemente ARN y/o ADN, de la muestra biológica lisada.
- 55 12.- Un método según la reivindicación 11, en el que la etapa de aislar al menos una clase de biomoléculas

comprende al menos una etapa de precipitación o de purificación cromatográfica y/o basada en una fase sólida, seleccionada preferiblemente del grupo que comprende (a) una cromatografía de filtración en gel, (b) una cromatografía de intercambio iónico, (c) una cromatografía en fase inversa, y (d) la precipitación y la unión simultánea a una fase sólida.

- 5 13.- Un método para procesar una muestra biológica inmersa en cera según la reivindicación 7, en el que la disolución acuosa es una disolución de tinción acuosa, que comprende un tinte o una sustancia que se une a ciertos tipos de células y/o componentes celulares, que se selecciona preferiblemente del grupo que comprende tintes de acridina, tintes de antraquinona, tintes de arilmetano, tintes azoicos, tintes de diazonio, tintes de nitro, tintes de ftalocianina, tintes de quinina imina, tintes de tetrazolio, tintes de tiazol, tintes de xanteno, hematoxilina, eosina, o sus mezclas.
- 10 14.- El uso de un poli(organosiloxano) o de una mezcla de poli(organosiloxanos) para licuar el medio de inmersión en una muestra biológica inmersa en cera.
- 15 15.- Un kit para procesar una muestra biológica inmersa en cera, que comprende (1) un agente desparafinante, que comprende un poli(organosiloxano) o una mezcla de poli(organosiloxanos), y (2) (a) una disolución acuosa para separar la muestra desparafinada y el medio de inmersión licuado, (b) un dispositivo cromatográfico y/o una fase sólida para aislar al menos una clase de biomoléculas, y opcionalmente (c) instrucciones para emplear el kit.
- 20 16.- Un kit según la reivindicación 15, preferiblemente para procesar una muestra biológica inmersa en cera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el poli(organosiloxano) o los poli(organosiloxanos) son según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, la disolución acuosa preferiblemente es un tampón de lisis según la reivindicación 8 o 9, y el dispositivo cromatográfico y/o fase sólida es un dispositivo cromatográfico y/o una fase sólida para realizar el método según la reivindicación 12.