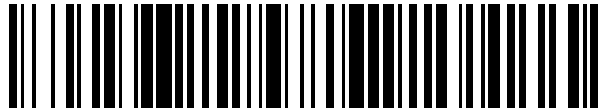


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 048**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2016 PCT/US2016/041917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17019293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2016 E 16742522 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3325647**

54 Título: **Composiciones y métodos para la extracción de ADN y ARN de muestras de tejidos**

30 Prioridad:

24.07.2015 US 201562196774 P

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

20.11.2020

73 Titular/es:

**CEPHEID (100.0%)
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089, US**

72 Inventor/es:

HO, KENNETH E.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 795 048 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

Composiciones y métodos para la extracción de ADN y ARN de muestras de tejidos

5 Antecedentes

10 El uso de perfiles de expresión génica no solo es prevalente en diversas aplicaciones de investigación, sino que se convierte rápidamente en parte de muchos regímenes terapéuticos. Por ejemplo, la determinación de los niveles de expresión génica en los tejidos es de gran importancia para diagnosticar con precisión la enfermedad humana y se usa cada vez más para determinar el curso de tratamiento del paciente. Los métodos farmacogenómicos pueden identificar a los pacientes que probablemente respondan a un fármaco en particular y pueden abrir el camino a nuevos enfoques terapéuticos.

15 Por ejemplo, la timidilato sintasa (TS) es una enzima integral en la biosíntesis de ADN donde cataliza la metilación reductora de la desoxiuridina monofosfato (dUMP) a monofosfato desoxitimidina (dTMP) y proporciona una ruta para la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidina dentro de la célula (Johnston y otros (1995) *Cancer Res.*, 55: 1407-1412). La timidilato sintasa es un objetivo para los fármacos quimioterapéuticos, más comúnmente el agente antifolato 5-fluorouracilo (5-FU). Como un agente efectivo para el tratamiento de los cánceres de colon, cabeza y cuello y de mama, se cree que la acción principal del 5-FU es inhibir la actividad de la TS, lo que da como resultado el agotamiento de los niveles intracelulares de timina y posteriormente conduce a la muerte celular.

20 Se conoce, además, que la timidilato sintasa tiene importancia clínica en el desarrollo de resistencia tumoral, como se demostró por estudios que mostraron una inducción aguda de la proteína TS y un aumento en los niveles de enzima TS en células neoplásicas después de la exposición a 5-FU (Spears y otros (1982) *Cancer Res.* 42: 450-456; Swain y otros (1989) *J. Clin. Oncol.* 7: 890-899). La capacidad de un tumor para sobreexpresar agudamente TS en respuesta a agentes citotóxicos tales como 5-FU puede desempeñar una función en el desarrollo de la resistencia al fluorouracilo. Los niveles de proteína TS parecen correlacionarse directamente con la efectividad de la terapia con 5-FU, que exista una correlación directa entre la expresión de proteínas y ARN y la expresión de TS es un potente marcador pronóstico en el cáncer colorrectal y de mama (Jackman y otros (1985) *Experimental and Clinical Progress in Cancer Chemotherapy*, F.M. Muggia ed., Martinus y otros (1992) *Cancer Res.*, 52: 108-116). En la enfermedad metastásica avanzada, se demostró que tanto un nivel alto de ARNm de TS, cuantificado por RT-PCR, como una alta expresión de proteína TS, predicen una respuesta deficiente a la terapia basada en fluoropirimidina para los cánceres colorrectal (Johnston y otros (1995) *supra*; Farrugia y otros (1997) *Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Cancer Res.* 38: A4132; Leichman y otros (1997) *J. Clin. Oncol.* 15(10): 3223-3229), gástrico (Lenz y otros (1998) *Clin. Cancer Res.*, 4(5): 1227-1234), y de cabeza y cuello (Johnston y otros (1995) *Cancer Res.*, 55: 1407-1412; Leichman y otros (1997) *J. Clin. Oncol.* 15(10): 3223-3229).

40 Similarmente, la mutación del oncogén KRAS es predictiva de una respuesta muy pobre al tratamiento con panitumumab (VECTIBIX®) y cetuximab (ERBITUX®) en el cáncer colorrectal (Lièvre y otros (2006) *Cancer Res.*, 66(8): 3992-3995). Actualmente, una de las formas más confiables de predecir si un paciente con cáncer colorrectal responderá a uno de los fármacos inhibidores de EGFR es comprobar ciertas mutaciones "activadoras" en el gen que codifica KRAS, que se producen en el 40 % de los cánceres colorrectales. Los estudios muestran que los pacientes cuyos tumores expresan la versión mutada del gen KRAS no responderán a cetuximab o panitumumab.

45 Una fuente importante para este tipo de información viene en forma de muestras de tejido embebido en parafina, fijado en formalina ("FFPET"), que se crean rutinariamente a partir de muestras de biopsias tomadas de pacientes sometidos a una variedad de regímenes diagnósticos y/o terapéuticos para una variedad de diferentes enfermedades. Estas muestras usualmente se asocian con los registros clínicos correspondientes y a menudo desempeñan una función importante en el diagnóstico y determinación de la modalidad de tratamiento. Por ejemplo, las muestras de FFPET de biopsias tumorales a menudo se vinculan con la clasificación del estadio del cáncer, la supervivencia del paciente, y el régimen de tratamiento, lo que proporciona de esta manera una gran cantidad de información potencial que puede referenciarse de manera cruzada y correlacionarse con los patrones de expresión génica. Sin embargo, la baja calidad y cantidad de ácidos nucleicos aislados a partir de muestras de FFPET condujo a su subutilización en estudios de perfiles de expresión génica.

50 Se conoce que el ARN puede purificarse y analizarse a partir de muestras de FFPET (Rupp y Locker (1988) *Biotechniques* 6: 56-60), sin embargo, el ARN aislado de las muestras de FFPET a menudo se degrada y fragmenta de forma moderada a alta. En adición a degradarse y fragmentarse, la modificación química del ARN por la formalina restringe la unión de los cebadores oligo-dT a la cola del ácido poliadenílico y puede impedir la eficiencia de la transcripción inversa.

60 En vista de estas dificultades, el análisis de ácidos nucleicos a partir de tejido embebido en parafina fijado en formalina (FFPET) demostró ser un desafío debido a las múltiples etapas necesarias para generar material genético amplificable por PCR. El procedimiento para aislar ácidos nucleicos de FFPET puede incluir la eliminación de la parafina (desparafinización), lisis de la muestra conservada (digestión con proteasa), reversión de los enlaces

cruzados adquiridos durante el proceso de fijación y purificación de ácidos nucleicos basada en fase sólida. Estos protocolos típicamente son complejos y laboriosos.

Resumen

5 La invención se define en las reivindicaciones. Se proporcionan métodos y reactivos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de células o tejidos (por ejemplo, aspirados con aguja fina y/o muestras de tejido embebidos fijados (por ejemplo, muestras de FFPET y/o criosecciones). En algunas modalidades, los métodos son simples, fácilmente semiautomatizados o totalmente automatizados y típicamente requieren un tiempo de trabajo mínimo, mientras que se extraen ácidos nucleicos con alto rendimiento y de calidad amplificable por PCR.

10

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra esquemáticamente una modalidad de un flujo de trabajo con GENEXPERT® para FFPET

15 Las Figuras 2A-2C ilustran los resultados de variar la salinidad de la solución de lisis. La Figura 2A muestra el umbral del ciclo en función de la concentración de NaCl para ESR y PGR. La Figura 2B muestra el umbral del ciclo en función de la concentración de NaCl para ERBB2 y CYFIP1. La Figura 2C muestra el umbral del ciclo en función de la concentración de NaCl para MKi67.

20 Las Figuras 3A y 3B muestran la estabilidad de las muestras a lo largo del tiempo. La Figura 3A muestra la estabilidad (repetible del umbral del ciclo) para ESR, y PGR para muestras almacenadas durante 62 días. La Figura 3B muestra la estabilidad (repetible del umbral del ciclo) para ESR, y PGR para muestras almacenadas durante 62 días.

Descripción detallada

25 La invención se define en las reivindicaciones. Las muestras de tejido embebido en parafina y fijado en formalina (FFPET) representan las muestras recolectadas y almacenadas más comúnmente para su uso en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer. Sin embargo, históricamente estas muestras se subutilizaron para el propósito de crear perfiles de expresión génica debido a la baja calidad y cantidad de ácidos nucleicos de FFPET. El análisis de los ácidos nucleicos del tejido embebido en parafina fijado en formalina (FFPET) es un desafío debido a las múltiples etapas necesarias para generar material genético amplificable (por ejemplo, amplificable por PCR). El procedimiento para aislar ácidos nucleicos de FFPET implica típicamente la eliminación de parafina (desparafinización), lisis de la muestra conservada (digestión con proteasa), reversión de los enlaces cruzados adquiridos durante el proceso de fijación y purificación de ácidos nucleicos basada en fase sólida.

35 Existen varios procedimientos de preparación de muestras para extraer ADN/ARN listo para PCR, pero la mayoría son complejos y laboriosos. Las composiciones y métodos descritos en la presente descripción superan estos y otros problemas y proporcionan reactivos y protocolos que pueden usarse para aislar rápidamente muestras de ácido nucleico de calidad amplificable (por ejemplo, ADN, ARN). Los métodos proporcionados son simples, fáciles de semiautomatizar o de automatizar completamente, y requieren un tiempo de trabajo mínimo. Los ácidos nucleicos se extraen con alto rendimiento y son de calidad amplificable por PCR.

40 En ciertas modalidades, se proporciona una solución de lisis que puede usarse para extraer ácidos nucleicos de una muestra fijada en formalina embebida en parafina mediante el uso de una solución única e incubación a una temperatura única. Esto proporciona una mejora significativa que es la simplicidad, eficiencia y costo con respecto a los sistemas anteriores de dos temperaturas/dos tampones usados para aislar ácidos nucleicos de muestras de tejido.

45 Se observará que, si bien la discusión a continuación se centra en muestras FFPE, los reactivos de lisis descritos en la presente descripción y los usos de estos son efectivos con esencialmente cualquier muestra celular o de tejido que incluyen, pero no se limitan a, secciones de tejido fresco, secciones de tejido congelado, biopsias celulares, aspirados por aguja, botones celulares, micromatrices de tejidos, y lo similar.

Solución de lisis.

55 En ciertas modalidades, las soluciones de lisis comprenden una sal de sodio con alta concentración (por ejemplo, NaCl), un tampón suficiente para mantener el pH de la solución a un pH que está en el intervalo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5, o de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 7,3, un agente quelante, una sal de magnesio (por ejemplo, MgCl₂), y un detergente. En ciertas modalidades la solución de lisis contiene adicionalmente un agente antiespumante, y/o un conservante/biocida, y/o una proteasa. En ciertas modalidades la solución de lisis omite la proteasa que después puede adicionarse inmediatamente antes de su uso.

60 Una modalidad ilustrativa, pero no limitante de una solución de lisis se muestra en la Tabla 1.

65

Tabla 1. Solución de lisis ilustrativa, pero no limitante.

Componente	Concentración	Descripción
NaCl (MM 58,44)	400 mM	Sal de sodio
Tween 20	1 %	Detergente
MgCl ₂ (MM 95,21)	10 mM	Sal de magnesio
EDTA (MM 372,24)	25 mM	Agente quelante
Sal de sodio HEPES (MM 260,29)	50 mM	Tampón
Azida de sodio (p/v)	0,01 %	Conservante/biocida
Antiespumante SE-15*	0,01 %	Agente antiespumante
pH	7,05 (+/- 0,1)	

20 Esta formulación pretende ser ilustrativa, pero no limitante. Mediante el uso de las enseñanzas proporcionadas en la presente descripción, otras soluciones de lisis útiles para una extracción de ácidos nucleicos de 1 etapa, 1 temperatura de una muestra de tejido estarán disponibles para un experto en la técnica.

25 Sal de sodio.

25 En diversas modalidades la solución de lisis comprende una sal de sodio (NaCl). En ciertas modalidades la sal de sodio está en una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 500 mM, o de aproximadamente 350 mM a aproximadamente 450 mM, o es aproximadamente 400 mM. En ciertas modalidades una sal de calcio (por ejemplo, CaCl₂) puede usarse en adición a o en lugar de una sal de sodio.

30 Tampón

35 En algunos aspectos de la divulgación, la solución de lisis comprende un tampón que tampona la solución a un pH que está en el intervalo de aproximadamente pH 6,5 hasta aproximadamente pH 7,5. En algunas modalidades el tampón tampona la solución a un pH que está en el intervalo de aproximadamente pH 6,6, o aproximadamente pH 6,7, o aproximadamente pH 6,8 hasta aproximadamente pH 7,5 o hasta aproximadamente pH 7,4, o hasta aproximadamente pH 7,3, o hasta aproximadamente pH 7,2. En ciertas modalidades el pH se tampona a pH 7,05 (+/- 0,1).

40 En ciertas modalidades, la concentración del tampón está en el intervalo de aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 50 mM, o es de aproximadamente 50 mM.

45 En ciertas modalidades cualquiera de varios tampones usados en biología es adecuado. Tales incluyen, pero no se limitan a tampones tales como tampón de citrato, Tris, fosfato, PBS, citrato, TAPS, Bicina, Tricina, TAPSO, HEPES, TES, MOPS, PIPES, Cacodilato, SSC, MES, y lo similar. En la Tabla 2 se proporciona una lista ilustrativa, pero no limitante, de compuestos tampón.

50

55

60

65

Tabla 2. Tampones comunes que pueden usarse en una solución de lisis.

	Nombre común	pK _a a 25 °C	Intervalo del tampón	Nombre del compuesto completo
5	TAPS	8,43	7,7-9,1	Ácido 3-[[tris(hidroximetil) metil]amino]propanosulfónico
10	Bicina	8,35	7,6-9,0	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina
	Tris	8,06	7,5-9,0	tris(hidroximetil)metilamina
	Tricina	8,05	7,4-8,8	N-tris(hidroximetil) metilglicina
15	TAPSO	7,635	7,0-8,2	Ácido 3-[N-Tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico
	HEPES	7,48	6,8-8,2	Ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico
20	TES	7,40	6,8-8,2	Ácido 2 -[[tris(hidroximetil)metil]amino]etanosulfónico
	MOPS	7,20	6,5-7,9	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
	PIPES	6,76	6,1-7,5	piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)
25	Cacodilato	6,27	5,0-7,4	ácido dimetilarsínico
	SSC	7,0	6,5-7,5	citrato de sodio salino
	MES	6,15	5,5-6,7	Ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico
30	Citrato			Citrato de sodio

35 En una modalidad ilustrativa, pero no limitante, el tampón es una sal de sodio HEPES (MM 260,29) presente a aproximadamente 50 mM.

Los diversos tampones descritos anteriormente pretenden ser ilustrativos y no limitantes. Mediante el uso de la enseñanza y los ejemplos proporcionados en la presente descripción, muchos otros tampones para usar en una solución de lisis de acuerdo con los métodos descritos en presente descripción estarán disponibles para un experto en la técnica.

Agente quelante.

45 Como se indicó anteriormente, en algunas modalidades, la solución de lisis comprende uno o más agentes quelantes. Los agentes quelantes se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a N-acetil-L-cisteína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietiltri amino pentaacético (DTPA), ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), y agentes quelantes de fosfonato (por ejemplo, que incluyen, pero no se limitan a ácido nitrilotris(metilen)fosfónico (NTMP), ácido etilendiamino tetra(metilenfosfónico) (EDTMP), ácido dietiltri amino penta(metilenfosfónico) (DTPMP), ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfónico (HEDP), y lo similar). En algunas modalidades el agente quelante comprende EDTA, o DTAP. En algunas modalidades, el agente quelante comprende EDTA.

55 En algunas modalidades, cuando está presente, el agente quelante está presente en la solución de lisis a una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 mM. En algunas modalidades, el agente quelante está presente en una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 30 mM, o de aproximadamente 40 mM hasta aproximadamente 60 mM, o hasta aproximadamente 70 mM, o hasta aproximadamente 80 mM, o hasta aproximadamente 90 mM, o hasta aproximadamente 100 mM. En algunas modalidades, el agente quelante está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM. En algunas modalidades, el agente quelante está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 140 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o es de aproximadamente 25 mM.

65 Sal de magnesio.

En ciertas modalidades la solución de lisis contiene una sal de magnesio. En ciertas modalidades la sal de magnesio es MgCl₂. En ciertas modalidades la concentración de la sal de magnesio en la solución de lisis está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, o es de aproximadamente 10 mM.

5 Detergente

Como se indicó anteriormente, en algunas modalidades, la solución de lisis comprende uno o más detergentes. En algunas modalidades, el detergente comprende un detergente iónico o un detergente no iónico. En algunas modalidades, el detergente incluye uno o más detergentes mostrados en la Tabla 3.

15 Tabla 3. Detergentes ilustrativos, pero no limitantes para usar en algunas modalidades de la solución de lisis descrita en la presente descripción.

Descripción	M	Fórmula	Clase
Cloruro de bencetonio	448,08	C ₂₇ H ₄₂ ClNO ₂	catiónico
BRIJ® 35	1198,56	C ₅₈ H ₁₁₈ O ₂₄	no iónico
BRIJ® 58	1123,51	C ₅₆ H ₁₁₄ O ₂₁	no iónico
Cloruro de cetilpiridinio monohidrato	358,01	C ₂₁ H ₃₈ ClN·H ₂ O	catiónico
Bromuro de cetiltrimetilamonio	364,46	C ₁₉ H ₄₂ BrN	catiónico
CHAPS	614,89	C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S	zwitteriónico
CHAPSO	630,87	C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₈ S	zwitteriónico
Sal de sodio de ácido 1-decanosulfónico	244,33	C ₁₀ H ₂₁ NaO ₃ S	aniónico
n-Dodecil-β-D-glucopiranosido	348,48	C ₁₈ H ₃₆ O ₆	no iónico
Dodecil-β-D-maltósido	510,63	C ₂₄ H ₄₆ O ₁₁	no iónico
Bromuro de dodeciltrimetilamonio	308,35	C ₁₅ H ₃₄ BrN	catiónico
HECAMEG	335,39	C ₁₅ H ₂₉ NO ₇	no iónico
Sal de sodio anhidra de ácido 1-heptanosulfónico	202,25	C ₇ H ₁₅ NaO ₃ S	aniónico
Sal de sodio monohidrato de ácido 1-heptanosulfónico	220,27	C ₇ H ₁₅ NaO ₃ S·H ₂ O	aniónico
Sal de sodio anhidra de ácido 1-hexanosulfónico	188,22	C ₆ H ₁₃ NaO ₃ S	aniónico
Sal de sodio monohidrato del ácido 1-hexanosulfónico	206,24	C ₆ H ₁₃ NaO ₃ S·H ₂ O	aniónico
sal de sodio de n-lauilsarcosina	293,39	C ₁₅ H ₂₈ NNaO ₃	aniónico
Dodecilsulfato de litio (LiDS)	272,33	C ₁₂ H ₂₅ LiO ₄ S	aniónico
MEGA-8	321,42	C ₁₅ H ₃₁ NO ₆	no iónico
MEGA-9	335,44	C ₁₆ H ₃₃ NO ₆	no iónico
Sal de sodio de ácido 1-nonanosulfónico	230,30	C ₉ H ₁₉ NaO ₃ S	aniónico
n-Nonil-β-D-glucopiranosido	306,40	C ₁₅ H ₃₀ O ₆	no iónico
n-Nonil-β-D-maltósido	468,41	C ₂₁ H ₄₀ O ₁₁	no iónico
Sal de sodio de ácido 1-octanosulfónico	216,28	C ₈ H ₁₇ NaO ₃ S	aniónico
n-Octil-β-D-glucopiranosido	292,38	C ₁₄ H ₂₈ O ₆	no iónico
n-Octil-β-D-tioglucopiranosido	308,44	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ S	no iónico
Octil-D-glucopiranosido	292,38	C ₁₄ H ₂₈ O ₆	no iónico

5	Sal de sodio anhidra de ácido 1-pentanosulfónico	174,20	C5H11NaO3S	Aniónico
	Sal de sodio monohidrato de ácido 1-pentanosulfónico	192,12	C5H11NaO3S·H2O	Aniónico
	PLURONIC® F-68	~ 8350		no iónico
10	Saponina			no iónico
	SDS (dodecilsulfato de sodio)	288,38	C12H25NaO4S	aniónico
	Colato de sodio	430,57	C24H39NaO5	aniónico
15	Desoxicolato de sodio	414,57	C24H39NaO4	aniónico
	Monolaurato de sacarosa	524,60	C24H44O12	no iónico
	Sulfobetaina SB 12	335,55	C17H37NO3S	zwitteriónico
20	Sulfobetaina SB 14	363,60	C19H41NO3S	zwitteriónico
	n -Tetradecil-β-D-maltósido	538,63	C26H50O11	no iónico
	n-Tridecil-β-D-maltósido	524,64	C25H48O11	no iónico
25	TRITON® X-100	646,85	C34H62O11	no iónico
	TRITON® X-114	558,75	C30H54O9	no iónico
	TWEEN® 20	1227,72	C58H114O26	no iónico
30	TWEEN® 80	1310		no iónico
	n -Undecil-β-D-maltósido	496,59	C23H44O11	No iónico
	N-Lauroilsarcosina		CH3(CH2)10CON(CH3) CH2COOH	aniónico

35

En algunas modalidades, el detergente comprende Tween 20, fuerza completa.

40

En algunas modalidades, cuando está presente, el detergente está presente en la solución de lisis a una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 30 mM hasta aproximadamente 40 mM. En algunas modalidades el detergente está en el intervalo de aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 15 mM o de aproximadamente 20 mM o de aproximadamente 25 mM hasta aproximadamente 200 mM o hasta aproximadamente 150 mM, o hasta aproximadamente 100 mM, o hasta aproximadamente 75 mM, o hasta aproximadamente 50 mM, o hasta aproximadamente 40 mM. En algunas modalidades, el detergente está presente a una concentración de aproximadamente 35 mM. En algunas modalidades, el detergente está presente en un porcentaje que está en el intervalo de aproximadamente 0,5 % (v/v) hasta aproximadamente 30 % (v/v), o de aproximadamente 1 % (v/v) hasta aproximadamente 20 % (v/v) o de aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 15 % (v/v). En algunas modalidades el detergente comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2% de dicha solución, o de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,5 % de dicha solución, o aproximadamente 1 % de la solución de lisis.

45

50

En algunas modalidades, los detergentes usados en las soluciones de lisis descritas en la presente descripción no necesitan limitarse a los detergentes descritos anteriormente. Mediante el uso de la enseñanza y ejemplos proporcionados en la presente descripción, otros detergentes estarán disponibles para un experto en la técnica.

55

Componentes adicionales

60

En algunas modalidades, la solución de lisis comprende adicionalmente uno o más de los siguientes: un segundo detergente, un agente caotrópico y/o reductor, cloruro de calcio u otra sal, y/o una proteasa.

Proteasa

65

En algunas modalidades la solución de lisis incluye adicionalmente una o más proteasas. Las proteasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, metaloproteasas, ácido glutámico proteasas, metaloproteasas, y combinaciones de estas. Las proteasas adecuadas

ilustrativas incluyen, pero no se limitan a proteinasa k (una serina proteasa de amplio espectro), subtilisina, tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, y lo similar.

5 En algunas modalidades, cuando está presente en la solución de lisis la proteasa está presente en una cantidad que proporciona una actividad que está en el intervalo de 1 U/ml hasta aproximadamente 200 U/ml de solución de lisis. En algunas modalidades, la cantidad proporciona una actividad que está en el intervalo de aproximadamente 1 U/ml, o de aproximadamente 5 U/ml, o de aproximadamente 10 U/ml, o de aproximadamente 15 U/ml, hasta aproximadamente 200 U/ml, o hasta aproximadamente 100 U/ml, o hasta aproximadamente 80 U/ml, o hasta aproximadamente 60 U/ml, o hasta aproximadamente 40 U/ml, o hasta aproximadamente 30 U/ml de solución de lisis. En algunas modalidades, la cantidad de proteasa está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/ml. En algunas modalidades, la cantidad de proteasa está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/ml, o de aproximadamente 0,2 mg/ml, o de aproximadamente 0,3 mg/ml, o de aproximadamente 0,4 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml, o de aproximadamente 0,6 mg/ml, o de aproximadamente 0,7 mg/ml, o de aproximadamente 0,8 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, o hasta aproximadamente 4 mg/ml, o hasta aproximadamente 3 mg/ml, o hasta aproximadamente 2 mg/ml, o hasta a aproximadamente 1 mg/ml.

En algunas modalidades, las soluciones de lisis en los métodos descritos en la presente descripción no necesitan limitarse al uso de las proteasas descritas anteriormente. Mediante el uso de la enseñanza y los ejemplos proporcionados en la presente descripción, otras proteasas estarán disponibles para un experto en técnica.

Métodos de uso.

En diversas modalidades se proporcionan métodos de uso de las soluciones de lisis descritas en la presente descripción. Una modalidad de los métodos se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. Como se muestra en esta, una o más secciones de una muestra de tejido fijada, embebida en parafina, se incuban en una solución de lisis a una temperatura que está en el intervalo de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 110 °C, típicamente una temperatura única de aproximadamente 80 °C. En ciertas modalidades, la solución de lisis carece de una proteasa, sin embargo, más típicamente se incluye una proteasa (por ejemplo, proteinasa K).

Los ácidos nucleicos pueden recuperarse de la solución de lisis, por ejemplo, mediante el uso de una extracción con alcohol (por ejemplo, una precipitación con alcohol). El procedimiento da como resultado una extracción de rendimiento relativamente alto y produce un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN) de calidad suficiente para la amplificación, detección, y/o cuantificación por PCR de una secuencia de ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades la incubación es por un período de tiempo de hasta aproximadamente 3 horas. Sin embargo, en modalidades típicas, la incubación puede estar en el intervalo de aproximadamente 15, 20, o 30 minutos hasta aproximadamente 1 hora. Como se observó anteriormente, en algunas modalidades no se requiere proteasa. Similarmente, en algunas modalidades, el método no incluye etapas adicionales de desparafinado y/o reactivos adicionales para el desparafinado. En algunas modalidades el método no utiliza un solvente orgánico para el desparafinado y/o la incubación no se realiza en presencia de un solvente orgánico. De acuerdo con esto, el método es rápido, simple, y fácilmente susceptible de automatización y de metodologías de alto rendimiento.

Los ácidos nucleicos extraídos mediante el uso de los métodos y reactivos descritos en la presente descripción son de buena calidad y pueden amplificarse fácilmente para detectar y/o cuantificar una o más secuencias de ácido nucleico objetivo en la muestra. Los ácidos nucleicos son compatibles con cualquiera de varios métodos de amplificación que incluyen, pero no se limitan a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver, por ejemplo, Innis, y otros (1990) PCR Protocols. A guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego,) que incluye RT-PCR, reacción en cadena de la ligasa (LCR) (ver, por ejemplo, Wu y Wallace (1989) Genomics 4: 560; Landegren y otros (1988) Science 241: 1077; Barringer y otros (1990) Gene 89: 117), amplificación de la transcripción (ver, por ejemplo, Kwok y otros (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), replicación de secuencia autosostenida (ver, por ejemplo, Guatelli y otros (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874), dot PCR, PCR con adaptadores enlazadores, y lo similar.

Además, fue un descubrimiento sorprendente que las muestras procesadas de acuerdo con los métodos que usan los materiales descritos en la presente descripción, particularmente mediante el uso de las soluciones de lisis descritas en la presente descripción (ver, por ejemplo, la Tabla 1) dan resultados de Ct más tempranos, a veces mejores que 2 Cts, o mejores que 3 Cts, o mejores que 4 Cts, en comparación con varios sistemas comerciales de lisis.

Adicionalmente se realizó un estudio de estabilidad del lisado en el que se lisaron botones de células FFPE y muestras de pacientes FPE, se mezclaron con etanol y después se almacenaron a -20 °C con las fechas de prueba programadas (ver, por ejemplo, el Ejemplo 1, experimento G, en curso hasta el día 62, y Figuras 3A y 3B). En un experimento, actualmente se observaron umbrales de ciclo constantes de hasta 62 días en el transcurso de los 62 días para todos los objetivos. Así es posible medir múltiples tirones a partir del rollo lisado original para realizar ya sea una prueba repetida (si es necesario) o una(s) prueba(s) de cartucho reflejo.

65

Aunque en algunas modalidades, los ácidos nucleicos extraídos se usan en reacciones de amplificación, se contemplan, además, otros usos. Así, por ejemplo, los ácidos nucleicos extraídos (o su(s) producto(s) de amplificación) pueden usarse en diversos protocolos de hibridación que incluyen, pero no se limitan a micromatrices basadas en ácido nucleico. En algunas modalidades puede usarse cualquier micromatriz basada en ácido nucleico con los métodos descritos en la presente descripción. Tales micromatrices incluyen, pero no se limitan a, micromatrices disponibles comercialmente, por ejemplo, micromatrices disponibles de Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA), Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA), Illumina, Inc. (San Diego, California), GE Healthcare (Piscataway, NJ), NimbleGen Systems, Inc. (Madison, Wisconsin), Invitrogen Corp. (Carlsbad, California), y lo similar.

Así, los métodos y reactivos descritos en la presente descripción son aplicables a la investigación básica dirigida al descubrimiento de perfiles de expresión génica relevantes para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Los métodos son aplicables, además, al diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad, la determinación de regímenes de tratamiento particulares, la supervisión de la efectividad del tratamiento y lo similar. En algunas modalidades los métodos son aplicables, además, a otros campos donde la calidad del ácido nucleico es pobre, tal como la medicina forense, arqueología, historial médico, paleontología, y lo similar. En vista de las enseñanzas y protocolos proporcionados en la presente descripción, estas y otras aplicaciones serán fácilmente reconocidas por los expertos en la técnica.

Muestras.

Mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción el ADN y/o el ARN pueden aislarse a partir de cualquier muestra biológica. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a muestras frescas o aspirados de células/tejidos, secciones congeladas, biopsias con aguja, cultivos celulares, muestras de tejidos fijadas, botones de células, micromatrices de tejidos, y lo similar. Los métodos son particularmente adecuados para su uso con muestras de tejido embebido en parafina fijadas (por ejemplo, FFPET). Si bien las muestras histológicas se fijan típicamente con un fijador de aldehído tal como formalina (formaldehído) y glutaraldehído, se cree que los métodos descritos en la presente descripción trabajan adicionalmente con tejidos fijados mediante el uso de otras técnicas de fijación como la inmersión en alcohol, y lo similar.

Las muestras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, muestras de FFPET de tejidos humanos, tejidos de animales de laboratorio, tejidos de animales de compañía, o tejidos de animales de ganado. Así, por ejemplo, las muestras incluyen muestras de tejido de seres humanos que incluyen, pero no se limitan a muestras de seres humanos sanos (por ejemplo, muestras de tejido humano sano), muestras de un sujeto enfermo y/o tejido enfermo, muestras usadas para ensayos de diagnóstico y/o pronóstico y lo similar. Las muestras adecuadas incluyen, además, muestras de animales no humanos. Las muestras de FFPET de, por ejemplo, un primate no humano, tal como un chimpancé, gorila, orangután, gibón, mono, macaco, babuino, mangabey, colobus, langur, tití, lémur, un ratón, rata, conejo, cobayo, hámster, perro, gato, hurón, peces, vaca, cerdo, oveja, cabra, caballo, burro, pollo, ganso, pato, pavo, anfibio, o reptil pueden usarse en los métodos descritos en la presente descripción.

En adición, las muestras de FFPET de cualquier edad pueden usarse con los métodos descritos en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, muestras de FFPET que son frescas, tienen menos de una semana, tienen menos de dos semanas, tienen menos de un mes, tienen menos de dos meses, menos de tres meses, menos de seis meses, menos de 9 meses, menos de un año, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, al menos diez años, al menos quince años, al menos veinte años, o más viejas.

En algunas modalidades los métodos descritos en la presente descripción se realizan en una o más secciones tomadas de una muestra de tejido fijada, incrustada (por ejemplo, una muestra de FFPET). Las secciones pueden ser de cualquier grosor deseado. Así, en algunas modalidades, se contemplan tanto secciones delgadas como secciones gruesas, que incluyen, pero no se limitan a, secciones que tienen menos de 1 micrómetro de grosor, aproximadamente 1 micrómetro de grosor, aproximadamente 2 micrómetros de grosor, aproximadamente 3 micrómetros de grosor, aproximadamente 4 micrómetros de grosor, aproximadamente 5 micrómetros de grosor, aproximadamente 6 micrómetros de grosor, aproximadamente 7 micrómetros de grosor, aproximadamente 8 micrómetros de grosor, aproximadamente 9 micrómetros de grosor, aproximadamente 10 micrómetros de grosor, aproximadamente 15 micrómetros de grosor, o aproximadamente 20 micrómetros de grosor, en dependencia de la aplicación deseada. En ciertas aplicaciones, las secciones pueden tener, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 micrómetro de grosor, hasta aproximadamente 2 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 3 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 4 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 5 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 6 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 7 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 8 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 9 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 10 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 15 micrómetros de grosor, hasta aproximadamente 20 micrómetros de grosor, o hasta aproximadamente 25 o 30 micrómetros de grosor. En algunas modalidades, las secciones pueden definirse por un intervalo de tamaños, que incluyen, pero no se limitan a, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 micrómetros de grosor, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 micrómetros de grosor, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 micrómetros de grosor, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 micrómetros de grosor.

En muchos casos, las muestras de tejido embebidas fijadas (por ejemplo, muestras de FFPET) comprenden un área de tejido enfermo, por ejemplo, de un tumor u otro tejido canceroso. Si bien tales muestras de FFPET encuentran utilidad en los métodos descritos en la presente descripción, las muestras de FFPET que no comprenden un área de tejido enfermo, por ejemplo, muestras de FFPET de tejidos normales, no tratados, tratados con placebo, o sanos, pueden usarse, además, en los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, un área o tejido enfermo deseado, o un área que contiene una región, característica o estructura particular dentro de un tejido particular, se identifica en una muestra de FFPET, o una sección o secciones de esta, antes del aislamiento de ácidos nucleicos como se describe en la presente descripción, con el fin de aumentar el porcentaje de ácidos nucleicos obtenidos de la región deseada. Tales regiones o áreas pueden identificarse mediante el uso de cualquier método conocido por los expertos en la técnica, que incluye, pero no se limita a, identificación visual, tinción, por ejemplo, tinción con hematoxilina y eosina, marcado inmunohistoquímico, y lo similar. En cualquier caso, en algunas modalidades, el área deseada de la muestra de tejido, o secciones de esta, puede diseccionarse, ya sea por macrodissección o microdissección, para obtener el material de partida para el aislamiento de una muestra de ácido nucleico mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

Si bien, en ciertas modalidades, los reactivos de lisis y los métodos descritos en la presente descripción son particularmente adecuados para su uso con muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE), se apreciará que los reactivos y métodos deben limitarse para usarse con tales muestras. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el (los) reactivo(s) de lisis y los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en células enteras que, por ejemplo, se aplican sobre un portaobjetos de vidrio como un frotis. En ciertas modalidades los frotis se derivan de un aspirado con aguja fina. Los frotis pueden ser un vehículo que se asocia con FNA donde la muestra extraída se aplica a un portaobjetos como un frotis. Las células pueden teñirse para observaciones visuales, pero, además, pueden dejarse sin teñir y simplemente dejarse secar al aire. En ciertas modalidades que usan estos frotis sin teñir las células pueden eliminarse del portaobjetos y utilizarse con el reactivo de lisis y los métodos descritos en la presente descripción.

En otro enfoque ilustrativo, pero no limitante las células de aspiración con aguja fina pueden inyectarse directamente en el reactivo de lisis. La muestra puede continuar con el procedimiento de lisis. En ciertas modalidades, es posible transportar la muestra (en el reactivo de lisis) a un sitio diferente donde puede completarse el procedimiento de análisis. En ciertas modalidades la muestra de aspiración con aguja fina puede convertirse, además, en un botón de células FFPE.

El uso de aspirados con aguja fina proporciona un método para evitar el tedioso proceso de preparación de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina y puede acelerar significativamente el proceso de prueba. Este método puede ser bastante útil en áreas en desarrollo del mundo.

En adición, para los aspirados con aguja fina, se apreciará, además, que los reactivos (por ejemplo, solución de lisis) y los métodos de uso de estos son enmendables para usar esencialmente con cualquier método de recolección de células. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a raspados (por ejemplo, raspados bucales, raspados ginecológicos, raspados de garganta, raspados durante procedimientos quirúrgicos, etc.), toallitas (obtenidas, por ejemplo, con un bastoncillo de algodón) y aspirados que incluyen, pero no se limitan a biopsias asistidas por vacío.

En ciertas modalidades ilustrativas, pero no limitantes, la muestra comprende un área o tejido enfermo que comprende células de un cáncer. En algunas modalidades el cáncer comprende un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, linfoma), cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoide atípico, cáncer de las vías biliares, cáncer extrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de huesos (por ejemplo, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno), glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales (por ejemplo, astrocitomas, tumores de cerebro y médula espinal, glioma del tronco encefálico, tumor teratoideo/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, tumores de células germinales del sistema nervioso central, craneofaringioma, ependimoma, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumores carcinoides (por ejemplo, infantil, gastrointestinal), tumores cardíacos, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma de células T cutáneo, cánceres de vías, por ejemplo, (bilis, extrahepático), carcinoma ductal in situ (DCIS), tumores embrionarios, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, esteseoneuroblastoma, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadal, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer ocular (por ejemplo, melanoma intraocular, retinoblastoma), histiocitoma fibroso óseo, maligno, y osteosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinóide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumores de células germinales (por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer extracraneal, cáncer extragonadal, de sistema nervioso central), tumor trofoblástico gestacional, cáncer de tronco encefálico, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cardíaco, cáncer hepatocelular (de hígado), histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de islotes, tumores neuroendocrinos pancreáticos, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (por ejemplo, de células renales, tumor de Wilm, y otros tumores de riñón),

5 histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, linfoblástico agudo (ALL), mieloides agudo (AML), linfocítico crónico (CLL), mielógeno crónico (CML), cáncer de células pilosas, labio y cavidad oral, cáncer de hígado (primario), carcinoma lobular in situ (LCIS), cáncer de pulmón (por ejemplo, infantil, de células no pequeñas, de células pequeñas), linfoma (por ejemplo, relacionado con el SIDA, de Burkitt (por ejemplo, linfoma no Hodgkin), de células T cutáneo (por ejemplo, micosis fungoide, síndrome de Sezary), de Hodgkin, no-Hodgkin, de sistema nervioso central primario (CNS)), macroglobulinemia, de Waldenstrom, cáncer de mama masculino, histiocitoma fibroso maligno óseo y osteosarcoma, melanoma (por ejemplo, infantil, intraocular (ojo)), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, carcinoma del tracto de la línea media, cáncer de boca, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasma de células plasmáticas, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, leucemia mielógena, crónica (CML), mieloma múltiple, cáncer de cavidad nasal y seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral, cáncer de labio y orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, tumores neuroendocrinos pancreáticos (tumores de células de islotes), papilomatosis, paraganglioma, cáncer cavidad nasal y seno paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumor pituitario, neoplasma de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central (CNS), cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (riñón), cáncer de células transicionales, de pelvis renal y uréter, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma (por ejemplo, de Ewing, Kaposi, osteosarcoma, radomiosarcoma, de tejidos blandos, uterino), síndrome de Sezary, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células basales, no melanoma), cáncer de intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso con primario oculto, cáncer de estómago (gástrico), cáncer testicular, cáncer de garganta, carcinoma tímico y timoma, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer uterino, cáncer de endometrio, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilm, y lo similar.

25 Se reconocerá que se cree que los métodos descritos en la presente descripción son compatibles con esencialmente cualquier muestra de tejido embebido en parafina fijado (por ejemplo, fijado con formalina, fijado con glutaraldehído, etc.). Tales muestras incluyen, pero no se limitan a biopsias y aspirados con aguja fina y muestras archivadas (por ejemplo, micromatrices de tejidos), y lo similar.

30 Calentamiento

En algunas modalidades, una o más secciones de tejido se calientan en la solución de lisis. A este respecto, se observa que cuando se usan secciones más delgadas es posible y puede ser deseable utilizar una pluralidad de secciones (por ejemplo, al menos 2 secciones, o al menos 3 secciones, o al menos 4 secciones, o al menos 5 secciones, o al menos 6 secciones, o al menos 7 secciones, o al menos 8 secciones, o al menos 9 secciones, o al menos 10 secciones). Particularmente donde la sección tiene 5 mm de grosor o son más pequeñas, pueden ser deseables secciones múltiples.

40 En algunos aspectos de la divulgación, las secciones se calientan en solución de lisis a una temperatura de aproximadamente 40 °C hasta aproximadamente 110 °C. En algunos aspectos de la divulgación las secciones se calientan a una temperatura que está en el intervalo de aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 45 °C, o de aproximadamente 50 °C, o de aproximadamente 55 °C, o de aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 65 °C, o de aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 74 °C hasta aproximadamente 110 °C, o hasta aproximadamente 100 °C, o hasta aproximadamente 95 °C, o hasta aproximadamente 90 °C. En algunas modalidades, las secciones se calientan a una temperatura que está en el intervalo de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 90 °C. En ciertas modalidades el calentamiento es a 80 °C.

50 En algunas modalidades, el tiempo de incubación está en el intervalo de aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 4 horas. En algunas modalidades, el tiempo de incubación está en el intervalo de aproximadamente 10 minutos, o de aproximadamente 15 minutos, o de aproximadamente 20 minutos, o de aproximadamente 25 minutos, o de aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 24 horas, o hasta aproximadamente 12 horas, o hasta aproximadamente 6 horas, o hasta aproximadamente 4 horas, o hasta aproximadamente 3,5 horas, o hasta aproximadamente 3 horas, o hasta aproximadamente 2,5 horas, o hasta aproximadamente 2 horas, o hasta aproximadamente 1,5 horas, o hasta a aproximadamente 1 hora. En algunas modalidades, el tiempo de incubación está en el intervalo de aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 1 hora.

60 En una modalidad ilustrativa, pero no limitante, las una o más secciones se incuban (calientan) en la solución de lisis (por ejemplo, una solución como se muestra en la Tabla 1) durante aproximadamente 60 minutos a una temperatura de aproximadamente 80 °C. En otra modalidad ilustrativa, pero no limitativa, las una o más secciones se incuban (calientan) en la solución de lisis (por ejemplo, una solución como se muestra en la Tabla 1) durante aproximadamente 30 minutos a una temperatura de aproximadamente 90 °C.

65 Estas temperaturas y períodos de calentamiento son ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Mediante el uso de la enseñanza proporcionada en la presente descripción, un experto puede optimizar el protocolo para un tipo de muestra particular a un tiempo y temperatura particulares.

Recuperación de ácido nucleico

5 Después de que la sección o secciones de tejido se calientan en la solución de lisis, el ácido nucleico extraído (por ejemplo, ADN, ARN) puede recuperarse. Los expertos en la técnica conocen numerosos métodos para la recuperación de ADN y/o ARN.

10 En algunas modalidades, el ácido nucleico se precipita y/o se une a un sustrato sólido. La precipitación y/o unión a un sustrato se logra fácilmente mediante el uso de un alcohol, por ejemplo, un alcohol inferior (por ejemplo, un alcohol C₁-C₆). En algunas modalidades el alcohol es etanol o isopropanol. En algunas modalidades el alcohol es etanol. Se reconocerá que, en algunas modalidades, pueden usarse alcoholes secos.

15 En algunas modalidades el alcohol se usa simplemente para precipitar el(los) ácido(s) nucleico(s). En algunas modalidades, el alcohol se usa para precipitar los ácidos nucleicos en la presencia de una fase sólida compatible lo que da como resultado la unión del ácido nucleico a esa fase sólida.

20 Por ejemplo, en algunas modalidades, el tratamiento con alcohol se realiza en la presencia de un sustrato de vidrio o celulosa lo que da como resultado la unión del ácido nucleico o de los ácidos nucleicos a ese sustrato. Los contaminantes restantes pueden lavarse mientras se retienen los ácidos nucleicos recuperados que después están listos para la amplificación u otros usos.

25 En algunas modalidades la fase sólida comprende vidrio, sílice, o celulosa. La fase sólida puede proporcionarse por las paredes de un recipiente, como una fibra (por ejemplo, fibra de vidrio), como una membrana (por ejemplo, membrana de celulosa), en forma de perlas (por ejemplo, micropartículas, o nanopartículas, etc.), y lo similar.

En ciertas modalidades, la recuperación de ácido nucleico puede realizarse en un cartucho GENEXPERT®, por ejemplo, como se describe a continuación.

30 Usos ilustrativos del ADN y/o ARN extraído

Los ácidos nucleicos extraídos mediante el uso de los métodos y reactivos descritos en la presente descripción son de buena calidad y pueden amplificarse fácilmente para detectar y/o cuantificar una o más secuencias de ácido nucleico objetivo en la muestra. Los ácidos nucleicos son particularmente adecuados para reacciones de amplificación por PCR que incluyen, pero no se limitan a RT-PCR. Aunque en algunas modalidades, los ácidos nucleicos extraídos se usan en reacciones de amplificación, se contemplan, además, otros usos. Así, por ejemplo, los ácidos nucleicos extraídos (o su(s) producto(s) de amplificación) pueden usarse en diversos protocolos de hibridación que incluyen, pero no se limitan a micromatrices basadas en ácido nucleico.

40 Los métodos de extracción nucleica y los reactivos descritos en la presente descripción son aplicables a la investigación básica dirigida al descubrimiento de perfiles de expresión génica relevantes para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Los métodos son aplicables, además, al diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad, la determinación de regímenes de tratamiento particulares, la supervisión de la efectividad del tratamiento y lo similar.

45 Los métodos descritos en la presente descripción producen de manera simple y eficiente ácidos nucleicos extraídos muy adecuados para su uso en sistemas de RT-PCR. Si bien pueden usarse en cualquiera de tales sistemas, en algunas modalidades, como se ilustra en la presente descripción en los ejemplos, los ácidos nucleicos son particularmente muy adecuados para su uso en los sistemas y cartuchos GENEXPERT® (Cepheid Systems Inc.).

50 El sistema GENEXPERT® es una plataforma cerrada, autónoma, totalmente integrada y automatizada que representa un cambio de paradigma en la automatización del análisis molecular, que produce resultados precisos de manera oportuna con un riesgo mínimo de contaminación. El sistema GENEXPERT® combina la preparación de muestras en el lugar (en cartucho) con funciones de amplificación y detección por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real para un análisis de ácido nucleico totalmente integrado y automatizado en un cartucho (cartucho GENEXPERT®). El sistema se diseñó para purificar, concentrar, detectar e identificar secuencias de ácido nucleico seleccionadas como objetivo y entrega de esta manera respuestas directamente a partir de las muestras (ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núm. 5,958,349, 6,403,037, 6,440,725, 6,783,736, y 6,818,185). En diversas modalidades, los componentes del cartucho pueden incluir, pero no se limitan a, cámaras de procesamiento que contienen reactivos, filtros, y tecnologías de captura útiles para extraer, purificar, y amplificar ácidos nucleicos objetivo. Una válvula permite la transferencia de fluido de una cámara a otra y contiene componentes de filtración y lisis de ácidos nucleicos. Una ventana óptica permite la detección óptica en tiempo real (por ejemplo, de productos de amplificación por PCR). Puede proporcionarse un tubo de reacción que permita un calentamiento muy rápido y/o ciclos térmicos.

65 En ciertas modalidades un cartucho GENEXPERT® ilustrativo comprende una pluralidad de cámaras dispuestas alrededor de un conjunto de válvula central y selectivamente en comunicación fluida con el conjunto de válvula

central donde el conjunto de válvula central se configura para acomodar un émbolo que es capaz de extraer fluido dentro o fuera de una cámara en comunicación fluida con la válvula central. La rotación del conjunto de válvula determina qué cámara está en comunicación fluida con la válvula central.

5 Por consiguiente, en algunas modalidades, se proporcionan métodos para la identificación y/o medición cuantitativa de una secuencia de ácido nucleico objetivo en una muestra de tejido embebido en parafina fijado (opcionalmente mediante la utilización de un cartucho y sistema GENEXPERT®). En algunas modalidades los métodos comprenden extraer un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN, un ARN) a partir de una muestra de tejido biológico embebido en parafina fijado de acuerdo con cualquiera de los métodos de extracción descritos en la presente descripción, y someter el ácido nucleico extraído a amplificación mediante el uso de un par de cebadores oligonucleotídicos capaces de amplificar una región de un ácido nucleico objetivo, para obtener una muestra amplificada; y determinar la presencia y/o cantidad del ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es un ADN (por ejemplo, un gen). En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es un ARN (por ejemplo, un ARNm, un ARN no codificante, y lo similar).

15 En algunas modalidades, los ácidos nucleicos extraídos mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción son muy adecuados para su uso en métodos de diagnóstico, métodos de pronóstico, métodos de supervisión de tratamientos (por ejemplo, tratamiento contra el cáncer), y lo similar. Por consiguiente, en algunas modalidades ilustrativas, pero no limitantes, los ácidos nucleicos extraídos de muestras embebidas en parafina fijadas (por ejemplo, de muestras de FFPE) pueden usarse para identificar la presencia y/o el nivel de expresión de un gen, y/o el estado mutacional de un gen.

25 Tales métodos son particularmente adecuados para la identificación de la presencia, y/o nivel de expresión, y/o estado mutacional de uno o más marcadores de cáncer. Por consiguiente, en algunas modalidades, los ácidos nucleicos extraídos mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción se utilizan para detectar la presencia, y/o número de copias, y/o nivel de expresión, y/o estado mutacional de uno o más marcadores de cáncer. Los marcadores de cáncer ilustrativos, pero no limitantes se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Marcadores de cáncer ilustrativos, pero no limitantes, y usos asociados.

Marcador de cáncer	Cáncer	Usos
Reordenamientos del gen de ALK	Cáncer de pulmón de células no pequeñas y linfoma de células grandes anaplásico	Para ayudar a determinar el tratamiento y pronóstico.
Alfafetoproteína (AFP)	Cáncer de hígado y tumores de células germinales	Para ayudar a diagnosticar el cáncer de hígado y seguir la respuesta al tratamiento; para evaluar el estadio, pronóstico, y respuesta al tratamiento de los tumores de células germinales
Beta-2-microglobulina (B2M)	Mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, y algunos linfomas	Para determinar el pronóstico y seguir la respuesta al tratamiento
Gonadotropina coriónica beta-humana (Beta-hCG)	Coriocarcinoma y cáncer testicular	Evaluar el estadio, pronóstico, y respuesta al tratamiento
Gen de fusión BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica	Para confirmar el diagnóstico y supervisar el estado de la enfermedad
Mutación de BRAF V600E	Melanoma cutáneo y cáncer colorrectal	Para predecir la respuesta a las terapias dirigidas
CA15-3/CA27.29	Cáncer de mama	Para evaluar si el tratamiento funciona o si la enfermedad recurrió

ES 2 795 048 T3

5	CA19-9	Cáncer pancreático, cáncer de vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, y cáncer gástrico	Para evaluar si el tratamiento funciona
10	CA-125	Cáncer de ovario	Para ayudar en el diagnóstico, evaluación de la respuesta al tratamiento, y evaluación de la recurrencia
15	Calcitonina	Cáncer medular de tiroides	Para ayudar en el diagnóstico, verifique si el tratamiento funciona y evalúe la recurrencia.
20	Antígeno carcinoembrionario (CEA)	Cáncer colorrectal y cáncer de mama	Para verificar si el cáncer colorrectal se diseminó; para investigar la recurrencia del cáncer de mama y evaluar la respuesta al tratamiento
25	CD20	linfoma no Hodgkin	Para determinar si el tratamiento con una terapia dirigida es apropiado
30	Cromogranina A (CgA)	Tumores neuroendocrinos	Para ayudar en el diagnóstico, la evaluación de la respuesta al tratamiento y la evaluación de la recurrencia.
35	Cromosomas 3, 7, 17, y 9p21	Cáncer de vejiga	Para ayudar a supervisar la recurrencia tumoral
40	Fragmentos de citoqueratina 21-1	Cáncer de pulmón	Para ayudar en la supervisión de la recurrencia
45	Análisis de mutación de EGFR	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Para ayudar a determinar el tratamiento y pronóstico.
50	Receptor de estrógeno (ER)/receptor de progesterona (PR)	Cáncer de mama	Para determinar si el tratamiento con terapia hormonal (tal como tamoxifeno) es apropiado
55	Fibrina/fibrinógeno	Cáncer de vejiga	Para supervisar la progresión y respuesta al tratamiento
60	HE4	Cáncer de ovario	Evaluar la progresión de la enfermedad y supervisar la recurrencia
65	HER2/neu	Cáncer de mama, cáncer gástrico, y cáncer de esófago.	Para determinar si el tratamiento con trastuzumab es apropiado

ES 2 795 048 T3

5	Inmunoglobulinas	Mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenstrom	Para ayudar a diagnosticar la enfermedad, evaluar la respuesta al tratamiento, e investigar la recurrencia
10	KIT	Tumor del estroma gastrointestinal y melanoma de la mucosa	Para ayudar a diagnosticar y determinar el tratamiento
15	Análisis de mutación de KRAS	Cáncer colorrectal y cáncer de pulmón de células no pequeñas	Para determinar si el tratamiento con un tipo particular de terapia dirigida es apropiado
20	Lactato deshidrogenasa	Tumores de células germinales	Evaluar el estadio, pronóstico, y respuesta al tratamiento
25	Proteína de matriz nuclear 22	Cáncer de vejiga	Para supervisar la respuesta al tratamiento
30	Antígeno prostático específico (PSA)	Cáncer de próstata	Para ayudar en el diagnóstico, evaluar la respuesta al tratamiento, e investigar la recurrencia
35	Tiroglobulina	Cáncer de tiroides	Evaluar la respuesta al tratamiento e investigar la recurrencia
40	Activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA) e inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1)	Cáncer de mama	Para determinar la agresividad del cáncer y guiar el tratamiento
45	Firma de 5 proteínas (Ova1)	Cáncer de ovario	Para evaluar preoperatoriamente la masa pélvica por sospecha de cáncer de ovario
50	Firma de 21 genes (Oncotipo DX)	Cáncer de mama	Para evaluar el riesgo de recurrencia
55	Firma de 70-genes (Mammaprint)	Cáncer de mama	Para evaluar el riesgo de recurrencia

En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo comprende un microARN descrito en las publicaciones de patente de EE. UU. núm.: 2012/0171686 y 2009/0062135. En algunas modalidades el ácido nucleico objetivo comprende un marcador de ácido nucleico para determinar la presencia y/o gravedad y/o pronóstico del cáncer de pulmón. En algunas modalidades el ácido nucleico objetivo comprende un marcador de ácido nucleico objetivo para cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas) descrito en la publicación de patente de EE. UU. núm. 2010/0233704. En algunas modalidades el ácido nucleico objetivo comprende un marcador de ácido nucleico para determinar la presencia y/o gravedad y/o pronóstico de cáncer cervical y/o displasia cervical. En algunas modalidades el ácido nucleico objetivo comprende un marcador de ácido nucleico objetivo para displasia cervical y/o cáncer cervical descrito en la publicación de patente de EE. UU. núm. 2010/0240049.

Los ácidos nucleicos objetivos anteriores son ilustrativos y no limitantes. Mediante el uso de la enseñanza proporcionada en la presente descripción, numerosas otras secuencias de ácido nucleico objetivo estarán disponibles para un experto en la técnica.

5 En algunas, un nivel normal (un "control") para cada ácido nucleico objetivo (por ejemplo, ARN) puede determinarse como un intervalo o nivel promedio (o mediana) que es característico de las células normales u otro material de referencia, contra el cual el nivel medido en la muestra puede compararse. El promedio determinado (o mediana) o intervalo de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, ARN) en sujetos normales puede usarse como punto de referencia para detectar niveles por encima de lo normal de ARN objetivo indicativos de un estado de enfermedad (por ejemplo, la presencia de o predilección por un cáncer). En algunas modalidades, los niveles normales de ácido nucleico objetivo pueden determinarse mediante el uso de muestras que contienen ARN individuales o agrupadas de uno o más individuos, tales como, en el caso de cáncer cervical, de pacientes sometidos a histerectomía por enfermedad ginecológica benigna.

15 En algunas modalidades, determinar un nivel normal de expresión de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, ARN) comprende detectar un complejo que comprende una sonda hibridada con un ácido nucleico seleccionado de un ARN objetivo, un amplicón de ADN del ARN objetivo, y un complemento del ARN objetivo. Es decir, en algunas modalidades, puede determinarse un nivel normal de expresión mediante la detección de un amplicón de ADN del ARN objetivo, o un complemento del ARN objetivo en lugar del propio ARN objetivo. En algunas modalidades, se determina un nivel normal de tal complejo y se usa como control. El nivel normal del complejo, en algunas modalidades, se correlaciona con el nivel normal del ARN objetivo.

25 En algunas modalidades, un control comprende ARN de células de un solo individuo, células que se sabe que son sanas del mismo sujeto. En algunas modalidades, un control comprende ARN de un grupo de células de múltiples individuos. En algunas modalidades, se extrae un control de áreas anatómicamente y/o citológicamente normales del individuo del que se obtuvo la muestra de prueba. En algunas modalidades, un control comprende ARN humano disponible comercialmente, tal como, por ejemplo, en el caso del cáncer cervical, ARN total de cuello uterino humano (Ambion; AM6992). En algunas modalidades, un nivel normal o intervalo normal ya se predeterminó antes de analizar una muestra para comprobar un nivel elevado.

35 En algunas modalidades, el nivel normal de ARN objetivo puede determinarse a partir de una o más líneas celulares continuas, típicamente líneas celulares que previamente mostraron tener niveles de expresión del al menos un ARN objetivo que se aproxima al nivel de expresión en células normales.

40 En algunas modalidades, un método comprende detectar el nivel de expresión de al menos un ARN objetivo. En algunas modalidades, un método comprende, además, comparar el nivel de expresión de al menos un ARN objetivo con un nivel normal de expresión del al menos un ARN objetivo. En algunas modalidades, un método comprende, además, comparar el nivel de expresión de al menos un ARN objetivo con un nivel de expresión de control del al menos un ARN objetivo. Un nivel de expresión de control del al menos un ARN objetivo es, en algunas modalidades, el nivel de expresión del al menos un ARN objetivo en una célula normal. En algunas de tales modalidades, un nivel de control puede denominarse un nivel normal. En algunas modalidades, un mayor nivel de expresión del al menos un ARN objetivo en relación con el nivel de expresión del al menos un ARN objetivo en una célula normal indica displasia cervical.

45 En algunas modalidades, el nivel de expresión del al menos un ARN objetivo se compara con un nivel de expresión de referencia, por ejemplo, de una neoplasia confirmada. En algunas de tales modalidades, un nivel similar de expresión del al menos un ARN objetivo en relación con la muestra de referencia indica la presencia de una neoplasia.

50 En algunas modalidades, un nivel de expresión de al menos un ARN objetivo que es al menos aproximadamente dos veces mayor que un nivel normal de expresión del respectivo al menos un ARN objetivo indica la presencia de un estado de enfermedad (por ejemplo, un cáncer). En algunas modalidades, un nivel de expresión de al menos un ARN objetivo que es al menos aproximadamente dos veces mayor que el nivel del respectivo al menos un ARN objetivo en una muestra de control compuesta de células normales indica la presencia de un cáncer. En algunas modalidades, un nivel de expresión de al menos un ARN objetivo que es al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de expresión del respectivo al menos un ARN objetivo en una muestra de control compuesta de células normales indica la presencia de un cáncer. En algunas modalidades, un nivel de expresión de al menos un ARN objetivo que es al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces mayor que un nivel normal de expresión del al menos un ARN objetivo indica la presencia de un cáncer.

En algunas modalidades, un nivel de expresión de control de un ARN objetivo se determina simultáneamente, tal como en el mismo ensayo o lote de ensayos, como el nivel de expresión del ARN objetivo en una muestra. En algunas modalidades, un nivel de expresión de control de un ARN objetivo no se determina simultáneamente como el nivel de expresión del ARN objetivo en una muestra. En algunas de tales modalidades, el nivel de expresión de control se determinó previamente.

En algunas modalidades, el nivel de expresión de un ARN objetivo no se compara con un nivel de expresión de control, por ejemplo, cuando se sabe que el ARN objetivo se expresa a niveles muy bajos, o no se expresa en absoluto, en células normales. En tales modalidades, la detección de un alto nivel del ARN objetivo en una muestra es indicativo de un cáncer.

Kits

En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan kits para la extracción de un ácido nucleico de una muestra de células y/o tejidos. En ciertos aspectos de la divulgación el kit típicamente comprenderá un recipiente que contiene una solución de lisis como se describe en la presente descripción. En ciertos aspectos de la divulgación el kit comprende, además, un recipiente que contiene una proteasa (por ejemplo, proteinasa K, tripsina, quimotripsina, papaína, etc.). En ciertos aspectos de la divulgación la proteasa y la solución de lisis se mezclan entre sí. En ciertos aspectos de la divulgación la proteasa y la solución de lisis se proporcionan en recipientes separados.

En ciertos aspectos de la divulgación el kit puede comprender, además, un dispositivo para la recolección de una muestra de células o tejidos. Los dispositivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo o punta de dispositivo para realizar un raspado, una toallita, un dispositivo o punta de dispositivo para obtener un aspirado, un dispositivo de biopsia por punción, y una cuchilla para obtener una biopsia de piel. Por ejemplo, en ciertos aspectos de la divulgación, el kit comprende un dispositivo o punta de dispositivo para obtener un aspirado con aguja fina y/o para obtener un aspirado asistido por vacío. En ciertos aspectos de la divulgación el kit comprende un dispositivo para realizar un raspado bucal, o un raspado ginecológico. Los dispositivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a una multiespátula, una espátula de punta extendida, una citocepillo, un cytopick, una cervexbrush, un hisopo, un cepillo de bayne, un cepillo de perfil, un aspirador de bulbo, una espátula de Ayre, un dispositivo de Aylesbury, y lo similar. En aspectos típicos de la divulgación el dispositivo para la recolección de una muestra de células o tejidos se proporciona en un embalaje que conserva la esterilidad del dispositivo de recolección de muestras antes de su uso.

En ciertos aspectos de la divulgación el kit puede comprender un recipiente configurado para recibir una muestra de células o tejidos y almacenar esa muestra en dicha solución de lisis o en un tampón. En ciertos aspectos de la divulgación el contenedor configurado para recibir una muestra de células o tejidos se configura para almacenamiento y/o envío. Así, en ciertos aspectos de la divulgación, el contenedor configurado para recibir una muestra de células o tejidos, se proporciona con una etiqueta para identificar la muestra, y, en ciertos aspectos de la divulgación con un empaque sellable para mantener el contenedor durante el almacenamiento y/o envío y/o un contenedor de envío.

En ciertos aspectos de la divulgación el kit puede incluir opcionalmente una torunda estéril (por ejemplo, una torunda con alcohol) para limpiar el sitio de la muestra, y/o una almohadilla de secado (por ejemplo, una almohadilla de gasa) para secar el sitio, y/o un vendaje (por ejemplo, venda) para vendar el sitio después de obtener la muestra.

En ciertos aspectos de la divulgación, los componentes para una sola operación de recolección se empaquetan juntos en un paquete. Tales paquetes pueden incluir, por ejemplo, un dispositivo de muestra desechable de un solo uso, opcionalmente un hisopo estéril, opcionalmente una almohadilla de secado, y opcionalmente un vendaje. En ciertos aspectos de la divulgación el kit incluye al menos 2 paquetes, o al menos 3 paquetes, o al menos 4 paquetes, o al menos 5 paquetes, o al menos 6 paquetes, o al menos 7 paquetes, o al menos 8 paquetes.

En ciertos aspectos de la divulgación el kit puede contener, además, materiales de instrucción que enseñan métodos de recolección que utilizan los componentes del kit y, opcionalmente, proporcionan orientación para superar los problemas que pueden ocurrir durante la recolección. Los materiales de instrucción pueden incluir, además, información y/o instrucciones sobre el uso del reactivo de lisis y/o instrucciones para la recolección, y/o almacenamiento, y/o envío de una muestra de células o tejidos. En ciertos aspectos de la divulgación, los kits contienen adicionalmente reactivos y/o instrucciones que enseñan el uso del tampón de lisis para el aislamiento y la recuperación de un ácido nucleico.

A menudo y típicamente los materiales de instrucción se proporcionan por escrito y pueden imprimirse en los componentes del kit (por ejemplo, en la tapa de una caja, contenedor, o en una envoltura, o pueden proporcionarse como una página de instrucción/inserto o folleto. Si bien los materiales de instrucción típicamente comprenden materiales escritos o impresos no se limitan a ellos. Esta divulgación contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlás a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo,

CD ROM), y lo similar. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan tales materiales de instrucción.

Ejemplos

5

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

10

Examen de los parámetros de la solución de lisis para la extracción de ácidos nucleicos a partir del tejido embebido en parafina fijado con formalina

Experimento A:

15

Objetivos: Realizar un tratamiento con Proteinasa K mediante el uso de un tampón de prueba, seguido de lisis de FFPE modificada en el paciente 015445T2.

Muestras: láminas de paciente FFPE (4), 015445T2. 4 µm de grosor y aplicado a portaobjetos de vidrio.

IHC/FISH: ER: rico, PR: rico, HER2: amplificado.

Tabla 5. Resultados

20

Pt 015445T2 (N = 4)	umbral del ciclo				
	PGR	ESR	gen de referencia	ERBB2	MKi67
Control de FFPE	31,1	27,3	30,8	30,0	31,8
Control del kit de Qiagen	27,4	24,1	28,3	27,7	28,3
Qiagen, + Depar, sin Pro K	32,8	28,9	32,7	31,5	34,0
Qiagen, sin Depar, + Pro K	26,7	22,4	27,7	26,4	27,0
CPHD Pro K (56 C) + mFFPE (80 C)	25,8	21,8	26,2	25,5	26,5
	delta Ct				
	ESR	PGR	ERBB2		
Control de FFPE	3,5	-0,3	0,8		
Control del kit de Qiagen	4,2	0,9	0,6		
Qiagen, + Depar, sin Pro K	3,8	-0,1	1,2		
Qiagen, sin Depar, + Pro K	5,2	1,0	1,3		
CPHD Pro K (56 C) + mFFPE (80 C)	4,4	0,5	0,7		

25

30

35

40

45

Experimento B:

50

Objetivos: Probar el reactivo de lisis de FFPE con 0,01 % de emulsión en lugar de antiespumante en la lámina de Pt 015445T2.

Láminas de la muestra. Lámina del paciente FFPE, 015445T2. 4µm de grosor y aplicado a vidrio

IHC/FISH: ER: rico, PR: rico, HER2: amplificado.

Tabla 6. Resultados

	Pt 015445T2 (N = 4)	umbral del ciclo				
		PGR	ESR	gen de referencia	ERBB2	MKi67
5	FFPE original + 0,01 % AF (80 C, 60 m)	31,1	27,3	30,8	30,0	31,8
10	Control del kit de Qiagen	27,4	24,1	28,3	27,7	28,3
	m2FFPE con Proteinasa K, (80 C, 30 m)	26,5	22,4	26,9	26,2	26,9
	FFPE original + 0,01 % de emulsión (80 C, 60 m)	30,4	26,4	30,2	29,6	31,4
15						
		delta Ct				
		ESR	PGR	ERBB2		
20	FFPE original + 0,01 % AF (80 C, 60 m)	3,5	-0,3	0,8		
	Control del kit de Qiagen	4,2	0,9	0,6		
	m2FFPE con Proteinasa K, (80 C, 30 m)	4,5	0,4	0,7		
25	FFPE original + 0,01 % de emulsión (80 C, 60 m)	3,8	-0,3	0,6		

Experimento C:

Objetivos: Optimizar la cantidad de PK adicionada durante la lisis fuera del lugar (antes de la etapa de calentamiento).
 Botones de células FFPE Alamak, BT474.

Tabla 7. Resultados

	BT474 (N=4)	umbral del ciclo				
		PGR	ESR	gen de referencia	ERBB2	MKi67
35	sin PK	28,5	30,4	31,3	28,7	33,6
40	20 uL de PK (80 C, durante la noche)	27,8	29,5	30,7	28,4	32,5
	5 uL de PK	24,6	27,6	29,4	26,2	30,7
45	10 uL de PK	24,6	27,9	29,9	26,7	31,0
	20 uL de PK	24,6	27,6	29,5	26,4	31,3
	40 uL de PK	24,6	27,5	29,5	25,9	30,7
50						
		delta Ct				
		ESR	PGR	ERBB2		
55	sin PK	0,9	2,8	2,6		
	20 uL de PK (80 C, durante la noche)	1,2	3,0	2,3		
60	5 uL de PK	1,8	4,8	3,2		
	10 uL de PK	2,1	5,3	3,3		
	20 uL de PK	1,9	4,9	3,1		
65	40 uL de PK	2,0	4,9	3,6		

Experimento D, variación de la concentración A de NaCl:

Tabla 8. Resultados -- Efecto de la concentración de NaCl.

Conc. de NaCl	PGR	ESR	CYFIP1	ERBB2	MKi67
200 mM	25,6	22,8	29,7	26,9	31,7
200 mM	26,5	28,3	29,4	27,3	31,2
200 mM	26,6	28,3	30,1	27,6	31,7
200 mM	26,1	26,9	29,3	26,4	31,1
300 mM	24,8	26,7	29,2	25,5	30,1
300 mM	25,6	28,1	29,8	26,7	30,8
300 mM	25,0	27,6	29,0	26,0	30,6
300 mM	25,1	27,6	29,4	25,5	30,7
400 mM	24,6	27,4	29,5	25,7	30,7
400 mM	25,4	28,2	29,7	26,2	31,0
400 mM	24,5	26,9	29,4	25,5	30,8

La Figura 2A muestra el umbral del ciclo en función de la concentración de NaCl para ESR y PGR. La Figura 2B muestra el umbral del ciclo en función de la concentración de NaCl para ERBB2 y CYFIP1. La Figura 2C muestra el umbral del ciclo en función de la concentración de NaCl para MKi67.

Experimento E, mediante la variación de la concentración B de NaCl:

Objetivos: Procesar muestras de botón de células BT474 con formulaciones de lisis m3FFPE, m3cFFPE, m3dFFPE y m3eFFPE.

Muestras: botones de células FFPE BT474, cortados y almacenados a 4 °C. 4 um de grosor y aplicado a portaobjetos de vidrio

Preparar:

Cada lámina se transfirió a un tubo etiquetado de 1,5 ml.

Se adicionaron 1,2 ml de cada reactivo de lisis designado a su tubo.

Se adicionaron 20 µl de proteinasa K a cada muestra.

Las muestras se sometieron a vórtice durante 5 segundos, después se incubaron a 80 C durante 30 minutos.

Las muestras se sometieron a vórtice durante 5 segundos y se hizo girar el pulso.

Cada muestra se transfirió a un vial marcado de 5 ml que contenía 1,2 mL de etanol al 100 %.

Las muestras se sometieron a vórtice cada una durante al menos 15 segundos.

El cartucho A's, NGB, se preparó con perlas de reacción en la cámara 11 y los reactivos líquidos en las cámaras 2 y 5.

Se transfirieron cuatro alícuotas de 520 µl de cada muestra a la cámara 3 en sus cartuchos designados.

Todos los carros se ejecutaron mediante el uso el ADF 140421 Strat + sonicado 2 X.

Tabla 9. Resultados

BT474 (N=4)	umbral del ciclo					Estado de la línea celular
	PGR	ESR	CYFIP1	ERBB2	MKi67	
m3FFPE (NaCl 200 nM)	25,4	27,6	29,6	26,1	30,8	ER: pos, PR: pos, HER2: amplificado
m3cFFPE (NaCl 400 nM)	24,6	27,2	28,8	25,4	29,8	
m3dFFPE (NaCl 800 nM)	25,4	27,8	29,4	26,1	31,0	
m3eFFPE (NaCl 1200 nM)	26,1	28,3	29,9	26,6	31,5	
	delta Ct					
	ESR	PGR	ERBB2			
m3FFPE (NaCl 200 nM)	2,0	4,2	3,5			
m3cFFPE (NaCl 400 nM)	1,6	4,2	3,4			
m3dFFPE (NaCl 800 nM)	1,6	4,1	3,4			
m3eFFPE (NaCl 1200 nM)	1,5	3,7	3,2			

Experimento F, variación de las concentraciones de antiespumante.

Objetivos: Procesar los botones de células FFPE BT474 con reactivos de lisis de FFPE m3f con diferentes concentraciones de antiespumante.

Muestras: botones de células de FFPE BT474. Las láminas tienen un grosor de 4 um y se aplican a portaobjetos de vidrio.

Preparar:

Cada lámina se transfirió a un tubo etiquetado de 1,5 ml.

Se adicionaron 1,2 ml de cada reactivo de lisis designado a su tubo.

Las muestras se sometieron a vórtice durante 5 segundos, después se incubaron a 80 °C durante 30 minutos.

Las muestras se sometieron a vórtice durante 5 segundos y se hizo girar el pulso.

Cada muestra se transfirió a un vial marcado de 5 ml que contenía 1,2 mL de etanol al 100 %.

Las muestras se sometieron a vórtice cada una durante al menos 15 segundos.

Los carros A, NGB, se prepararon con perlas de reacción en la cámara 11 y los reactivos líquidos en las cámaras 2 y 5.

Se transfirieron cuatro alícuotas de 520 ul por condición de prueba a la cámara 3 en sus cartuchos designados.

Todos los carros se ejecutaron mediante el uso el ADF 140421 Strat + sonicado 2 X.

Tabla 10. Resultados:

Condición de prueba (N=4)	umbral del ciclo					delta Ct		
	PGR	ESR	CYFIP 1	ERBB 2	MKi6 7	ESR	PGR	ERBB 2
0,10 % de antiespumante	25,8	27,6	30,1	27,3	32,2	2,5	4,3	2,8
0,04 % de antiespumante	25,1	27,4	29,3	26,4	31,1	1,9	4,2	2,9
0,01 % de antiespumante	25,8	27,9	29,2	26,2	31,5	1,3	3,4	2,9
0,005 % de antiespumante	25,2	27,6	29,4	26,4	31,6	1,8	4,2	3,0

Experimento G, estudio de estabilidad de la muestra:

Adicionalmente se realizó un estudio de estabilidad del lisado en el que se lisaron botones de células FFPE y muestras de pacientes FPE, se mezclaron con etanol y después se almacenaron a -20 °C con las fechas de prueba programadas (ver, por ejemplo, la Tabla 11, a continuación, y las Figuras 3A y 3B).

Tabla 11. Resultados del estudio de estabilidad.

muestra	lisis	día	PGR	ESR	CYFIP1	ERBB2	MKi67
015465T2	m3f	0	26,9	20,3	26,0	24,7	25,4
015465T2	m3f	7	26,6	20,3	26,6	25,5	25,5
015465T2	m3f	15	27,2	20,7	26,6	24,6	25,1
015465T2	m3f	28	27,3	20,8	26,4	24,0	26,3
015465T2	m3f	35	27,3	21,1	26,9	25,4	26,4
015465T2	m3f	62	27,7	21,4	27,2	24,8	27,0
BT474	m3f	0	25,8	28,2	29,7	26,5	31,4
BT474	m3f	7	25,5	27,6	29,4	26,4	31,4
BT474	m3f	15	25,6	27,6	29,1	26,2	31,4
BT474	m3f	28	25,7	28,1	29,7	27,2	31,3
BT474	m3f	35	25,5	28,3	29,7	26,2	31,3
BT474	m3f	62	25,9	28,2	29,2	26,6	32,7
RA00-0741	m3f	0	35,1	21,9	25,7	24,0	25,7
RA00-0741	m3f	7	34,8	22,2	25,7	23,8	25,8
RA00-0741	m3f	15	37,8	22,1	25,9	23,6	25,6
RA00-0741	m3f	28	40,7	22,1	25,8	23,6	26,6
RA00-0741	m3f	35	35,9	21,6	25,3	23,3	25,6
RA00-0741	m3f	62	45,0	21,7	25,3	22,8	26,1
015465T2	m5	0	27,9	20,6	26,5	24,5	24,7
015465T2	m5	7	27,1	21,1	26,4	24,6	25,8
015465T2	m5	15	28,9	22,9	27,5	26,3	27,5
015465T2	m5	28	28,5	21,7	27,3	26,3	26,5
015465T2	m5	35	29,1	22,8	28,6	27,1	27,6

ES 2 795 048 T3

5

10

15

20

015465T2	m5	62	29,6	21,3	28,4	27,3	27,1
BT474	m5	0	25,6	28,5	29,7	26,5	32,1
BT474	m5	7	25,9	28,2	29,6	26,6	32,3
BT474	m5	15	25,4	19,8	29,5	26,6	31,6
BT474	m5	28	25,7	27,9	29,2	26,5	30,8
BT474	m5	35	26,2	29,1	29,5	27,6	31,7
BT474	m5	62	26,2	28,5	29,6	27,3	31,5
RA00-0741	m5	0	34,7	23,5	26,9	25,1	27,1
RA00-0741	m5	7	35,1	22,5	25,9	24,8	25,9
RA00-0741	m5	15	37,9	21,7	26,0	24,2	25,5
RA00-0741	m5	28	37,1	22,2	25,7	24,9	26,0
RA00-0741	m5	35	36,7	22,2	26,1	24,6	25,4
RA00-0741	m5	62	37,4	23,2	26,4	25,2	25,9

25

La Figura 3A muestra la estabilidad (repetible del umbral del ciclo) para ESR, y PGR para muestras almacenadas durante 62 días. La Figura 3B muestra la estabilidad (repetible del umbral del ciclo) para ESR, y PGR para muestras almacenadas durante 62 días.

30 Experimento H, análisis de micromatriz de tejidos:

Objetivo: Probar los núcleos de la lámina 1 (bloque de TMA30 de Yale) en el ensayo estratificador.

35 Muestras de prueba: 30 núcleos en una sola lámina, bloque de TMA de Yale. Lámina YTMA 308-1, ER de mama, 1-29-15, lámina 1. La lámina se cortó con 4 um de grosor.

ES 2 795 048 T3

Tabla 12. Resultados:

ID de la muestra	Umbral del ciclo				
	CYFIP	PGR	ESR	ERBB2	MKi67
TMA30, lámina 1, A1	27,3	45,0	23,4	29,4	27,7
TMA30, lámina 1, A2	30,2	37,0	28,8	33,9	30,7
TMA30, lámina 1, A3	28,5	42,3	24,3	31,7	30,4
TMA30, lámina 1, A4	27,6	37,5	31,8	30,5	28,3
TMA30, lámina 1, A6	30,3	45,0	45,0	33,1	29,6
TMA30, lámina 1, B1	28,4	44,8	24,4	31,5	30,0
TMA30, lámina 1, B2	30,3	37,5	31,6	36,1	34,5
TMA30, lámina 1, B3	30,5	32,4	25,6	33,2	39,4
TMA30, lámina 1, B4	28,1	45,0	24,2	28,1	30,1
TMA30, lámina 1, B5	30,3	45,0	45,0	31,9	30,9
TMA30, lámina 1, B6	28,3	32,4	28,7	30,4	30,7
TMA30, lámina 1, C1	30,1	35,5	25,2	32,3	36,1
TMA30, lámina 1, C2	31,1	33,2	25,1	32,9	33,4
TMA30, lámina 1, C3	28,3	41,3	30,2	31,2	29,2
TMA30, lámina 1, C4	30,3	40,0	31,2	34,2	32,6
TMA30, lámina 1, C5	33,0	35,0	29,4	37,5	45,0
TMA30, lámina 1, C6	28,3	28,6	23,4	31,2	31,4
TMA30, lámina 1, D1	30,3	45,0	33,2	38,3	29,9
TMA30, lámina 1, D2	29,4	28,8	24,1	31,0	43,4
TMA30, lámina 1, D3	27,2	28,7	25,3	32,2	36,8
TMA30, lámina 1, D4	29,9	37,8	26,2	31,9	36,2
TMA30, lámina 1, D5	28,3	45,0	30,2	31,8	27,1
TMA30, lámina 1, D6	31,8	45,0	32,1	36,5	39,5
TMA30, lámina 1, E1	29,0	38,4	26,8	31,4	30,4
TMA30, lámina 1, E2	27,2	45,0	32,1	32,7	27,6
TMA30, lámina 1, E3	28,0	38,4	45,0	28,1	28,3
TMA30, lámina 1, E4	29,8	45,0	24,4	32,2	45,0
TMA30, lámina 1, E5	28,1	45,0	33,9	40,0	31,9
TMA30, lámina 1, E6	29,7	44,2	31,9	37,1	30,5
TMA30, lámina 1, E7	29,7	45,0	31,7	36,1	36,7

Tabla 13. Resultados:

ID de la muestra	Delta Ct			
	MKi67(-5)	ESR(-1)	PGR(-4)	ERBB2(0)
TMA30, lámina 1, A1	-0,4	3,9	-17,7	-2,1
TMA30, lámina 1, A2	-0,5	1,4	-6,8	-3,7
TMA30, lámina 1, A3	-1,9	4,2	-13,8	-3,2
TMA30, lámina 1, A4	-0,7	-4,2	-9,9	-2,9
TMA30, lámina 1, A6	0,7	-14,7	-14,7	-2,8
TMA30, lámina 1, B1	-1,6	4,0	-16,4	-3,1
TMA30, lámina 1, B2	-4,2	-1,3	-7,2	-5,8
TMA30, lámina 1, B3	-8,9	4,9	-1,9	-2,7
TMA30, lámina 1, B4	-2,0	3,9	-16,9	0,0
TMA30, lámina 1, B5	-0,6	-14,7	-14,7	-1,6
TMA30, lámina 1, B6	-2,4	-0,4	-4,1	-2,1
TMA30, lámina 1, C1	-6,0	4,9	-5,4	-2,2
TMA30, lámina 1, C2	-2,3	6,0	-2,1	-1,8
TMA30, lámina 1, C3	-0,9	-1,9	-13,0	-2,9
TMA30, lámina 1, C4	-2,3	-0,9	-9,7	-3,9
TMA30, lámina 1, C5	-12,0	3,6	-2,0	-4,5
TMA30, lámina 1, C6	-3,1	4,9	-0,3	-2,9
TMA30, lámina 1, D1	0,4	-2,9	-14,7	-8,0
TMA30, lámina 1, D2	-14,0	5,3	0,6	-1,6
TMA30, lámina 1, D3	-9,6	1,9	-1,5	-5,0
TMA30, lámina 1, D4	-6,3	3,7	-7,9	-2,0
TMA30, lámina 1, D5	1,2	-1,9	-16,7	-3,5
TMA30, lámina 1, D6	-7,7	-0,3	-13,2	-4,7
TMA30, lámina 1, E1	-1,4	2,2	-9,4	-2,4
TMA30, lámina 1, E2	-0,4	-4,9	-17,8	-5,5
TMA30, lámina 1, E3	-0,3	-17,0	-10,4	-0,1
TMA30, lámina 1, E4	-15,2	5,4	-15,2	-2,4
TMA30, lámina 1, E5	-3,8	-5,8	-16,9	-11,9
TMA30, lámina 1, E6	-0,8	-2,2	-14,5	-7,4
TMA30, lámina 1, E7	-7,0	-2,0	-15,3	-6,4

Tabla 14. Resultados:

ID de la muestra	llamada potencial del estratificador			
	MKi67	ER	PR	HER2
TMA30, lámina 1, A1	pos	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, A2	pos	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, A3	pos	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, A4	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, A6	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, B1	pos	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, B2	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, B3	bajo	pos	pos	neg
TMA30, lámina 1, B4	pos	pos	neg	pos
TMA30, lámina 1, B5	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, B6	pos	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, C1	bajo	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, C2	pos	pos	pos	neg
TMA30, lámina 1, C3	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, C4	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, C5	bajo	pos	pos	neg
TMA30, lámina 1, C6	pos	pos	pos	neg
TMA30, lámina 1, D1	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, D2	bajo	pos	pos	neg
TMA30, lámina 1, D3	bajo	pos	pos	neg
TMA30, lámina 1, D4	bajo	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, D5	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, D6	bajo	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, E1	pos	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, E2	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, E3	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, E4	bajo	pos	neg	neg
TMA30, lámina 1, E5	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, E6	pos	neg	neg	neg
TMA30, lámina 1, E7	bajo	neg	neg	neg

Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos en la presente descripción son solo para fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de estos se sugerirán a los expertos en la técnica y se incluirán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una solución de lisis para la extracción de un ácido nucleico de una muestra de células o tejidos, dicha solución de lisis comprende:
NaCl a una concentración mayor que 300 mM;
un tampón suficiente para mantener el pH de dicha solución a un pH en el intervalo de pH 6,8 a pH 7,3;
un agente quelante;
10 MgCl₂ a una concentración de al menos 2 mM, pero de menos de 50 mM; y
un detergente.
- 15 2. La solución de lisis de la reivindicación 1, en donde dicha solución comprende:
un agente antiespumante; y/o
un conservante/biocida.
- 20 3. La solución de lisis de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:
la concentración de dicho tampón está en el intervalo de 10 mM hasta 100 mM, o de 20 mM hasta 50 mM, o es 50 mM; y/o
el pH de dicha solución está en el intervalo de 6,8 a 7,2; y/o
dicho NaCl está en una concentración en el intervalo de 300 mM a 500 mM, o de 350 mM hasta 450 mM, o es 400 mM.
- 25 4. La solución de lisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
dicho agente quelante comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en N-acetil-L-cisteína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), y un agente quelante de fosfonato;
dicho detergente es un detergente iónico o un detergente no iónico;
30 dicho agente antiespumante comprende una emulsión antiespumante orgánica o una emulsión antiespumante basada en siloxano; y/o dicho biocida comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en azida sódica, deshidroacetato sódico, borato sódico decahidratado, y edetato disódico.
- 35 5. La solución de lisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
la concentración de dicho agente quelante en dicha solución está en el intervalo de 5 mM a 100 mM, o de 10 mM a 50 mM, o es de 25 mM; y/o
la concentración de dicho MgCl₂ está en el intervalo de 2 mM hasta 20 mM, o de 5 mM hasta 15 mM, o es 10 mM; y/o dicho detergente comprende de 0,1 % a 2 % de dicha solución, o de 0,5 % a 1,5 % de dicha solución, o 1 % de dicha solución.
- 40 6. La solución de lisis de la reivindicación 1, en donde dicha solución comprende:
NaCl 400 mM;
Sal de sodio HEPES 50 mM (MM 260,29);
EDTA 25 mM;
45 MgCl₂ 10 mM; y
Tween 20 al 1 %.
- 50 7. La solución de lisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha solución comprende, además, una proteasa.
- 55 8. Un método para extraer un ácido nucleico a partir de una muestra de células o tejidos, dicho método comprende:
incubar una o más muestras de células o tejidos en una solución de lisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha incubación está a una temperatura en el intervalo de 50 °C a 100 °C y dicha incubación es por un tiempo en el intervalo de 10 minutos a 24 horas para producir una o más muestras lisadas en las que se extrajo el ácido nucleico a partir de una o más muestras de células o tejidos, y
opcionalmente recuperar dicho ácido nucleico de dichas muestras lisadas.
- 60 9. El método de la reivindicación 8, en donde:
dicha temperatura es de 60 °C a 90 °C, o de 70 °C a 90 °C, o de 75 °C a 85 °C, u 80 °C; y/o
dicha incubación es por un tiempo en el intervalo de 15 minutos hasta 12 horas, o de 20 minutos hasta 8 horas, o de 30 minutos hasta 6 horas, o de 30 minutos hasta 4 horas, o de 30 minutos hasta 2 horas, o durante 15 min, o durante 30 min, o durante 45 min, o durante 60 min, o durante 90 min, o durante 120 min.
- 65 10. El método de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicha(s) muestra(s) de células o tejidos se seleccionan del grupo que consiste en una biopsia de tejido, un aspirado, un frotis de células, una toallita, un

raspado, una muestra archivada, una sección de tejido fijada, una criosección, un botón de células, y una micromatriz de tejidos.

- 5 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en donde:
dicho método no incluye etapas adicionales de desparafinado y/o reactivos adicionales para desparafinado;
y/o
dicho método no utiliza un solvente orgánico para el desparafinado; y/o
dicha incubación no se realiza en presencia de un solvente orgánico.
- 10 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde la muestra de tejido lisado se mezcla con un alcohol inferior y se almacena.
- 15 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde los ácidos nucleicos en la solución de lisis son estables cuando la solución de lisis se almacena durante un período de al menos 6 horas, o durante un período de al menos un día, o durante un período de al menos dos días, o durante un período de al menos 4 días, o durante un período de al menos una semana, o durante un período de al menos dos semanas, o durante un período de al menos un mes, o durante un período de al menos dos meses, o durante un período de al menos tres meses, o durante un período de al menos 6 meses, o durante un período de al menos un año, o durante un período de al menos dos años, o durante un período de al menos 5 años, medido por RT-PCR posterior al almacenamiento.
- 20 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde los ácidos nucleicos se amplifican a partir de las muestras lisadas en dos o más tiempos diferentes.
- 25 15. El método de la reivindicación 14, en donde dichos dos o más tiempos diferentes son durante un período de al menos 6 horas, o durante un período de al menos un día, o durante un período de al menos dos días, o durante un período de al menos 4 días, o durante un período de al menos una semana, o durante un período de al menos dos semanas, o durante un período de al menos un mes, o durante un período de al menos dos meses, o durante un período de al menos tres meses, o durante un período de al menos 6 meses, o durante un período de al menos un año, o durante un período de al menos dos años, o durante un período de al menos 5 años.
- 30

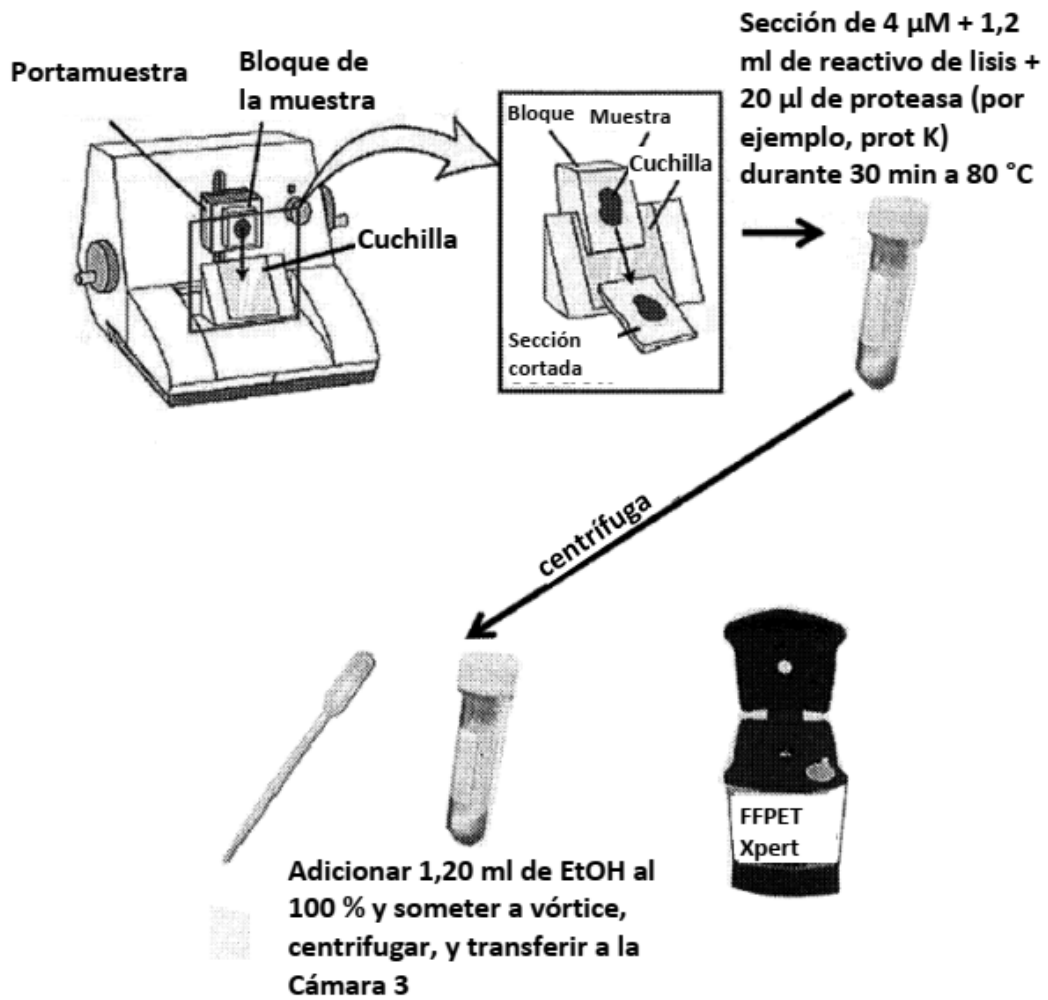


Figura 1

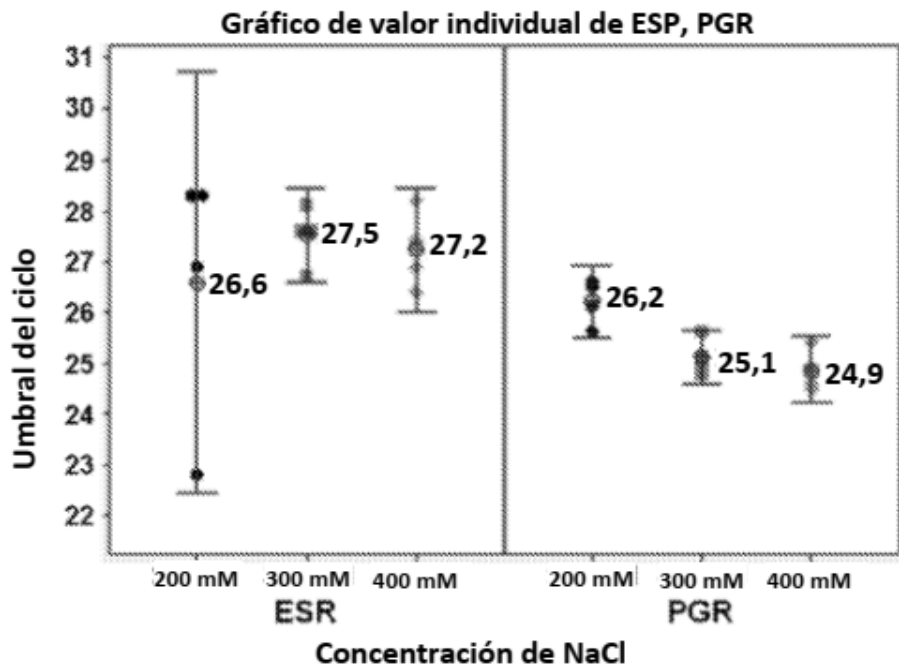


Figura 2A

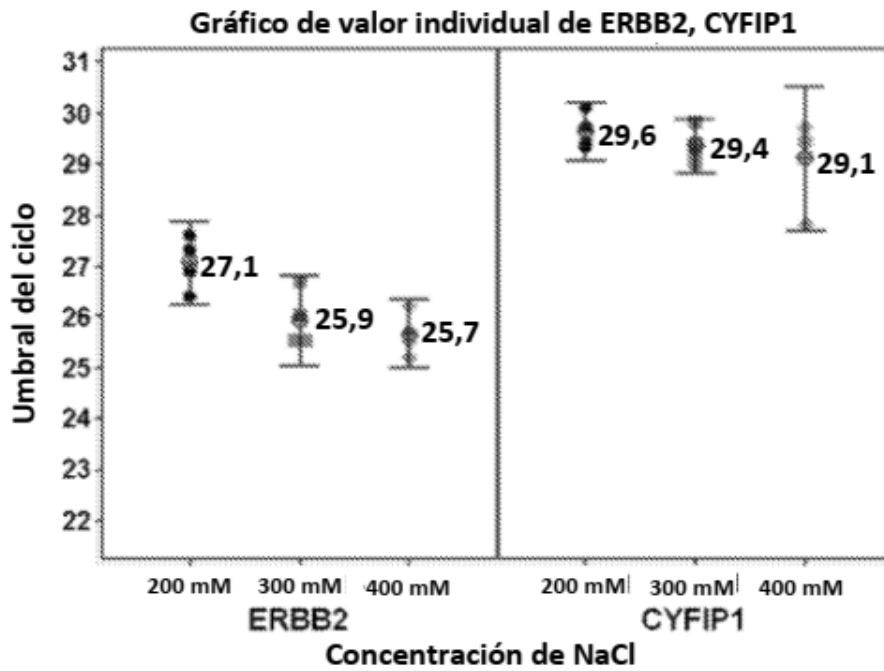


Figura 2B

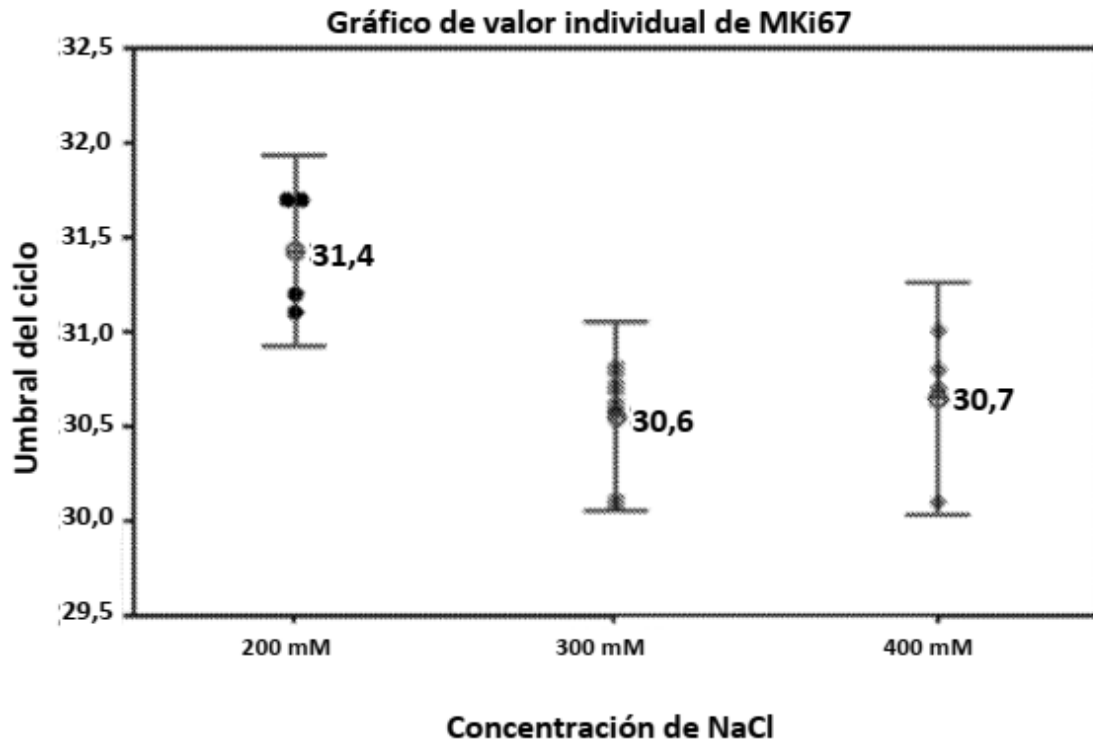


Figura 2C

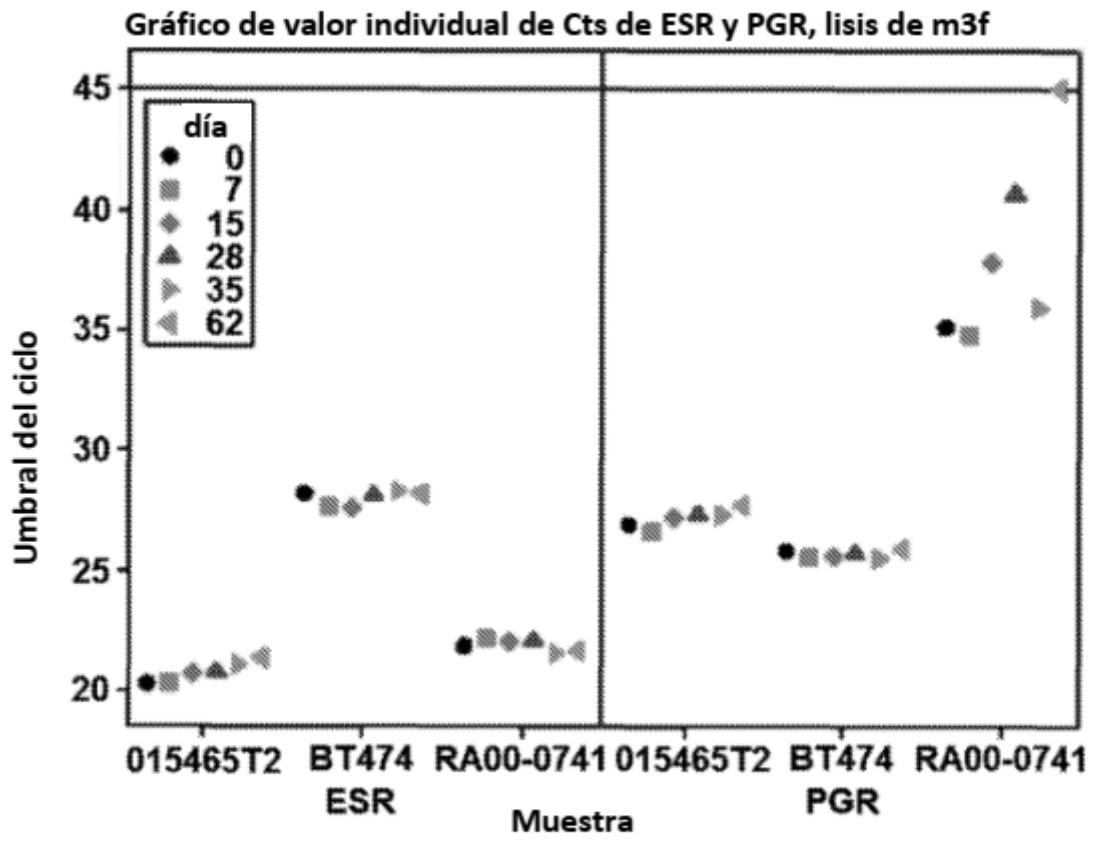


Figura 3A

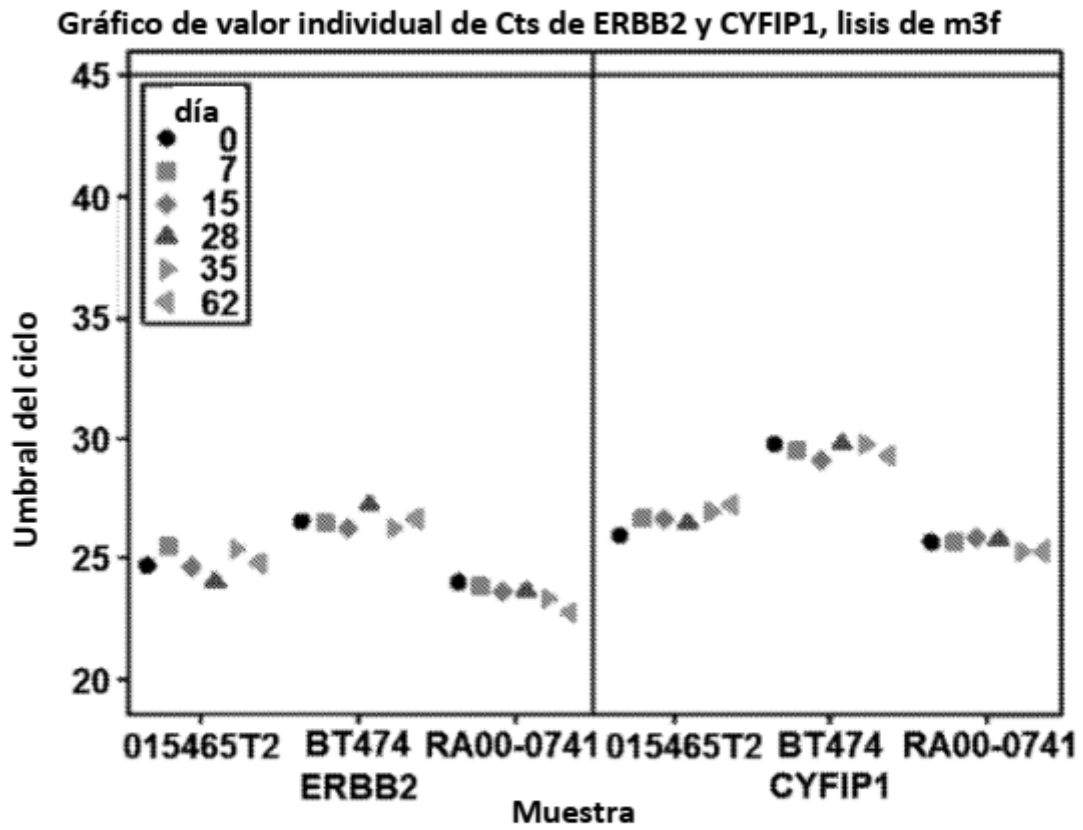


Figura 3B