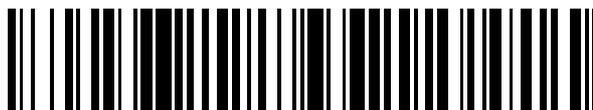


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 956**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2014 PCT/EP2014/053154**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2014 E 14705753 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2958997**

54 Título: **Aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

25.02.2013 EP 13156609

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

12.02.2020

73 Titular/es:

**BIOCARTIS NV (100.0%)
Generaal De Wittelaan 11 B3
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**VAN ACKER, KOEN;
CLAES, BART;
DEVOGELAERE, BENOÎT;
MAERTENS, GEERT;
SABLON, ERWIN;
HOLEMANS, PASCALE y
IVENS, TANIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 741 956 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

Aislamiento de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos mejorados de procesamiento y análisis de muestras. En particular, la invención se refiere a métodos para liberar ácido nucleico de una muestra biológica, lo que permite el procesamiento directo posterior del ácido nucleico. Estos métodos son útiles para el diagnóstico, la estadificación o la caracterización de diversas enfermedades.

Antecedentes de la invención

10 Los sistemas microfluídicos y los sistemas microfluídico-microfluídico combinados son atractivos para el diagnóstico y permiten entornos con recursos limitados porque utilizan protocolos analíticos completos, incluido el pretratamiento de la muestra, la manipulación de la muestra/el reactivo, la separación, la reacción y la detección integrados en un único soporte. Los métodos actuales para lisar células se basan en la lisis mecánica, la lisis térmica, la lisis química o la lisis eléctrica. Una vez que se han lisado las células o las muestras, o una vez que el ácido nucleico se libera de la muestra, los sistemas de detección de microfluidos requieren que el ácido nucleico se purifique o se concentre antes de enviarlo a un sensor. Se encuentra disponible una amplia gama de métodos de extracción de ácido nucleico, cada uno aplica diferentes tipos de química y está optimizado para tipos de muestras particulares. Debido a su naturaleza compleja, la mayoría de los métodos de extracción existentes no son apropiados para la incorporación en soportes de microfluidos o dan como resultado una pérdida significativa de ácidos nucleicos durante la etapa de extracción.

20 Se toman una variedad de muestras biológicas de individuos para evaluar los indicadores de diagnóstico y de pronóstico de la enfermedad. Las muestras de tejido fresco, las muestras fijadas y embebidas y las biopsias por aspiración con aguja fina (AAF) son una fuente valiosa de material para obtener información tanto molecular como clínica, ya que a menudo provienen de muestras humanas recolectadas para examinar la histología de las biopsias para la detección de enfermedades. El tejido que se trata con un fijador, que prepara la muestra para una variedad de procedimientos (inmuno)histoquímicos, experimenta una variedad de modificaciones de reticulación entre ácidos nucleicos y aminoácidos (Chaw YFM et al. *Biochemistry* 1980, 19: 5525-5531; Metz B. et al. *J. Biol. Chem* 2004, 279: 6235-6243). El tejido fijado se embebe en un bloque de material de embebido (como agar, gelatina o cera) que se endurece y se hacen cortes de tan solo 1-2 capas de células de espesor para estudios histológicos. En comparación con la extracción de ácido nucleico de muestras de otros orígenes, la extracción de ácido nucleico de cortes de muestra fijados y embebidos requiere la etapa adicional de eliminación del material de embebido.

30 El uso de la fijación con formalina y el embebido en de parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) para fijar y preservar muestras de tejido es casi universal. Hay disponible una serie de protocolos convencionales que solubilizan la parafina y liberan ácidos nucleicos de las muestras de FFPE (Gilbert M.T.P. et al., *PLoS One* 2007, 2(6):e537). Los métodos tradicionales de desparafinación comienzan con una etapa de licuefacción que utiliza un disolvente orgánico, generalmente xileno, seguido de una etapa de extracción de ácido nucleico (Goezl et al., *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1985, Vol. 130 No. 1, p118-126). El xileno tiene las principales desventajas de ser inflamable, volátil, tóxico e incompatible con el plástico, haciéndolo menos adecuado para su uso en sistemas automatizados.

40 La preparación de ácido nucleico a partir de muestras de cortes de tejido generalmente requiere una etapa de proteinasa, con mayor frecuencia de incubación con una proteasa termoestable en presencia de tensioactivos, para liberar el ácido nucleico y degradar los inhibidores que pueden interferir con el análisis posterior del ácido nucleico. La cantidad de ácido nucleico liberado es a menudo insignificante porque hay muy poco tejido real presente en el corte y, en el caso de un corte de tejido FFPE, los ácidos nucleicos se degradan con frecuencia. Como consecuencia, en los métodos convencionales, el ácido nucleico a menudo necesita estar concentrado antes de enviarlo a un sensor posterior en sistemas automatizados.

45 Se han explorado soluciones no tóxicas para la desparafinación y se han puesto a disposición mejoras para los métodos de recuperación de ácido nucleico aplicables en muestras de FFPE a nivel de laboratorio (p. ej., el kit WAXFREE™ de Trimgen, el kit ExpressArt FFPE Clear RNAready de Amplification Technologies, el kit BiOstic™ FFPE Tissue Isolation Kit de Mo Bio Laboratories, y el kit QuickExtract™ FFPE DNA Extraction de Epicenter).

50 Una de tales mejoras se describe en el documento WO2012/075133 y proporciona métodos para el aislamiento in situ de ácido nucleico a partir de muestras embebidas en una matriz hidrófoba tal como parafina o una mezcla de parafina. Se genera un lisado emulsionado en presencia de una proteasa termoestable y un aditivo seleccionado de un alquilenglicol, un polialquilenglicerol, o un copolímero de bloque que tiene un peso molecular promedio de 76 a 2900 Da, o una sal. Se utilizan diferentes aditivos para emulsionar la muestra, que incluyen PEG200, PEG400, PEG1000, Brij30, Brij35P, Brij56 y Brij 76. El lisado emulsionado se obtiene en presencia de un caótropro suave (p. ej., urea o formamida) y calor. El método elimina la necesidad de la separación física de la parafina y el uso de disolventes orgánicos como el xileno en una etapa de desparafinación. Sin embargo, la extracción posterior de los ácidos nucleicos del lisado emulsionado sigue siendo necesaria para otras aplicaciones posteriores, como p. ej. la cuantificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa, y dicho método podría no ser compatible con los sistemas

microfluídicos.

5 El documento WO 2013/020089 se refiere a sistemas y métodos para procesar muestras de fluidos que se logran utilizando una serie de matrices de microfluidos que incluyen un sistema automatizado e integrado para clasificar partículas de una muestra biológica, lisando esas partículas para exponer el ARN o ADN total, purificar el ARN o el ADN, procesar el ARN o el ADN por modificación química o enzimática, para seleccionar moléculas de ARN o de ADN por tamaño, o para generar, opcionalmente, una biblioteca de secuenciación.

10 La integración de un protocolo de extracción de ácido nucleico en un soporte microfluídico requiere un gran esfuerzo para optimizar el rendimiento y minimizar la pérdida de ácido nucleico. Adicionalmente, la extracción también es una etapa lenta en el procedimiento de preparación de muestras. Además, la extracción introduce un sesgo de tamaño (pérdida de fragmentos más pequeños) en los ácidos nucleicos eluidos, lo cual es especialmente problemático al aislar ácidos nucleicos de muestras de FFPE, que contienen ácidos nucleicos degradados. Por lo tanto, un método que es uniformemente aplicable para obtener ácidos nucleicos de una amplia gama de muestras biológicas, incluyendo muestras de FFPE en una condición que permita el procesamiento automatizado del sistema microfluídico y el análisis directo posterior proporcionaría una gran ventaja en comparación con los métodos existentes. En particular, las muestras de FFPE en una condición que permite el procesamiento automatizado del sistema microfluídico y el análisis directo posterior, sin el riesgo de perder ciertos fragmentos de ácido nucleico e introducir un sesgo de longitud y pureza, proporcionaría una gran ventaja en comparación con los métodos existentes.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el proceso de preparación de muestras que permite el procesamiento automatizado de alto rendimiento y la detección de ácido nucleico en diversas muestras biológicas.

20 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona el tema tal como se establece en una cualquiera y en todas las reivindicaciones adjuntas 1 a 9.

25 La presente invención proporciona ácidos nucleicos liberados de muestras biológicas en un ambiente que interactúa con aplicaciones posteriores, tales como procesos de amplificación. Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento eliminan el requisito de etapas de extracción de ácido nucleico separadas antes del análisis de ácido nucleico posterior. Los procesos y composiciones de preparación de muestras permiten un procesamiento automatizado y son particularmente adecuados para la implementación en sistemas microfluídicos de diagnóstico de ácido nucleico. La presente invención supera las deficiencias de la técnica convencional y puede lograr otras ventajas no contempladas por los procesos convencionales.

30 En particular, la presente invención proporciona ácidos nucleicos liberados de muestras biológicas en un entorno que interactúa con aplicaciones posteriores, tales como procesos de amplificación dentro de un sistema microfluídico. Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento eliminan el requisito de etapas de extracción de ácido nucleico separadas y eliminan la necesidad de etapas de extracción de ácido nucleico, reducen el posible sesgo y eliminan la necesidad de diluir los ácidos nucleicos liberados antes del análisis de ácido nucleico posterior.

35 En términos generales, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácido nucleico de una muestra biológica que permita el análisis directo de ácido nucleico en un sistema microfluídico que comprende la etapa de

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior.

40 En particular, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácidos nucleicos de una muestra biológica que permite el análisis directo de ácidos nucleicos en un sistema microfluídico que comprende las etapas de

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior, y
- analizar el ácido nucleico directamente en el lisado.

45 Más en particular, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácido nucleico de una muestra biológica que permite el análisis directo de ácido nucleico en un sistema microfluídico que comprende las etapas de

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior,
- procesar el lisado en un sistema microfluídico para el análisis de ácido nucleico, y
- 50 - analizar el ácido nucleico directamente en el lisado.

Más en particular, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácidos nucleicos de una muestra biológica que permite el análisis directo de ácidos nucleicos en un sistema microfluídico que comprende las etapas de

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con

- los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior, y
- analizar el ácido nucleico directamente en el lisado no diluido o mínimamente diluido dentro del sistema microfluídico.

5 Más en particular, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácido nucleico de una muestra biológica que permite el análisis directo de ácido nucleico en un sistema microfluídico que comprende las etapas de

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior,
- procesar el lisado en un sistema microfluídico para el análisis de ácido nucleico, y
- 10 - analizar el ácido nucleico directamente en el lisado no diluido o mínimamente diluido dentro del sistema microfluídico.

En particular, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácidos nucleicos contenidos en una muestra biológica, comprendiendo el método la etapa de:

- poner en contacto la muestra biológica con una composición para convertir al menos parte de la muestra en un lisado que contiene dichos ácidos nucleicos, siendo dicho lisado directamente transportable a través de un sistema microfluídico;
- 15 - analizar el ácido nucleico contenido en el lisado dentro del sistema microfluídico.

Más en particular, es un aspecto de la divulgación proporcionar un método para liberar ácidos nucleicos contenidos en una muestra biológica, comprendiendo el método la etapa de:

- poner en contacto la muestra biológica con una composición para convertir al menos parte de la muestra en un lisado que contiene dichos ácidos nucleicos, siendo dicho lisado directamente transportable a través de un sistema microfluídico;
- 20 - analizar el ácido nucleico directamente en el lisado dentro del sistema microfluídico.

25 Los métodos de la invención incluyen combinaciones de métodos y composiciones de la invención tal como se describe en el presente documento que trabajan juntos para mejorar la sensibilidad y la precisión de la determinación de ácido nucleico.

Por lo tanto, también es un aspecto de la presente descripción proporcionar un método para analizar el ácido nucleico liberado de una muestra biológica en un sistema microfluídico, cuyo método incorpora las etapas de:

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior, y
- 30 - analizar el ácido nucleico directamente en el lisado.

En todos los aspectos, el ácido nucleico se amplifica directamente en el lisado dentro del sistema microfluídico.

Es un aspecto adicional de la presente divulgación proporcionar un método para analizar el ácido nucleico liberado de una muestra biológica en un sistema microfluídico, cuyo método incorpora las etapas de:

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior,
- 35 - procesar el lisado en un sistema microfluídico para el análisis directo de ácido nucleico, y
- analizar el ácido nucleico directamente en el lisado

Los métodos de la presente invención son aplicables en una muestra fija, una muestra embebida en cera y/o una muestra de FFPE.

40 La composición para su uso en los métodos de la invención tiene propiedades de licuefacción. En realizaciones preferidas, el método es aplicable para licuar y/ o disolver cera de una muestra biológica que contiene cera.

En realizaciones particulares, la composición para su uso en los métodos de la presente invención tenía propiedades similares a las propiedades esenciales de la composición actualmente descrita.

45 Por lo tanto, se proporcionan composiciones para liberar ácido nucleico de una muestra biológica que permite el análisis directo de ácido nucleico en un sistema microfluídico, cuyas composiciones comprenden un tensioactivo compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo. Preferiblemente, se proporcionan composiciones para liberar ácido nucleico de una muestra biológica para formar un lisado que permite el análisis de ácido nucleico directamente en el lisado dentro de un sistema microfluídico, cuyas composiciones comprenden un tensioactivo compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo. Preferiblemente, la composición cuando se pone en contacto con una muestra proporcionará un lisado, cuyo lisado en su forma no diluida es compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo. Preferiblemente, el lisado en su forma no diluida o en forma diluida menor es compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo. Las composiciones

50

como se describen en el presente documento tienen propiedades emulsionantes y comprenden un tensioactivo no iónico compatible con el análisis de ácido nucleico aguas abajo. Preferiblemente, el tensioactivo no iónico tiene la fórmula $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$ en donde $n > 7$, $n \geq 8$ o $n = 8$; R comprende $12 \leq C \leq 38$, R es una cadena de alquilo, R es $CH_3(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_8$, o R es $(CH_2)_{11}(CH_3)$. Preferiblemente, el tensioactivo no iónico es un PEG éter de alcohol graso de (iso-tridecilo) C13 o un PEG éter de alcohol de oleílo. Lo más preferiblemente, el tensioactivo es Oleth®-8. Oleth®-8 se corresponde con (Z)-3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxadotetracont-33-en-1-ol (número CAS 27040-03-5).

Las composiciones como se describen en el presente documento incluyen al menos un tensioactivo no iónico, una proteasa termoestable y un agente tamponador del pH y son particularmente útiles para generar un lisado emulsionado cuando se pone en contacto con calor con una muestra que contiene cera, cuyo lisado emulsionado en su forma no diluida es compatible y puede ser procesado directamente por sistemas microfluídicos para análisis de ácido nucleico. Preferiblemente, el lisado emulsionado en su forma no diluida o en forma diluida menor es compatible y puede ser procesado directamente por sistemas microfluídicos para análisis de ácido nucleico.

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un kit para obtener un ácido nucleico de una muestra que puede procesarse directamente mediante un analizador microfluídico, cuyo kit comprende al menos una composición como se describe en el presente documento.

Estas y otras características de la presente invención se harán más evidentes a partir de las reivindicaciones y de la descripción detallada que se proporcionan en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Gráfico que representa la compatibilidad de PCR del lisado licuado obtenido de muestras de tejido FFPE utilizando dos métodos diferentes. El eje X representa el número de ciclos de amplificación; El eje Y representa las unidades de fluorescencia relativa (UFR)(103). Se muestran curvas de amplificación que representan la composición de licuefacción que contiene el detergente Oleth®-8 (gris) y el tampón de licuefacción comercial (negro); las curvas marcadas con cruces representan muestras casi sin diluir, las curvas marcadas con círculos representan muestras diluidas 4 veces. Las muestras diluidas menores representan una proporción 80/20 de lisado/mezcla de amplificación de PCR.

Figura 2: Imagen que demuestra la incompatibilidad del tampón comercial con el sistema qPCR microfluídico. El círculo marca la formación de burbujas de aire en la cámara de PCR después del bombeo del tampón comercial a través de la ruta microfluídica.

Figura 3: Gráfico de Cq que demuestra un ensayo de rendimiento practicado en ADN de muestras FFPE de melanoma con cantidades variables de melanina, siguiendo diferentes métodos de extracción/licuefacción de ADN. El eje X representa muestras FFPE; El eje Y representa los valores de Cq obtenidos; las barras representan: Licuefacción de ADN usando una solución comercial (Negro), Extracción de ADN basada en columnas (Gris oscuro) y licuefacción de ADN de la presente invención (Gris claro). Los valores más bajos indican un valor umbral de qPCR más bajo y, por lo tanto, una sensibilidad mejorada para el análisis de ADN.

Figura 4: Representación visual de muestras FFPE1, FFPE2 y FFPE3 con alto contenido de melanina utilizadas en el Ejemplo 5.

Figura 5: Imagen que muestra la licuefacción de la muestra en combinación con un aumento de la temperatura (A) y la licuefacción de la muestra en combinación con un aumento de la temperatura combinado con el tratamiento con HIFU (B).

Figuras 6a y 6b: Curvas de qRT-PCR obtenidas de material licuado (X) y ARN extraído con sílice (□) de secciones individuales consecutivas de 10 μm de 2 muestras representativas de FFPE (FFPE 1 y FFPE 2)

Descripción detallada de la invención

Las técnicas para la extracción de ácido nucleico de muestras de tejido biológico normalmente usan dos etapas separadas: a/ digestión del tejido seguido de b/ purificación de los ácidos nucleicos. Las técnicas para la extracción de ácido nucleico de muestras que contienen cera usan comúnmente tres etapas separadas: a/ eliminación de la cera; seguido de b/digestión del tejido; y c/ purificación de los ácidos nucleicos. En general, estos métodos con mayor frecuencia requieren mucho tiempo y/o no se pueden transferir directamente a sistemas de diagnóstico totalmente integrados, ya que la extracción de ácido nucleico requiere reactivos complicados (p. ej., etanol) y subetapas como la centrifugación de la muestra o la incompatibilidad con los plásticos (xileno) o los fluidos (p. ej., debido a la formación de espuma en los canales). Los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento permiten ahora el análisis directo de ácidos nucleicos de muestras biológicas, incluyendo muestras que contienen cera, sin requerir purificación previa del ácido nucleico de la muestra.

La descripción proporciona por el presente documento composiciones para liberar ácidos nucleicos de diversas muestras biológicas, incluyendo muestras que contienen cera. Las composiciones encuentran su aplicación en métodos para liberar ácido nucleico de una muestra que permite el análisis directo de ácido nucleico en un sistema

microfluídico, y en métodos para analizar el ácido nucleico liberado de una muestra en un sistema microfluídico. En aplicaciones particulares, los métodos comprenden la etapa de poner en contacto una muestra biológica con una composición en condiciones para proporcionar un lisado que permita la liberación de ácido nucleico de la muestra, cuyo lisado es compatible con los sistemas microfluídicos diseñados para el análisis de ácido nucleico aguas abajo.

5 El lisado es una muestra líquida y puede ser un lisado simple o, como alternativa, puede ser el resultado de una incubación con una enzima, tal como una proteasa. En la presente solicitud, el uso de "lisado" significa "lisado", "muestra líquida" o "digerido" a menos que se indique lo contrario. El lisado está listo para el análisis directo de ácido nucleico sin requerir una purificación adicional del ácido nucleico liberado del lisado. El ácido nucleico puede analizarse directamente en el lisado.

10 El análisis directo de ácido nucleico se refiere a un análisis de ácido nucleico liberado en un lisado sin requerir la purificación del ácido nucleico de los detergentes, proteínas, sales y reactivos utilizados durante la etapa de lisis. El método es uniformemente aplicable para obtener ácidos nucleicos de una amplia gama de muestras biológicas en una condición que permite el procesamiento automatizado del sistema microfluídico y el análisis directo aguas abajo sin el riesgo de perder ciertos fragmentos de ácido nucleico e introducir un sesgo de longitud y pureza. p. ej., sin precipitación

15 de etanol, se requiere extracción con fenol-cloroformo o purificación en mini-columna. Se espera que la información genética sea representativa cuando no se utilizan etapas de purificación. El análisis de ácido nucleico, en particular la amplificación de ácido nucleico, en algunos casos puede requerir una forma diluida menor del lisado por razones de, p. ej., la dilución de potentes inhibidores de las enzimas de amplificación, sustancias diluyentes que desestabilizan las enzimas, ... El análisis de ácido nucleico, en particular la amplificación de ácido nucleico, puede o no requerir la adición

20 de sustancias para realizar una amplificación del ácido nucleico, y en consecuencia puede dar como resultado una dilución menor del lisado inicial. Las sustancias requeridas para el procesamiento posterior de la muestra pueden proporcionarse en un formato seco y pueden disolverse directamente en el lisado.

La forma diluida menor se refiere a la dilución del lisado de ácido nucleico con sustancias de amplificación de lisado de ácido nucleico en cualquier lugar en el rango de dilución sin diluir a 2 veces.

25 En consecuencia, la divulgación proporciona un método para liberar ácido nucleico de una muestra biológica, lo que permite el análisis directo de ácido nucleico en un sistema microfluídico que comprende las etapas de

- poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior,
- procesar el lisado en un sistema microfluídico para el análisis de ácido nucleico, y
- 30 - analizar el ácido nucleico directamente en el lisado.

En particular, la divulgación proporciona un método para liberar ácidos nucleicos contenidos en una muestra biológica, comprendiendo el método la etapa de:

- poner en contacto la muestra biológica con una composición para convertir al menos parte de la muestra en un lisado que contiene dichos ácidos nucleicos, siendo dicho lisado directamente transportable a través de un sistema microfluídico;
- 35 - analizar el ácido nucleico contenido en el lisado dentro del sistema microfluídico.

En particular, la divulgación proporciona un método para liberar ácidos nucleicos contenidos en una muestra biológica, comprendiendo el método la etapa de:

- poner en contacto la muestra biológica con una composición para convertir al menos parte de la muestra en un lisado que contiene dichos ácidos nucleicos, siendo dicho lisado directamente transportable a través de un sistema microfluídico;
- 40 - analizar el ácido nucleico directamente en el lisado dentro del sistema microfluídico.

En consecuencia, la divulgación proporciona un método para analizar el ácido nucleico liberado de una muestra biológica en un sistema microfluídico, cuyo método incorpora las etapas de:

- 45 - poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico posterior,
- procesar el lisado en un sistema microfluídico para el análisis directo de ácido nucleico, y
- analizar el ácido nucleico directamente en el lisado.

Más en particular, la divulgación proporciona un método para analizar el ácido nucleico liberado de una muestra biológica en un sistema microfluídico, cuyo método incorpora las etapas de:

- 50 - en el sistema microfluídico, poner en contacto la muestra con una composición en condiciones para proporcionar un lisado compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo,
- procesar el lisado en dicho sistema microfluídico para el análisis directo de ácido nucleico, y
- analizar el ácido nucleico directamente en el lisado

55 "Ácido nucleico" (y el término equivalente "polinucleótido") tal como se usa en el presente documento, se refiere a un

polímero de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que comprende enlaces fosfodiéster entre subunidades de nucleótidos. Los ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, ADN genómico, ADNc, hnARN, ARNm, ARNr, ARNt, microARN, ácido nucleico fragmentado, ácido nucleico obtenido de orgánulos subcelulares como las mitocondrias, y ácido nucleico obtenido de microorganismos o virus que pueden estar presentes en una muestra o dentro de ella. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario, circular o lineal. Preferiblemente, el ácido nucleico se libera de una muestra biológica. El ácido nucleico está compuesto de ADN y ARN, y el ARN es preferiblemente ARN total. "Muestra o muestra biológica" pretende incluir una variedad de fuentes biológicas que contienen ácido nucleico y/o material celular. El ácido nucleico y/o el material celular provienen de células que se prueban para determinar si uno o más marcadores particulares están presentes. Las muestras incluidas son muestras de cultivos de células, microorganismos eucariotas o muestras de diagnóstico tales como fluido corporal, precipitado de fluidos corporales, muestra de lavado, aspiración con aguja fina, muestra de biopsia, muestra de tejido, células cancerosas, células de un paciente, células de un tejido o células cultivadas *in vitro* de un individuo que está sometido a ensayos y/o tratado por enfermedad o infección, o muestras forenses. Ejemplos no limitados de muestras de fluidos corporales incluyen sangre completa, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido linfático, suero, plasma, orina, quilo, heces, eyaculado, esputo, aspiración del pezón, saliva, muestra de hisopos, lavado o líquido de lavado y/o muestras de cepillado.

En determinadas realizaciones, la muestra es una muestra que ha sido tratada para su conservación y puede contener reticulación de sitios reactivos debido al tratamiento de fijación, una muestra en contacto con cera o embebida en cera, o una muestra de FFPE en forma de un corte de FFPE. Las muestras recién congeladas son muestras que se han endurecido y embebido en un medio criosolidificable, tal como un compuesto OCT. Los aspirados de aguja fina tal como se usan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, células que después de la centrifugación se han embebido en cera, con o sin tratamiento de fijación previa.

"Cera" se refiere a una composición utilizada en la técnica histoquímica para embeber muestras biológicas para análisis histoquímicos u otros, generalmente consiste en una mezcla compleja de hidrocarburos superiores que a menudo incluye ésteres o ácidos grasos superiores y glicoles superiores, y puede ser de origen mineral, natural o sintético.

La parafina es un ejemplo de cera más comúnmente utilizada en el campo histoquímico. El término "parafina" se usa como sinónimo de "alcano", indicando hidrocarburos con la fórmula general C_nH_{2n+2} . Tal como se usa en el presente documento, el término "parafina" incluye cera de parafina y medios de inclusión de tipo mezcla de parafina. La "cera de parafina" se refiere a una mezcla de alcanos que se encuentra dentro del intervalo de $20 \leq n \leq 40$. Las mezclas de parafina incluyen otros materiales que pueden mejorar las propiedades de la parafina en los procedimientos de embebido.

Los fijadores químicos preservan el tejido de la degradación y ayudan a mantener la estructura de las células y los componentes subcelulares. Las muestras biológicas embebidas generalmente se preservan o archivan en forma de muestras fijadas con formalina embebidas en parafina (muestras FFPE). "FFPE" se refiere a tejidos o células que han sido tratados por exposición a formalina tamponada neutra (generalmente formaldehído al 4 % en solución salina tamponada con fosfato) y posteriormente empapados completamente en una matriz hidrófoba tal como parafina o una mezcla de parafina para que la parafina o la mezcla de parafina se infiltre en los tejidos o en las células.

Como un ejemplo no limitante que se muestra en la sección de ejemplos, los métodos de la invención se ponen en práctica con éxito en muestras de melanoma. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la invención, la muestra es una muestra biológica de un individuo que está siendo estudiado por un estado biológico como una condición de salud, una enfermedad o una infección. Como alternativa, la muestra es de un individuo diagnosticado por un estado biológico pero en estudio para el pronóstico o la intervención terapéutica, como la selección del tratamiento o el resultado del tratamiento. En realizaciones particulares, el estado biológico es una enfermedad e implica un trastorno de neoplasia, en particular un tumor o un cáncer.

Un estado biológico, enfermedad, infección o una respuesta a la intervención terapéutica se puede evaluar con el uso de marcadores.

"Marcador", "Marcador de ensayo", "biomarcador" o "marcador biológico" es una característica que se mide objetivamente y se evalúa y se refiere a un componente celular específico de un estado biológico particular. El marcador puede ser un ácido nucleico o un componente proteico o partes del mismo. Preferiblemente, es un ácido nucleico, ADN o ARN.

En una realización, se pretende que los marcadores incluyan, entre otros, translocaciones, microsátélites, alelos, mutaciones, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones, eliminaciones, variantes de empalme, transposones, microARN, perfiles de expresión, etc. asociados con una enfermedad o infección. En algunas realizaciones, el ADN se utiliza para identificar SNP, inserciones, eliminaciones o translocaciones. En otras realizaciones, el ARN se usa para identificar los niveles de expresión. Los niveles de expresión pueden eventualmente vincularse a SNP u otras variaciones genéticas. La sección de ejemplos muestra que los métodos de la invención se usaron con éxito para detectar la presencia del gen BRAF. Existen ensayos específicos para detectar la presencia de variantes mutadas de este gen (p. ej., basado en Hamford et al., *Diagn Mol Pathol* 2011;20:158-165). En

consecuencia, en determinadas realizaciones, los marcadores son marcadores aplicables para el diagnóstico o el pronóstico de cáncer o enfermedad, para la predicción del resultado del tratamiento del cáncer o la enfermedad, para la selección de pacientes adecuados para el tratamiento, para la selección de los regímenes de tratamiento a utilizar, o para seleccionar el cambio de régimen de tratamiento. En determinadas realizaciones, los marcadores incluyen modificaciones de ácido nucleico asociadas con una enfermedad, preferiblemente mutaciones, SNP, inserciones, eliminaciones o translocaciones.

En los métodos de la presente invención, se pone en contacto una muestra con una composición para proporcionar un lisado en el que se libera ácido nucleico, cuya composición está optimizada para su uso en analizadores de microfluidos. La composición es transportable a través de un sistema microfluido. En determinadas realizaciones de los métodos suministrados, dicha etapa de contacto puede implementarse en el propio sistema microfluido o, como alternativa, puede requerir un pipeteo manual por parte de un investigador antes del análisis del sistema microfluido. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el sistema microfluido puede aceptar la muestra y procesar la muestra utilizando los métodos de la invención antes del análisis. En determinadas realizaciones, el sistema aceptará y analizará el lisado preparado de antemano.

Por "poner en contacto" se entiende unir, exponer, incubar o mezclar la muestra y la composición.

Los métodos de la invención incluyen combinaciones de métodos físicos inventivos (calor, HiFu, ...) y bioquímicos (enzimas, sales, agentes reductores, ...) métodos y composiciones que trabajan juntos para mejorar la sensibilidad y la precisión de la determinación de ácidos nucleicos. Como se muestra en la sección de ejemplos, someter la composición a calentamiento y HIFU proporciona una capacidad emulsionante mejorada en comparación con una composición sometida a calentamiento en combinación con removimiento o agitación. En particular, temperaturas de calentamiento de alrededor de 60 °C (p. ej., 60 °C ± 1 °C; 60 °C ± 2 °C, 60 °C ± 3 °C, 60 °C ± 4 °C, 60 °C ± 5 °C) dan un efecto emulsionante deseado. En realizaciones preferidas, la temperatura se eleva paso a paso desde la temperatura ambiente hasta 60 °C, seguido del tratamiento con HIFU. Preferiblemente, la potencia del HIFU no excede los 2,25 W.

"Liberación" se refiere a liberar, obtener y/o revertir la reticulación. Para liberar ácido nucleico de una muestra, la actividad proteasa y el tamponamiento del pH pueden ser necesarios a partir de la composición. La liberación puede requerir una posible actividad de precipitación de los componentes de la composición que no sean el ácido nucleico presente en la muestra investigada y la eliminación/disolución del fijador. La liberación puede requerir condiciones tales como calentamiento o ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU). El ácido nucleico obtenido de las muestras de FFPE normalmente contiene enlaces cruzados de nucleótido a nucleótido y de nucleótido a proteína, modificaciones de bases y otras modificaciones químicas que afectan la integridad del ácido nucleico.

En una realización, el lisado y/o los componentes liberados de la muestra se procesarán en analizadores de diagnóstico microfabricados utilizando sistemas microfluidicos. "Sistema microfluido" se refiere a los sistemas que se ocupan del comportamiento, control preciso y manipulación de fluidos que están restringidos geométricamente a una pequeña escala, típicamente submilimétrica. Los fluidos de volumen pequeño se mueven, se mezclan, se separan o se procesan de otra manera a microescala que requiere un tamaño pequeño y bajo consumo de energía. Los sistemas microfluidicos incluyen estructuras tales como sistemas de microneumáticos, es decir, microsistemas para el manejo de fluidos fuera de la microplaca (fuentes de presión, bombas de líquido, microválvulas, etc...) y estructuras microfluidicas para el manejo en microplaca de volúmenes de microlitros, nanolitros y picolitros (canales microfluidicos, etc.). Los sistemas microfluidicos tienen como objetivo integrar operaciones de ensayo como la detección, así como el pretratamiento de muestras y la preparación de muestras en un sistema. Los dispositivos y los métodos para realizar análisis microfluidicos pueden incorporar biochips basados en una micromatriz de ADN o una micromatriz de proteínas, y/o dispositivos para realizar ciclos térmicos (p. ej., PCR, LCR y otros) y/o dispositivos para secuenciación. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el sistema microfluido incorporará sistemas de análisis microfabricados, lo que requiere manipulación de la muestra y el tampón de licuefacción fuera del sistema. En realizaciones preferidas, el sistema microfluido integrará las etapas para proporcionar un lisado tal como se describe en los métodos de la presente invención, y será un sistema completamente integrado que complete un ensayo desde la muestra hasta el resultado. En términos de análisis de ácido nucleico, por lo tanto, el sistema microfluido puede ser un microsistema integrado que implementa simultáneamente la preparación y liberación de ácido nucleico, así como el análisis de marcadores que incluye la amplificación y detección de objetivos. En particular, el método de la presente invención comprende las etapas de: poner en contacto la muestra biológica con una composición para convertir al menos parte de la muestra en un lisado que contiene dichos ácidos nucleicos dentro de un sistema microfluido, siendo dicho lisado transportable directamente a través del sistema microfluido, y analizar el ácido nucleico directamente en el lisado dentro del sistema microfluido. En consecuencia, el lisado producido de acuerdo con los métodos de la invención debería ser transportable directamente a través de un sistema microfluido.

Se han descrito microsistemas adecuados en los documentos EP1896180, EP1904234 y EP2419705 y, por consiguiente, se incorporan en determinadas realizaciones que describen la presente invención. Preferiblemente, se utilizan sistemas basados en cartuchos que contienen una o más cámaras de reacción y una o más cámaras de fluido. Algunas de las cámaras de fluido pueden contener fluido que se usa para producir lisado a partir de la muestra. Otras cámaras pueden contener fluidos, como fluidos de lavado y soluciones de amplificación. Las cámaras de reacción se utilizan para realizar las diferentes etapas de la detección, tales como el lavado, la lisis y la amplificación.

En realizaciones preferidas que describen la presente invención, todos los reactivos necesarios para realizar un ensayo se colocan previamente dentro del dispositivo microfluídico de modo que el dispositivo es un aparato desechable autónomo para realizar ensayos de ácido nucleico. Los medios adecuados incluyen biochips basados en una micromatriz de ADN o una micromatriz de proteínas, y/o dispositivos para realizar ciclos térmicos (p. ej., PCR, LCR y otros) y/o medios para la secuenciación. Preferiblemente, El sistema microfluídico incorporará medios para realizar ciclos térmicos, preferiblemente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Los métodos de PCR son bien conocidos en la técnica y se basan en ciclos térmicos, que consisten en ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento de la reacción para la fusión del ácido nucleico y la replicación enzimática del ácido nucleico. Dichas reacciones de amplificación emplean típicamente ácido nucleico diana y componentes de reacción tales como una ADN polimerasa termoestable (p. ej., la Taq polimerasa), nucleótidos y oligonucleótidos (p. ej., cebadores, sondas, bloqueadores,...) requeridos para el inicio de la síntesis de ácido nucleico. En aplicaciones preferidas, el microsistema aplicará ciclos térmicos utilizando reactivos en forma seca presentes en el dispositivo microfluídico. La muestra se tratará como se describe en la presente invención para formar un lisado y los reactivos previamente posicionados en el dispositivo microfluídico se reconstituyen en el punto de prueba por el lisado. En consecuencia, el lisado permite el análisis de ácido nucleico aguas abajo directamente en el lisado. Normalmente, se utilizan controladores microneumáticos para dirigir el lisado y los reactivos según sea necesario para completar el ensayo. Los ensayos pueden incluir detección de punto final o en tiempo real, ambos métodos son bien conocidos en la técnica.

La terminología relacionada con la PCR tal como se usa en la sección de ejemplos:

"Cq" se refiere al ciclo de cuantificación, el número de ciclo fraccional donde la fluorescencia aumenta por encima del umbral. También se conoce como Ct (ciclo umbral, por sus siglas en inglés).

"Umbral" se refiere al nivel arbitrario de fluorescencia utilizado para la determinación del Cq y debe establecerse por encima del nivel inicial y dentro de la fase de crecimiento exponencial del gráfico de amplificación.

"Nivel inicial" se refiere a los ciclos iniciales de PCR en donde hay poco o ningún cambio en la fluorescencia.

"Gráfico de amplificación" se refiere a un gráfico de señal fluorescente frente al número de ciclo.

"UFR o unidad de fluorescencia relativa" es una unidad de medida utilizada en el análisis que emplea la detección de fluorescencia.

También es un aspecto de la presente descripción proporcionar composiciones para liberar ácido nucleico de una muestra biológica que permita el análisis directo de ácido nucleico en un sistema microfluídico, cuyas composiciones comprenden un tensioactivo compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo. Preferiblemente, la composición cuando se pone en contacto con una muestra proporcionará un lisado, qué lisado en su forma no diluida permite el análisis de ácido nucleico aguas abajo directamente en el lisado, y qué lisado es compatible con los sistemas de análisis de ácido nucleico aguas abajo. De manera importante, el lisado debe ser transportable directamente a través de un sistema microfluídico. La composición como se describe en el presente documento tiene actividad emulsionante e incluye al menos un tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico. Preferiblemente, el lisado está en forma no diluida o en una forma diluida menor.

Una "emulsión" es una mezcla de dos o más líquidos que normalmente son inmiscibles (no mezclables o no combinables). Un emulsionante (también conocido como "emulgente") es una sustancia que estabiliza una emulsión al aumentar su estabilidad cinética. Una clase de emulsionantes se conoce como "sustancias tensioactivas" o tensioactivos.

"Tensioactivo" como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que reduce la tensión superficial de un líquido, la tensión interfacial entre dos líquidos, o la que existe entre un líquido y un sólido. Estos agentes tensioactivos generalmente comprenden una porción hidrófoba y una porción hidrófila. Los tensioactivos pueden, entre otros, actuar como emulsionantes. Los tensioactivos pueden clasificarse como aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos o catiónicos, dependiendo de si comprenden uno o más grupos cargados.

Los tensioactivos no iónicos contienen grupos polares sin carga y no tienen carga. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos son: BigCHAP (es decir, N,N-bis[3-(D-gluconamido)propil]colamida); bis(polietilenglicol bispimidazoil carbonilo); alcoholes de polioxietileno, tales como Brij(R) 30 (polioxietileno(4)lauriléter), Brij(R) 35 (polioxietileno(23)lauriléter), Brij(R) 35P, Brij (R) 52 (polioxietileno 2 cetiléter), Brij (R) 56 (polioxietileno 10 cetiléter), Brij (R) 58 (polioxietileno 20 cetiléter), Brij (R) 72 (polioxietileno 2 esteariléter), Brij (R) 76 (polioxietileno 10 esteariléter), Brij (R) 78 (polioxietileno 20 esteariléter), Brij(R) 78P, Brij(R) (92) (polioxietileno 2 oleiléter); Brij (R) 92V (polioxietileno 2 oleiléter), Brij(R) 96V, Brij(R) 97 (polioxietileno 10 oleiléter), Brij(R) 98 (polioxietileno(20)oleiléter), Brij(R) 58P y Brij(R) 700 (polioxietileno (I OO) esteariléter); Cremofor(R)EL (es decir, polioxietilenglicerolcinooleato 35; aceite de ricino polioxil 35); decaetilenglicol monododeciléter; decaetilenglicol monohexadeciléter; decaetilenglicol monotrideciléter; N-decanoil-N-metilglucamina; n-decil [alfa]-D-glucopiranosido; decil [beta]-D-maltopiranosido; digitonina; n-dodecanoil-N-metilglucamina; n-dodecil [alfa]-D-maltosido; n-dodecil [beta]-D-maltosido; heptaetilenglicol monododeciléter; heptaetilenglicol monododeciléter; heptaetilenglicol monotetradeciléter; n-hexadecyl [beta]-D-maltosido; hexaetilenglicol monododeciléter; hexaetilenglicol monohexadeciléter; hexaetilenglicol monooctadeciléter; hexaetilenglicol monotetradeciléter; Igepal(R) CA-630 (es decir, nonilfenil-polietilenglicol, (octilfenoxi)polietoxietanol, octilfenil-polietilenglicol); metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-[alfa]-D-glucopiranosido; nonaetilenglicol monododeciléter; N-nonanoil-N-metilglucamina; octaetilenglicol monododeciléter; octaetilenglicol monododeciléter; octaetilenglicol monohexadeciléter; octaetilenglicol monooctadeciléter; octaetilenglicol monotetradeciléter; octil-[beta]-D-

glucopiranosido; pentaetilenglicol monodeciléter; pentaetilenglicol monododecil éter; pentaetilenglicol monohexadeciléter; pentaetilenglicol monohexiléter; pentaetilenglicol mono-octadeciléter; pentaetilenglicol mono-octiléter; polietilenglicol diglicidiléter; éter de polietilenglicol W-1; polioxietilen 10 trideciléter; polioxietilen 100 estearato; polioxietilen 20 isohexadeciléter; polioxietilen 20 oleiléter; polioxietilen 40 estearato; polioxietilen 50 estearato; polioxietilen 8 estearato; polioxietilen bis(imidazolil carbonilo); polioxietilen 25 propilenglicol estearato; saponina de corteza de quillaja; ésteres de ácido graso de sorbitán, tales como Span(R) 20 (monolaurato de sorbitán), Span (R) 40 (monopalmitato de sorbitán), Span (R) 60 (monoestearato de sorbitán), Span (R) 65 (tristearato de sorbitán), Span (R) 80 (monooleato de sorbitán) y Span (R) 85 (trioleato de sorbitán); diversos alquiléteres de polietilenglicoles, tales como Tergitol(R) Tipo 15-S-12, Tergitol(R) Tipo 15-S-30, Tergitol(R) Tipo 15-S-5, Tergitol(R) Tipo 15-S-7, Tergitol(R) Tipo 15-S-9, Tergitol (R) Tipo NP-10 (etoxilato de nonilfenol), Tergitol(R) Tipo NP-4, Tergitol(R) Tipo NP-40, Tergitol(R) Tipo NP-7, Tergitol (R) Tipo NP-9 (nonilfenol polietilenglicoléter), Tergitol (R) MIN ESPUMA 1 x, Tergitol (R) MIN ESPUMA 2x, Tergitol (R) Tipo TMN-10 (polietilenglicol timetilnoniléter), Tergitol (R) Tipo TMN-6 (polietilenglicol timetilnoniléter), Triton(R) 770, Triton(R) CF-10 (bencil-polietilenglicol *terc*-octilfeniléter), Triton(R) CF-21, Triton(R) CF-32, Triton(R) DF-12, Triton(R) DF-16, Triton(R) GR-5M, Triton(R) N-42, Triton(R) N-57, Triton(R) N-60, Triton(R) N-101 (es decir, polietilenglicol nonilfeniléter; polioxietilen nonilfenil éter ramificado), Triton(R) QS-15, Triton(R) QS-44, Triton(R) RW-75 (es decir, polietilenglicol 260 mono(hexadecil/octadecil) éter y 1-octadecanol), Triton (R) S P-135, Triton(R) SP-190, Triton(R) W-30, Triton(R) X-15, Triton (R) X-45 (es decir, polietilenglicol 4-*terc*-octilfeniléter; 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton(R) X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol; polietilenglicol *terc*-octilfeniléter; 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton(R) X-102, Triton(R) X-1 14 (polietilenglicol *terc*-octilfeniléter; (1, 1, 3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton(R) X-165, Triton(R) X-305, Triton (R) X-405 (es decir, polioxietilen(40) isooctiliciclohexiléter; polietilenglicol *terc*-octilfeniléter), Triton(R) X-705-70, Triton(R) X-151, Triton(R) X-200, Triton(R) X-207, Triton(R) X-301, Triton(R) XL-80N y Triton(R) XQS-20; tetradecil-[beta]-D-maltosido; tetraetilenglicol monodeciléter; tetraetilenglicol monododeciléter; tetraetilenglicol monotetradeciléter; trietilenglicol monodeciléter; etilenglicol monododeciléter; trietilenglicol monohexadeciléter; trietilenglicol mono-octiléter; trietilenglicol monotetradeciléter; derivados de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, como TWEEN® 20 (monolaurato de polietilenglicol sorbitán), TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN® 21 (monolaurato de polioxietileno (4) sorbitán), TWEEN® 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN® 60 (monoestearato de polietilenglicol sorbitán; monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN® 61 (monoestearato de polioxietileno (4) sorbitán), TWEEN® 65 (estearato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN® 80 (monooleato de polietilenglicol sorbitán; monooleato de polioxietilen (20) sorbitán), TWEEN® 81 (monooleato de polioxietileno (5) sorbitán) y TWEEN® 85 (trioleato de polioxietileno (20) sorbitán); tiloxapol; n-undecil [beta]-D-glucopiranosido, MEGA-8 (octanoil-N-metilglucamida); MEGA-9 (nonanoil-N-metilglucamida); MEGA-10 (decanoil-N-metilglucamida); metilheptilcarbamoil glucopiranosido; octil-glucopiranosido; octil-tioglucoipiranosido; octil-[beta]-tioglucoipiranosido; y varias combinaciones de los mismos.

Como se muestra en la sección de ejemplos, el tratamiento de la muestra con una composición que comprende un tensioactivo no iónico tal como éteres de poliglicol que tienen la fórmula de R-O-(CH₂CH₂O)_nH en donde el número de óxidos de etileno es superior a 7 (n > 7), conduce a lisados listos para el termociclado sin requerir una etapa separada de aislamiento de ácido nucleico.

En realizaciones preferidas, el tensioactivo no iónico es un éter PEG de alcohol graso C_x que tiene la fórmula R-O-(CH₂CH₂O)_nH en donde n=8; y R es CH₃(CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₈ (oleilo o *cis*-9-octadeceno); o R es (CH₂)₁₀-CH-(CH₃)₂.

El tensioactivo no iónico puede ser lineal o tener una estructura ramificada. El tensioactivo no iónico puede estar en forma líquida o sólida a temperatura ambiente.

En realizaciones preferidas, el tensioactivo no iónico es un éter de PEG de alcohol graso C₁₃; un éter PEG de alcohol iso-tridecilo graso; o un éter PEG de alcohol graso oleílico que tiene 8 restos de óxido de etileno

Lo más preferiblemente, el tensioactivo no iónico es Genapol® X-080 en donde R es (CH₂)₁₀-CH-(CH₃)₂ y n es 8.

Lo más preferiblemente, el tensioactivo no iónico es Oleth®-8 y R es CH₃(CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₈ y n es 8.

Genapol® X-080 es un producto químico comercializado por Sigma-Aldrich® y su número del Chemical Abstract Service (número CAS) es 9043-30-5. Oleth®-8 se corresponde con (Z)-3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxadotetracont-33-en-1-ol (número CAS 27040-03-5).

Como se muestra en la sección de ejemplos, la composición de licuefacción comprende Oleth®-8. El tensioactivo no iónico está presente entre aproximadamente el 0,10 y aproximadamente el 0,40 %, entre aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,35 %, entre aproximadamente el 0,20 y aproximadamente el 0,30 %, aproximadamente el 0,25 %, o el 0,25 %. Debido a que las soluciones madre de Oleth®-8 generalmente se hacen en DMSO (50% p/v), una de las composiciones preferidas además contiene DMSO. El DMSO está, por lo tanto, presente en una cantidad relativa a la cantidad de Oleth®-8 presente en la composición. En caso de que el tensioactivo no iónico esté presente en aproximadamente el 0,35 %, o 0,25 %, entonces el DMSO está presente en aproximadamente el 0,35 % o el 0,25 %.

Los métodos de licuefacción convencionales incorporan disolventes orgánicos en su composición de licuefacción o usan disolventes orgánicos para permitir tales aplicaciones posteriores. Como ya se mencionó, esto es particularmente cierto en los métodos para aislar componentes tales como ácidos nucleicos de muestras embebidas en cera (p. ej., xileno para disolver parafina). Los métodos de la presente invención tienen la ventaja de que requieren disolventes orgánicos y los métodos actuales que incorporan el tensioactivo no iónico permiten la eliminación automática de cera embebida y la liberación de los componentes sin el uso de disolventes orgánicos. Esto es particularmente beneficioso porque coloca a los ácidos nucleicos liberados en una condición y entorno que interactúa con aplicaciones de menor escala que requieren actividad enzimática, como el procesamiento de amplificación de menor escala. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la composición de licuefacción no contiene disolventes orgánicos. En realizaciones preferidas, sumergir un corte embebido en cera en un tampón de licuefacción realiza la licuefacción. Normalmente, el área de muestra total incluye parafina y varía entre aproximadamente 20 cm² y aproximadamente 1 mm². p. ej., un área de muestra total de 20 cm² puede dar como resultado 5 cortes de 4 cm². Normalmente, la cantidad de corte embebido en cera varía entre aproximadamente 50 µm y aproximadamente 3 µm, entre aproximadamente 40 µm y aproximadamente 3 µm, entre aproximadamente 30 µm y aproximadamente 3 µm, entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 3 µm, entre aproximadamente 15 µm y aproximadamente 5 µm, entre aproximadamente 13 µm y aproximadamente 5 µm, entre aproximadamente 12 µm y aproximadamente 5 µm, entre aproximadamente 11 µm y aproximadamente 5 µm, aproximadamente 10 µm a aproximadamente 5 µm, 10 µm, 9 µm, 8 µm, 7 µm, 6 µm o 5 µm. Normalmente, se licua un corte en un volumen de composición de licuefacción que varía de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 µl, de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 250 µl, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 µl. Preferiblemente, el corte se licua en aproximadamente 1 ml, 900 µl, 800 µl, 700 µl o 600 µl de la composición de licuefacción. Más preferiblemente, el corte se licua en aproximadamente 1 ml, 900 µl, 800 µl, 700 µl, 600 µl, 500 µl, 400 µl, 300 µl o 200 µl de la composición de licuefacción.

En determinadas realizaciones, la composición contiene además una enzima proteolítica. Las proteasas también se conocen como proteinasas, son enzimas proteolíticas y están involucradas en la digestión de proteínas. En realizaciones preferidas, la proteasa es una proteasa termoestable que se puede calentar a temperaturas moderadas sin perder eficacia, como la proteinasa K. Otros ejemplos de proteasas termoestables, diseñados o de origen natural son bien conocidos en la técnica. La concentración de la proteasa en la composición está entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5000 µg/ml, entre aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 4000 µg/ml, entre aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 3000 µg/ml, entre aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 2000 µg/ml. Preferiblemente está entre aproximadamente 500 µg/ml y aproximadamente 1500 µg/ml, entre aproximadamente 600 µg/ml a aproximadamente 1400 µg/ml, entre aproximadamente 800 µg/ml a aproximadamente 1200 µg/ml, entre aproximadamente 900 µg/ml a aproximadamente 1100 µg/ml, entre aproximadamente 950 µg/ml a aproximadamente 1050 µg/ml o es aproximadamente 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500 µg/ml o cualquier intervalo en el mismo. En una realización preferida, la concentración de la proteasa en la composición es de aproximadamente 1000 µg/ml o 1000 µg/ml. La amplificación del ácido nucleico se realiza después de la inactivación de la proteasa. Por lo tanto, el análisis directo del ácido nucleico puede incluir una etapa de inactivación de la proteasa.

Una forma de mejorar los resultados de las pruebas es aumentar la señal obtenida de una muestra dada. Se puede obtener una señal aumentada, entre otros, aumentando la accesibilidad del objetivo. La implementación de ciertas condiciones como, p. ej., calentamiento por temperatura, HIFU, el tiempo de exposición, la mezcla y el tamponamiento pueden mejorar la calidad del lisado emulsionado y la liberación de las moléculas diana.

La composición de licuefacción para liberar ácidos nucleicos de una muestra requiere calentamiento. Las condiciones adecuadas para generar un lisado emulsionado requieren incubar la composición de licuefacción a una temperatura adecuada para liberar ácido nucleico de la muestra biológica. Los factores que influyen en el tiempo de solubilización incluyen temperatura, espesor de la sección de muestra y composición de la cera. La incubación en los métodos de la presente invención es adecuada para un tiempo y temperatura para liberar el ácido nucleico deseado de la muestra en una cantidad y concentración adecuadas para el análisis pretendido. La incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía desde la temperatura ambiente (20 °C) hasta aproximadamente 99 °C. En determinadas realizaciones, la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 99 °C, de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 95 °C, de aproximadamente 52 °C a aproximadamente 90 °C, de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 80 °C, de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. Preferiblemente, la incubación está a una temperatura de 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C o 65 °C. La temperatura inicial puede estar seguida por una temperatura más alta para inactivar la función enzimática (p. ej., de la enzima proteolítica) presente en la composición. Las temperaturas de inactivación típicas varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 99 °C, de aproximadamente 92 °C a aproximadamente 97 °C. Preferiblemente, la temperatura de inactivación es de aproximadamente 95 °C.

Normalmente, la muestra embebida en cera se pone en contacto con la composición de licuefacción como se describe en el presente documento durante un tiempo suficiente para solubilizar todo o parte de la muestra embebida en cera. Se obtuvieron buenos resultados con tiempos de incubación que varían de aproximadamente 2 min a aproximadamente 20 min. Para los ejemplos descritos, la licuefacción se realizó sumergiendo un corte de FFPE de 10 µm en 1 ml de composición de licuefacción, seguido de calentamiento durante 20 min a 60 °C y 10 min a 95 °C. Como se muestra en la sección de ejemplos, el ADN liberado en el lisado emulsionado era adecuado para el análisis microfluídico directo sin requerir extracciones de xileno o etanol de la parafina y/o de ácidos nucleicos.

Los métodos convencionales para mezclar y calentar la muestra y la composición de licuefacción son bien conocidos en la técnica. Para aplicaciones y procesamiento de volumen más pequeño en analizadores microfabricados, puede ser beneficioso aplicar ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU, o a veces también abreviado como FUS) para calentar y microcavitarse las muestras. En determinadas realizaciones, el HIFU se aplica para calentar o después de una etapa de calentamiento. En realizaciones preferidas, la potencia de HIFU varía de aproximadamente 2 vatios a aproximadamente 15 vatios, de aproximadamente 6 vatios a aproximadamente 9 vatios. Preferiblemente, la potencia de HIFU es de entre 2 vatios a 10 vatios, o cualquier intervalo en el mismo. Lo más preferiblemente, la potencia de HIFU es de 4 vatios, o cualquier valor inferior al mismo. Preferiblemente, la potencia de HIFU es 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75 o 4 vatios y se aplica durante 5 a 20 minutos.

En determinadas realizaciones, la composición tiene capacidades de tamponamiento que oscilan entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 10, entre aproximadamente pH 7 y aproximadamente pH 9. Normalmente, la composición tal como se describe en el presente documento comprende Tris 10 mM a pH 8.

El tratamiento de la muestra con la composición en los métodos de la invención dará como resultado un lisado.

Es un requisito en algunas de las realizaciones de la presente invención que el lisado, tanto si es un lisado emulsionado como si no, que comprende el tensioactivo no iónico es compatible con el análisis de ácido nucleico posterior. En consecuencia, el procesamiento posterior puede requerir una dilución adecuada de las composiciones (p. ej., composición de licuefacción, lisado emulsionado) que contienen el tensioactivo no iónico. Los factores de dilución adecuados varían de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 2 veces, 4 veces a aproximadamente 4 veces a aproximadamente 2 veces, o cualquier rango en el mismo. Preferiblemente, la composición se diluye aproximadamente 3 veces. En una realización preferida, el lisado resultante del contacto de la composición con la muestra se usa en forma no diluida para un procesamiento y análisis de ácido nucleico posterior. En una realización preferida adicional, la composición se diluye aproximadamente 2 veces.

La causa más común de fallo en la amplificación es la inhibición de la amplificación, en donde uno o más componentes indeseables de una muestra que se está analizando no se eliminan suficientemente durante la purificación de ácido nucleico. La melanina contenida en las células pigmentarias en una variedad de tejidos copurifica con ácido nucleico en procedimientos convencionales de ADN y ARN y su presencia tiene un efecto inhibitorio sobre la PCR, sobre la RT-PCR o sobre otros métodos de análisis de ácido nucleico posteriores. Este problema puede evitarse separando la melanina del ácido nucleico mediante, p. ej., cromatografía en columna, filtración, precipitación de ácido nucleico, adición de BSA, o mediante el uso de una polimerasa que es menos susceptible a un inhibidor. Tal como se muestra en la sección de ejemplos de la presente invención, el problema se resuelve proporcionando composiciones de licuefacción adecuadas que contienen un tensioactivo no iónico que impide la inhibición de la amplificación por melanina. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la composición de licuefacción requiere un tensioactivo no iónico que evite la inhibición de la amplificación por melanina. El tensioactivo no iónico puede prevenir adicionalmente la inhibición de la amplificación por inhibidores tales como, pero sin limitación, hemoglobina, hemo, mioglobina, inmunoglobina, lactoferrina, alquitrán o colágeno, por ejemplo.

Por lo tanto, el lisado puede procesarse directamente para el análisis de ácido nucleico sin requerir la purificación de los ácidos nucleicos liberados presentes en el lisado. Sin embargo, aunque no necesariamente se requiera, partes o la totalidad del lisado pueden someterse a un procedimiento para la extracción o el aislamiento de ácido nucleico. Esto puede parecer ventajoso en ciertas configuraciones de ensayo. Los métodos aplicables para la extracción de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada son solo ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso de los términos "incluyendo", "Incluye" o "incluido" no es limitante.

Los títulos de las secciones son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

Ejemplos

Ejemplo 1. Método de licuefacción para la liberación de ácido nucleico de muestras FFPE.

Se pusieron en contacto muestras FFPE humanas con una composición de licuefacción para proporcionar un lisado emulsionado en el que se libera el ácido nucleico. La composición contiene aditivos que permiten la emulsificación de la parafina de manera que la digestión de la muestra de tejido se produce en presencia de parafina. La composición es un tampón de licuefacción que comprende un detergente no iónico. La composición de licuefacción consiste en Tris 10 mM a pH 8, Oleth®-8 al 0,25 % y 1 mg/ml de proteinasa K. Debido a que las soluciones madre de Oleth®-8 están hechas en DMSO (50 % p/v), la composición además contiene DMSO al 0,25 %. Se obtuvieron buenos resultados de licuefacción con condiciones de calentamiento aplicadas que varían entre 55 °C y 65 °C y tiempos de incubación que varían entre 2 min y 20 min. Para los ejemplos descritos, la licuefacción se realizó sumergiendo un corte de FFPE de 10 µm en 1 ml de composición de licuefacción, seguido de calentamiento durante 20 min a 60 °C y 10 min a 95 °C. Como se muestra en los ejemplos adicionales, el ADN liberado en el lisado emulsionado era adecuado para el análisis

microfluídico directo sin requerir extracciones de xileno o de etanol de la parafina.

Ejemplo 2. Comparación del rendimiento de ADN entre licuefacción y extracción basada en columnas

5 Se compararon los rendimientos de ADN de cortes de FFPE de 10 µm obtenidos mediante un método de extracción basado en columna y el procedimiento de licuefacción descrito. La extracción de ADN basada en columnas se realizó usando el kit de tejido Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la elución, el volumen de ADN extraído se ajustó a 1 ml para permitir la comparación con el ADN licuado. La concentración de ADN se midió usando el kit de ensayo Qubit dsDNA BR en el fluorómetro Qubit 2.0 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El Cq delta (Lic - Extr) representa la diferencia en Cq entre el ADN licuado y el extraído en columna; los valores de Cq se obtuvieron realizando una reacción qPCR basada en TaqMan® para el gen BRAF de tipo silvestre basado en Hamfjord et al (Diagn Mol Pathol 2011; 20: 158-165). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Rendimientos de ADN y Δ Cq (Lic-Extr)

ID de la muestra	Rendimiento de ADN de la licuefacción de 1 corte de FFPE (ng)	Rendimiento de ADN de la extracción de 1 corte de FFPE (ng)	Δ Cq (Lic-Extr)
Muestra 1	4548	1069	2,4
Muestra 2	824	77	-1,0
Muestra 3	6620	852	3,3
Muestra 4	2788	877	1,4
Muestra 5	2416	555	2,4
Muestra 6	5140	542	2,6
Muestra 7	1756	885	1,6
Muestra 8	1020	125	2,2
Muestra 9	1160	65	1,8
Muestra 10	3640	1300	0,8
Muestra 11	1168	45	3,6
Muestra 12	3336	508	1,3
Muestra 13	12788	442	1,0
Muestra 14	2144	1051	1,0
Muestra 15	460	75	2,1
Muestra 16	2212	1013	1,8
Muestra 17	2664	1481	1,1
Muestra 18	23120	95	4,0
Muestra 19	1848	789	1,4
Muestra 20	14160	190	4,1
Muestra 21	5224	409	3,2
Muestra 22	3796	388	2,0
Muestra 23	2936	696	1,9

15 Tal como se muestra en la Tabla 1, para todas las muestras, los rendimientos de ADN fueron mayores con el método de licuefacción, excepto para la muestra 2, donde el rendimiento de ADN tras el método de extracción fue mayor en comparación con el rendimiento de ADN tras el método de licuefacción actual. Asimismo, como se muestra en la columna de la derecha de la tabla 1, la diferencia en el valor de Cq entre el ADN obtenido por licuefacción y la extracción basada en columnas indica que se pueden amplificar más copias del ADN diana en la condición de licuefacción. De acuerdo con los resultados de cuantificación de ADN, solo la muestra 2 mostró un valor negativo de ΔCq, correspondiente a ADN menos amplificable en este corte licuado.

Ejemplo 3. Funcionalidad de qPCR de ADN usando métodos comerciales de licuefacción.

25 La funcionalidad de qPCR del ADN liberado en el presente lisado emulsionado y en una composición de licuefacción disponible comercialmente, solución de extracción de ADN QuickExtract™ FFPE (Epicentro, Madison, Wisconsin) fue comparada. La licuefacción de cortes de FFPE de 10 µm y el posterior análisis de qPCR se realizaron como se describe en el ejemplo anterior. El volumen de la composición de licuefacción comercial (Solución de extracción de ADN FFPE Epicenter QuickExtract™ FFPE) se ajustó para permitir una comparación 1:1 con la presente composición de licuefacción. El lisado licuado resultante se usó como material de entrada para la qPCR; las reacciones se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl utilizando una reacción de detección basada en TaqMan® para el gen BRAF de

tipo silvestre basada en Hamfjord et al (Diagn Mol Pathol 2011; 20: 158-165)

La Figura 1 visualiza los resultados de la amplificación en el ADN liberado de una muestra de FFPE en el lisado emulsionado que contiene el detergente Oleth®-8 (gris) y en el ADN liberado de la muestra de FFPE en la composición de licuefacción comercial (negro). Las curvas marcadas con cruces representan la amplificación en muestras de lisado emulsionado casi sin diluir (20 µl /5 µl, mezcla de molde/PCR), las curvas marcadas con círculos representan la amplificación en muestras de lisado emulsionado diluido 4 veces. Bajo la condición de molde al 80 %, la composición de licuefacción comercial inhibe completamente la PCR y, por lo tanto, se requirió una dilución adicional de 4 veces para permitir el análisis de qPCR. En cambio, la presente composición de licuefacción que contiene el detergente Oleth®-8 es compatible con el análisis de PCR directo posterior, lo que permite que se use más molde de ADN (mayor número de copias) en la PCR y, por lo tanto, mejorando la sensibilidad del análisis de PCR.

Ejemplo 4. Funcionalidad de las composiciones de licuefacción en un sistema microfluídico

Se exploró la funcionalidad de las diversas composiciones de licuefacción en el procesamiento del sistema microfluídico.

La licuefacción de 3 muestras de FFPE diferentes se realizó usando 4 tampones diferentes (con/sin detergente y con/sin proteinasa K), usando cortes consecutivos de FFPE de 10 µm para cada condición. La licuefacción y el procesamiento por PCR de la muestra se realizó en un sistema microfluídico tal como se describe en los documentos EP1896180, EP1904234 y EP2419705. Las muestras se licuaron en 1 ml de la composición de licuefacción y se calentaron usando las condiciones mencionadas anteriormente. La mezcla licuada resultante se usó sin diluir como material de entrada para la qPCR usando las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente. El ADN amplificable se evaluó mediante qPCR para el gen BRAF de tipo silvestre en la mezcla licuada probada.

La Tabla 2 resume los valores de ΔCq obtenidos para las composiciones que contienen el detergente en relación con las composiciones de referencia que omiten el detergente. En el contexto de una ruta microfluídica en el cartucho microfluídico, agregar un detergente como Oleth®-8 a la composición de licuefacción disminuye el valor de Cq con un promedio de 3,8, lo que indica una liberación mejorada de ADN en comparación con la composición de referencia sin detergente. Agregar proteinasa K mejora aún más el valor de Cq con un promedio de 1,5. Por lo tanto, Hay una mejora en la liberación de ADN de las 3 muestras de FFPE al agregar un detergente a la composición de licuefacción.

Tabla 2.

ΔCq (Media ± DT)	Composición
referencia	Tris
3,8±1,4	Tris + Oleth®-8
referencia	Tris + protK
5,3±4,1	Tris + protK + Oleth®-8

También se probó la funcionalidad de un tampón de licuefacción disponible comercialmente solución de extracción de ADN de FFPE QuickExtract™ (Epicentro, Madison, Wisconsin) en el sistema microfluídico. El bombeo del tampón de licuefacción comercial a través de la ruta microfluídica del cartucho microfluídico hacia las 5 cámaras de PCR produjo de forma reproducible la formación de burbujas de aire (Figura 2, cámara de PCR en círculo). Deben evitarse tales burbujas de aire porque perjudican el análisis de qPCR después del llenado de la cámara de PCR. En cambio, no se observaron burbujas de aire cuando el tampón de licuefacción que contiene Oleth®-8 se transfirió a la cámara de PCR, lo que indica que las propiedades fisicoquímicas de Oleth®-8 son compatibles con la microfluídica del cartucho.

Ejemplo 5. Funcionalidad de las composiciones de licuefacción en presencia de inhibidores de PCR

Se comparó el rendimiento en muestras que contenían cantidades variables del conocido inhibidor de PCR melanina después de la extracción o licuefacción de ADN. 1 corte de FFPE por muestra i) se licuó en 800 µl de la composición de licuefacción que contiene Oleth®-8 o ii) se licuó en la composición de licuefacción comercial (Solución de extracción de ADN FFPE QuickExtract™ de Epicentro) o iii) se procesó usando el método de extracción basada en columna (kit Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue) según las instrucciones del fabricante y se eluyó en 200 µl de H2O o TE. Las licuefacciones se realizaron como se describió previamente y la mezcla resultante se usó sin diluir como material de entrada para PCR. Las reacciones qPCR se realizaron como se describe. La Figura 3 indica el efecto del procedimiento de liberación de ADN en el rendimiento de la qPCR de 5 muestras de FFPE diferentes, que contienen cantidades variables del conocido inhibidor de PCR, melanina. Las muestras 1-4 contienen altas cantidades de melanina (p. ej., > 95 % para la muestra 4), mientras que la muestra 5 no contiene melanina. La presente composición de licuefacción da como resultado una amplificación superior del ADN por PCR en comparación con la composición de licuefacción comercial, independientemente de la presencia de melanina. La presente composición de licuefacción generalmente da como resultado una mejor compatibilidad con los procesos posteriores en comparación con la extracción de ADN basada en columnas para muestras con alto contenido de melanina. Esto es evidente, p. ej., a partir de los valores de

C_q representados en la Figura 3 para FFPE 4 siguiendo los diferentes métodos. Se observó un rendimiento similar cuando no hay melanina presente. Por lo tanto, otros inhibidores de PCR en tiempo real que no son inmediatamente evidentes o conocidos pueden estar presentes en las muestras, para lo cual las composiciones reivindicadas ofrecen un rendimiento mejorado. La Figura 4 es una representación visual de 3 muestras con alto contenido de melanina utilizadas en el experimento.

Ejemplo 6 Capacidad emulsionante del tampón de licuefacción con lisis en el banco y lisis en la cámara de lisis del cartucho Idylla.

Para ambas condiciones, un corte de 10 µm, cortado consecutivamente del mismo bloque de FFPE se sumergió en 1 ml de tampón de licuefacción. En el protocolo de banco, el corte se calentó a 60 °C durante 15 minutos en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) usando un bloque de calor (Eppendorf) mientras se agitaba (800 rpm). En el cartucho, la temperatura se elevó por etapas (temperatura ambiente, 45 °C, 50 °C, 54 °C y 58 °C) en 5 minutos aproximadamente mediante una combinación de funcionalización peltier (calentamiento) y piezo (ultrasonido enfocado de alta intensidad o HIFU). En la última etapa, la temperatura se elevó a 60 °C y se mantuvo durante 10 minutos bajo una potencia HIFU que nunca superó los 2,25 W. Después de ambos tratamientos, se transfirieron 0,5 ml a un tubo de fondo redondo de alta claridad óptica (falcon BD de 5 ml), se enfrió a temperatura ambiente y se agitó vorticialmente a máxima potencia. Aunque dos cortes prácticamente idénticos se licuaron en el mismo tampón y volumen, se obtuvo una emulsión de parafina superior por tratamiento con HIFU en comparación con el calentamiento y agitación en banco. El tratamiento con HIFU produce de manera reproducible un licuado más opaco y menos depósito de parafina (flecha) en las paredes del tubo después de la agitación vorticial.

Ejemplo 7. Curvas de qRT-PCR obtenidas de material licuado y ARN extraído con sílice.

La figura anterior muestra las curvas qRT-PCR obtenidas de material licuado y ARN extraído con sílice de secciones individuales consecutivas de 10 µm de 2 muestras representativas de FFPE (FFPE 1 y FFPE 2). El material de molde de ARN en la condición de licuefacción se obtuvo procesando una sección de FFPE de acuerdo con el método de licuefacción descrito anteriormente. En resumen, la sección de FFPE se puso en contacto con la composición de licuefacción y se calentó a 60 °C durante 15 minutos, seguido de 95 °C durante 10 minutos en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) usando un bloque de calor (Eppendorf) mientras se agita (800 rpm). El material de plantilla de ARN en la condición de extracción de sílice se obtuvo procesando una sección de FFPE usando el kit QIAgen QIAamp RNA FFPE Tissue Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el molde de 5 µl obtenido por cada método se analizó en una reacción de qRT-PCR de 25 µl utilizando un ensayo específico de ARN para el gen de mantenimiento B2M.

La Figura 7 demuestra que un ciclo umbral similar (C_t) se obtiene utilizando el método de licuefacción o extracción de sílice para liberar ARN de las secciones de FFPE.

En consecuencia, el ARN liberado en el lisado emulsionado era adecuado para el análisis directo de microfluidos.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención descrita en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para liberar ácidos nucleicos contenidos en una muestra biológica, en donde la muestra es una muestra fija, una muestra embebida en cera o una muestra de FFPE, comprendiendo el método la etapa de:
- 5 - poner en contacto la muestra biológica con una composición para convertir al menos parte de la muestra en un lisado que contiene dichos ácidos nucleicos, siendo dicho lisado directamente transportable a través de un sistema microfluídico, en donde la composición es una composición de licuefacción que incluye al menos un tensioactivo no iónico que tiene la fórmula $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde $n=8$ y R es $CH_3(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_8$ o $(CH_2)_{10}-CH-(CH_3)_2$;
- 10 - incubar la composición a una temperatura de 20 °C a aproximadamente 99 °C; y
- 10 - amplificar el ácido nucleico directamente en el lisado dentro del sistema microfluídico, sin purificación de dicho ácido nucleico del tensioactivo no iónico presente en el lisado.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la amplificación del ácido nucleico requiere termociclado.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la amplificación del ácido nucleico requiere PCR.
- 15 4. El método según las reivindicaciones 1 a 3, en donde la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 99 °C.
5. El método según las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tensioactivo no iónico es (Z)-3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxadotetracont-33-en-1-ol (número CAS 27040-03-5).
- 20 6. Uso de una composición en el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para liberar ácido nucleico de una muestra biológica, en donde la muestra es una muestra fija, una muestra embebida en cera o una muestra de FFPE, dicha composición:
- tiene propiedades licuantes; y
- que comprende al menos un tensioactivo no iónico que tiene la fórmula $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde $n = 8$ y
- 25 R es $CH_3(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_8$ o $(CH_2)_{10}-CH-(CH_3)_2$.
7. El uso según la reivindicación 6, en donde la composición contiene además una enzima proteolítica.
8. El uso según la reivindicación 6 o 7, en donde la composición no contiene disolventes orgánicos.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el tensioactivo no iónico es (Z)-3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxadotetracont-33-en-1-ol (número CAS 27040-03-5).

30

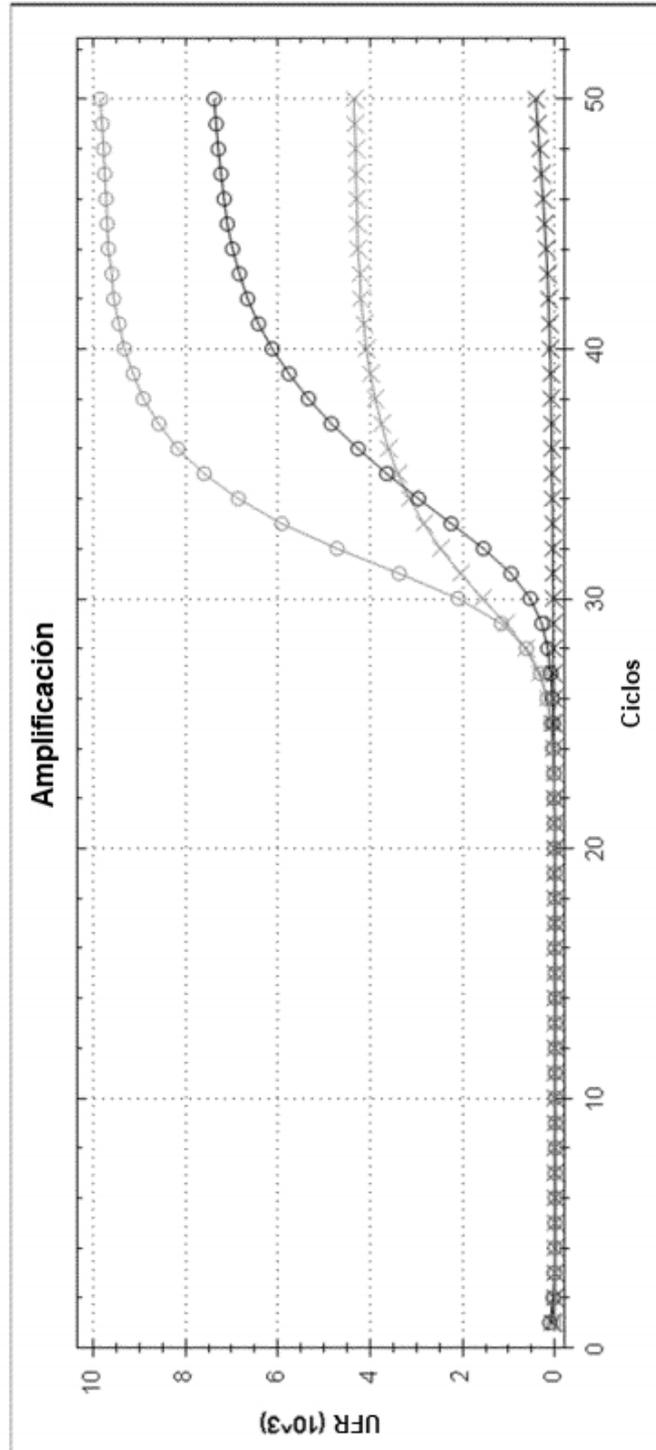


Figura 1.

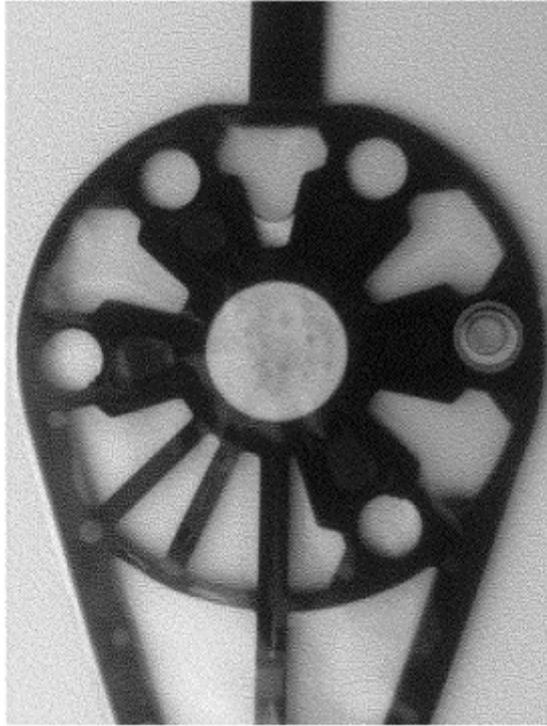


Figura 2.

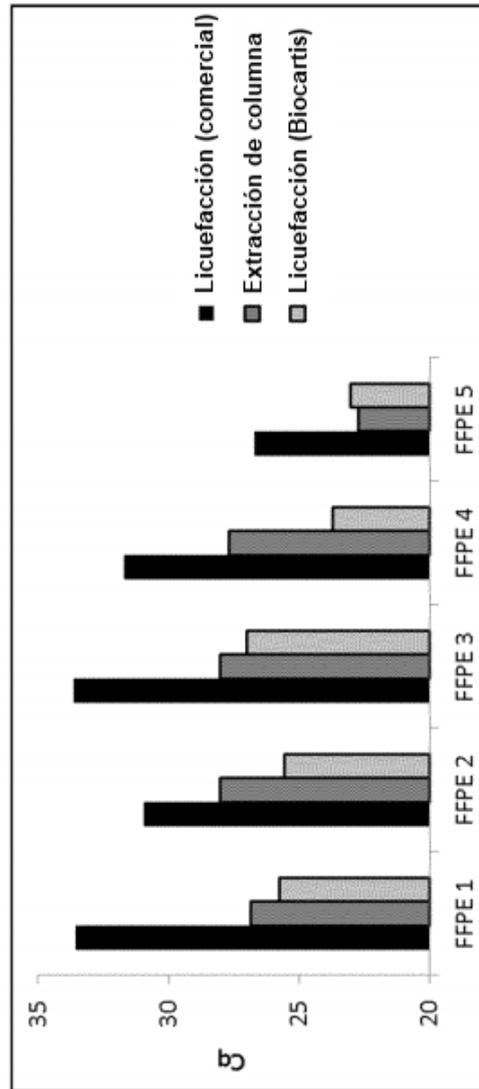


Figura 3.

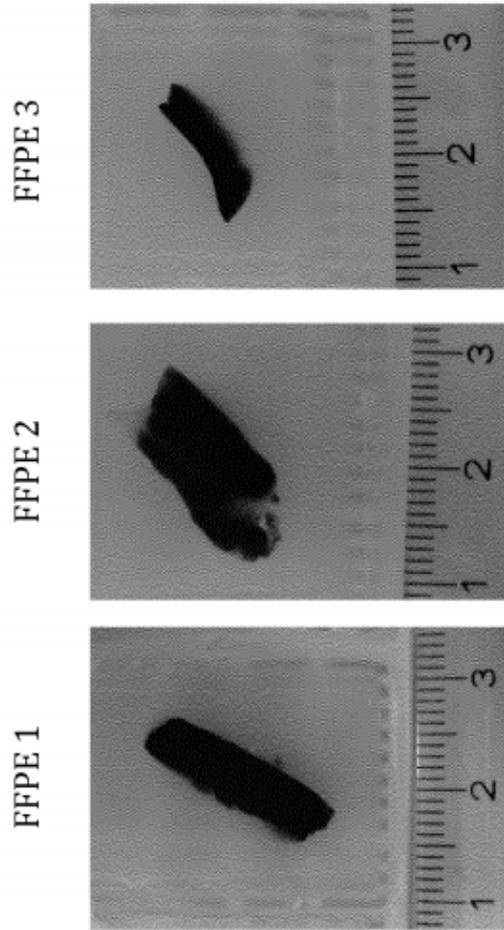


Figura 4.

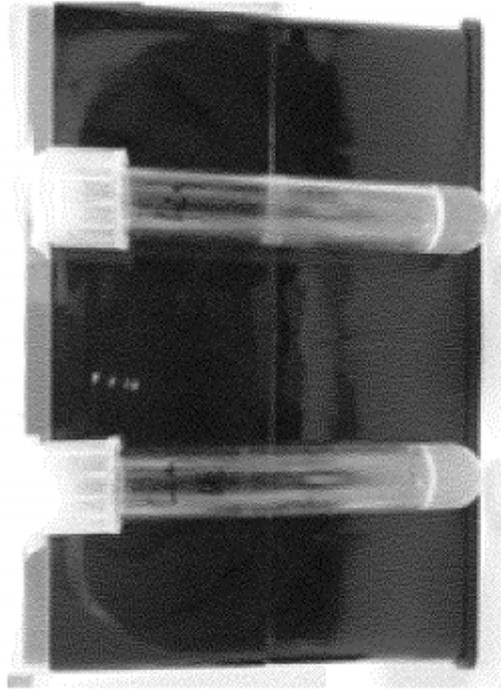


Figura 5

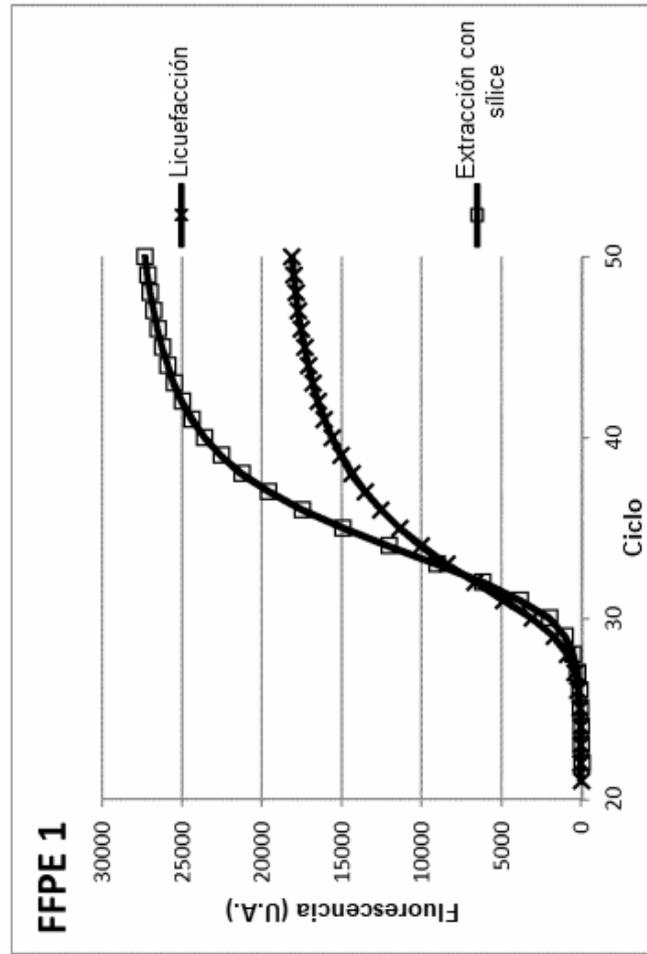


Figura 6a

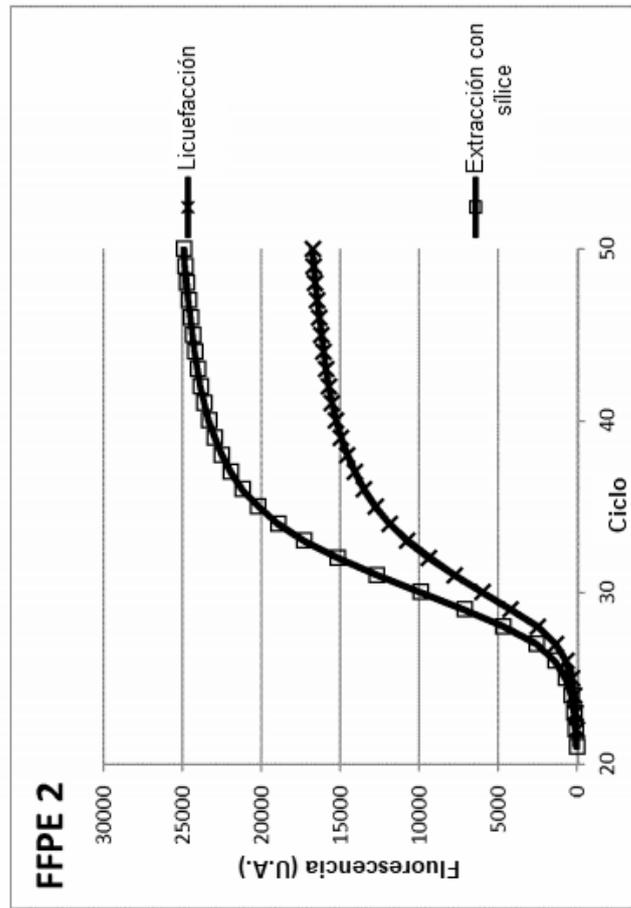


Figura 6b