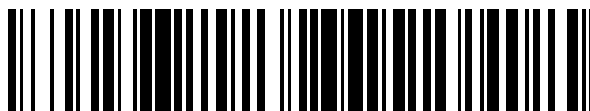


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 890**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010** **E 10724727 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2432873**

54 Título: **Composición lista para usar seca y estabilizada que contiene enzimas de polimerización de ácidos nucleicos para aplicaciones en biología molecular**

30 Prioridad:

19.05.2009 IT MI20090877

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

23.07.2014

73 Titular/es:

SENTINEL CH S.P.A. (100.0%)

Via Roberto Koch 2

20152 Milano, IT

72 Inventor/es:

DE LUCA, UGO;

ROVEDA, LUIGI y

GRAMEGNA, MAURIZIO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 478 890 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

Composición lista para usar seca y estabilizada que contiene enzimas de polimerización de ácidos nucleicos para aplicaciones en biología molecular

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a la estabilización de enzimas de polimerasa de ácidos nucleicos y a la preparación de composiciones y kits de reacción listos para usar que contienen un estabilizante similar a la polimerasa, que además se pueden usar con fines de diagnóstico.

Técnica anterior

[0002] La síntesis de ácidos nucleicos in vivo e in vitro se controla mediante la replicación exacta de las hebras, en las que cada cadena de ácido nucleico única determina el orden de los nucleótidos en una hebra perfectamente complementaria. El mecanismo específico para la replicación del ADN implica el uso, y se lleva a cabo, mediante una familia de enzimas conocida como polimerasas.

[0003] Las polimerasas, purificadas a partir de diversos organismos, se usan normalmente en investigación y diagnóstico, en particular, con la aparición de diversos sistemas de amplificación de genes, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR - Mullis et al. Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195; N° 4.683.202, y N° 4.804.159).

[0004] La configuración básica de la PCR consiste en dos cebadores sintetizados, un molde de ácido nucleico y la enzima polimerasa. Cada cebador es complementario a una región en el ácido nucleico diana, o mejor aún, a una de las dos hebras complementarias. La enzima polimerasa es obviamente una parte crítica del sistema de amplificación debido a su capacidad para añadir nucleótidos secuencialmente en una dirección 3'; uniéndolos a un grupo hidroxilo del cebador de polinucleótidos específico de dianas que es capaz de unirse a la hebra molde a través de enlaces de hidrógeno.

[0005] Una mezcla de amplificación convencional puede tener la siguiente composición: dNTP, un tampón, MgCl₂, un cebador directo, un cebador inverso, Taq polimerasa, ADN y H₂O. La mezcla de reacción se debe calentar a 90-95 °C para desnaturalizar la doble hélice del ADN molde. Después de la etapa de desnaturalización, la temperatura se reduce a 50 - 60 °C para permitir la hibridación de los cebadores a la cadena complementaria; la polimerasa completa el proceso mediante el alargamiento de dichos cebadores en una etapa conocida habitualmente como extensión.

[0006] Las enzimas usadas en reacciones de PCR se han aislado a partir de organismos termófilos y por lo tanto son estables a altas temperaturas. Sin embargo, incluso estas enzimas altamente termoestables se pueden inactivar mediante agentes químicos, proteasas, o cambios ambientales.

[0007] El uso de enzimas termoestables, al igual que con otras enzimas, a menudo requiere el uso simultáneo de condiciones de desnaturalización tales como altas temperaturas, como es el caso con la PCR, mezclas acuosas con concentraciones subóptimas de cofactores y sustratos, y un pH no óptimo para la actividad máxima de la enzima.

[0008] Este escenario sugiere que la estabilización de las enzimas es muy deseada y necesaria para una conservación de las enzimas a largo plazo, especialmente si se incluyen en mezclas acuosas junto con otros reactivos y mezclas de reacción listos para usar para la amplificación de ácidos nucleicos.

[0009] Se conoce un número de técnicas para la estabilización de polimerasas y se han descrito en patentes y aplicaciones. Dichas técnicas incluyen modificación química de las enzimas, inmovilización sobre soportes sólidos, uso de aptámeros, ingeniería genética de las enzimas y adición de agentes estabilizantes.

[0010] Un grupo de sustancias que han demostrado una actividad de estabilización son los tensioactivos que funcionan en la superficie de contacto entre la forma activa de la enzima y el entorno acuoso en el que están contenidos.

[0011] El método habitual para estabilizar las enzimas usadas en técnicas de biología molecular es mediante el almacenamiento de una preparación líquida de cada enzima en una solución que contiene glicerol al 50 % y un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o β-mercaptoetanol a -20 °C. El procedimiento es suficiente para conservar la actividad de las enzimas durante muchos meses con una pérdida mínima de actividad. En contraste, la actividad enzimática se pierde rápidamente cuando se almacena a temperatura ambiente o a +4 °C.

[0012] Redway y Lapage (Cryobiology 11, 73-79 (1974)) comparan hidratos de carbono diferentes, que incluyen glucosa y trehalosa, como medios de suspensión en la conservación a largo plazo de bacterias liofilizadas. La Patente de Estados Unidos N° 5.834.254 usa los disacáridos sacarosa y trehalosa como crioprotectores para

estabilizar la actividad de las enzimas ADN polimerasa y ARN polimerasa.

[0013] Se ha demostrado que los detergentes no iónicos tales como Triton X-100 y Tween 20 estabilizan la actividad de la ADN polimerasa. La solicitud de patente EP 776.970 A1 describe el uso de detergentes no iónicos, que incluyen Tween 20® y NP-40® para estabilizar la actividad de las ADN polimerasas termoestables. Además, se ha demostrado que el dodecil sulfato de sodio (SDS) a concentraciones bajas estabiliza la actividad enzimática.

[0014] Los métodos para la conservación de enzimas que les permiten tolerar la exposición prolongada a la temperatura ambiente o una exposición breve a temperaturas más elevadas, siguen siendo la única limitación real para una gestión más fácil y más rentable de los envíos postales y uso en nuevos campos. Las enzimas, y en particular las polimerasas, incluyendo los derivados de organismos termófilos, es decir, los que se usan normalmente para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se han transportado hasta el momento a temperaturas inferiores a +2-8 °C, y normalmente a -20 °C.

[0015] De los métodos para la conservación de materiales biológicos, hasta ahora se ha usado la liofilización para conservar alimentos, membranas biológicas, células, macromoléculas biológicas e incluso enzimas.

[0016] El proceso de liofilización implica la eliminación de agua de una muestra congelada, es decir, la evaporación del componente acuoso del sólido sin pasar por el estado líquido, en condiciones de presión inferiores a las condiciones de temperatura ambiente.

[0017] Las preparaciones de proteínas normalmente se congelan antes de su desecación para reducir las distorsiones estructurales debido a la desecación.

[0018] Una liofilización incompletamente seca, es decir, una que todavía contiene un bajo porcentaje de agua, parece asegurar una mejor conservación que una completamente desecada, particularmente si va seguido de conservación a una temperatura no superior a +4-10 °C. Incluso en estas condiciones, sin embargo, existe una pequeña pérdida de actividad de la enzima. Algunas enzimas tales como las polimerasas, sin embargo, se inactivan completamente después de la liofilización en ausencia de un crioprotector, independientemente del tipo de liofilización (seca o de otro modo).

[0019] Un número de sustancias o aditivos con actividad crioprotectora se ha usado o propuesto para estabilizar polimerasas. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.614.387 y la patente de Estados Unidos N° 5.834.254 describen métodos y composiciones para preparar composiciones de enzimas liofilizadas estables para amplificar ácidos nucleicos en los que se usaron trehalosa y/o polivinilpirrolidona (PVP) como agentes crioprotectores.

[0020] El análisis de la técnica conocida y los productos actualmente en el mercado muestra que el problema de la conservación de enzimas de polimerización y el potencial para simplificar la preparación de las mezclas de reacción de polimerización en cadena (y por lo tanto, la normalización de las reacciones de PCR incluso en el entorno de laboratorio) son de gran actualidad y en continuo desarrollo.

[0021] En el mercado está disponible un sistema conocido como Perlas para PCR puRe Taq Ready-To-Go (GE Healthcare) que consiste en una formulación liofilizada mezclada previamente en una sola dosis para amplificaciones de PCR convencionales. Sin embargo, el sistema tiene la limitación de que se prepara con una Taq polimerasa específica (puRe Taq polimerasa) que se describe como la enzima directora por su estabilidad y pureza. Por el contrario, el método propuesto de la presente invención se puede usar con todas las polimerasas porque la celobiosa es capaz de estabilizar y proteger todas las Taq polimerasas, tanto si son polimerasas simples o Hot Start polimerasas o incluso sus fragmentos activos tales como Klenow.

Resumen

[0022] La presente invención se refiere a una composición desecada o liofilizada adecuada para su dilución con un disolvente apropiado, que comprende una enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada estabilizada para soportar la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C, caracterizada por que dicha composición tiene una concentración de enzima de polimerización de ácido nucleico en el intervalo de 0,4 - 10000 U/m, celobiosa en una concentración en el intervalo de 50 mM (17,115 g/l) a 500 mM (171,15 g/l) y un tampón, en la que dicha enzima de polimerización de ácido nucleico aislada es una ADN polimerasa seleccionada preferentemente entre el grupo que consiste en Taq Polimerasa, Hot Start polimerasa o sus fragmentos activos; y en la que las concentraciones se refieren a la composición antes de su desecado o liofilizado. Dicha composición también se conoce como "mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar" o "Mezcla Maestra Universal".

[0023] Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición adecuada para sustitución con un disolvente apropiado, que comprende una enzima de polimerización de ácido nucleico aislada estabilizada para soportar la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C, caracterizada por que dicha composición tiene una concentración de la enzima de polimerización de ácido nucleico en el intervalo de 0,01 a 250 Unidades, celobiosa en una concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, un tampón, dNTP, KCl y MgCl₂.

[0024] Además, la invención se refiere al uso de la composición para la amplificación de ácidos nucleicos, en particular para aplicaciones en biología molecular tales como, pero no limitadas a PCR, PCR en Tiempo Real, análisis de curvas de Fusión, análisis de Fusión de Alta Resolución, Secuenciación, PCR Fluorescente Cuantitativa, PCR Multiplex, Amplificación de Todo el Genoma, amplificación Isotérmica.

[0025] Además, la invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende las etapas de:

- i. reconstituir la composición de la invención en agua o en un tampón;
- ii. añadir cebadores específicos para un ADN diana;
- iii. añadir un molde de ácido nucleico;
- iv. opcionalmente añadir uno o más de los reactivos seleccionados entre el grupo que consiste en: KCl, MgCl₂, dNTP, al menos una sonda marcada opcionalmente, agentes reductores y estabilizantes adicionales.

[0026] La invención también proporciona un producto listo para usar que comprende la composición desecada o liofilizada de acuerdo con la invención y un disolvente para la reconstitución de dicha composición.

[0027] Además, la invención comprende kits para la amplificación por PCR de una muestra de ADN que comprende la composición de acuerdo con la invención y opcionalmente instrucciones para la reconstitución y uso de la enzima en una reacción en cadena de la polimerasa.

[0028] Una forma de realización particularmente preferente de la invención consiste en el uso de celobiosa para la conservación de una polimerasa de ácido nucleico durante la liofilización y el almacenamiento a largo plazo a una temperatura de hasta 55 °C.

Descripción de las figuras

[0029]

Figura 1. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización. Calles 1-6: productos de PCR amplificados con composiciones liofilizadas y listas para usar preparados con Hot Start polimerasa de la compañía X; volumen antes de la liofilización: 25 µl (calles 1-3) o 9,1 µl (calles 4-6). Calles 7-12: productos de amplificación obtenidos con las mezclas liofilizadas y listas para usar preparadas con Hot Start ADN polimerasa de la compañía Y; volumen antes de la liofilización: 25 µl (calles 7-9) o 7,5 µl (calles 10-12). Calles 13-15: productos de PCR obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar preparadas con una polimerasa, obtenida en la compañía X; volumen antes de la liofilización: 25 µl.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 2. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, después de la conservación a temperatura ambiente o a 37 °C durante tres semanas. Calles 1-8: productos de amplificación obtenidos con las mezclas de amplificación que contienen Hot Start ADN polimerasas de la compañía X; volumen antes de la liofilización: 25 µl (calles 1-4) o 9,1 µl (calles 5-8). Calles 9-12: productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar que contienen ADN polimerasa de la compañía X; volumen antes de la liofilización: 25 µl. Conservación durante tres semanas a temperatura ambiente (calles 1-3, 5-7, 9-11) o a 37 °C (calles 4, 8, 12).

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 3. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización. Las mezclas liofilizadas y listas para usar contienen: (i) tampones de reacción de la compañía W (calles 1-4), de la compañía X (calles 5-8), de la compañía R (calles 9-12) o de la compañía Y (calles 13-19); (ii) Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía W (calles 1, 5, 9 y 13), en la compañía Y (calles 2, 6, 10, 14, 17, 18 y 19), en la compañía X (calles 3, 7, 11 y 15) o en la compañía R (calles 4, 8, 12 y 16). Los productos de amplificación de las calles 17, 18 y 19 se obtuvieron con mezclas liofilizadas y listas para usar que también contenían, respectivamente, NP-40 al 0,25 % y Tween-20 al 0,25 %, sacarosa 100 mM y NP-40 al 0,25 %, Tween-20 al 0,25 % y sacarosa 100 mM.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 4. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, después de conservación a temperatura ambiente durante seis semanas. Las mezclas liofilizadas y listas para usar contienen respectivamente: (i) tampones de reacción de la compañía W (calles 1-4), de la compañía X (calles 5-8), de la compañía R (calles 9-12) o de la compañía Y (calles 13-19); (ii) Hot Start ADN polimerasas

obtenidas en la compañía W (calles 1, 5, 9 y 13), en la compañía Y (calles 2, 6, 10, 14, 17, 18 y 19), en la compañía X (calles 3, 7, 11 y 15) o en la compañía R (calles 4, 8, 12 y 16). Los productos de amplificación de calles 17, 18 y 19 se obtuvieron con mezclas liofilizadas y listas para usar que también contienen, respectivamente NP-40 al 0,25 % y Tween-20 al 0,25 %, sacarosa 100 mM y NP-40 al 0,25 %, Tween-20 al 0,25 % y sacarosa 100 mM.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 5. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen sacarosa 250 mM, inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización. Las mezclas liofilizadas y listas para usar contienen: (i) tampones de reacción de la compañía X (calles 1, 8 y 9), de la compañía W (calles 2, 3, 14-17), de la compañía R (calles 4, 5, 10-13) o de la compañía Y (calles 6, 7, 18-21); (ii) Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía X (calles 1-7) o en la compañía R (calles 8-21). En las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 18, no se añadieron sustancias; en las de las calles 3, 5, 7, 11, 15 y 19, se añadió sacarosa 250 mM en el tampón de reacción; en las de las calles 9, 12, 16 y 20, se añadió sacarosa 250 mM en el tampón de almacenamiento, mientras que en las de las calles 13, 17 y 21, se añadió sacarosa 250 mM tanto en el tampón de reacción como en el tampón de almacenamiento.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 6. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen sacarosa 250 mM, después de conservación a temperatura ambiente durante ocho semanas.

Las mezclas liofilizadas y listas para usar contienen: (i) tampones de reacción de la compañía X (calles 1, 8 y 9), de la compañía W (calles 2, 3, 14-17), de la compañía R (calles 4, 5, 10-13) o de la compañía Y (calles 6, 7, 18-21); (ii) Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía X (calles 1-7) o en la compañía R (calles 8-21). En las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 18, no se añadieron sustancias; en las de las calles 3, 5, 7, 11, 15 y 19, se añadió sacarosa 250 mM en el tampón de reacción; en las de las calles 9, 12, 16 y 20, se añadió sacarosa 250 mM en el tampón de almacenamiento, mientras que en las de las calles 13, 17 y 21, se añadió sacarosa 250 mM tanto a los tampones de reacción como de almacenamiento.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 7. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen los estabilizantes que se describen a continuación, después de la finalización del proceso de liofilización. Las mezclas liofilizadas y listas para usar contienen tampones de reacción y las enzimas de la Hot Start ADN polimerasa se obtuvieron en la compañía W (calles 1-5) o en la compañía R (calles 6-10). Como estabilizante se añadió a las mezclas liofilizadas y listas para usar: trehalosa 200 mM (calles 2 y 7), sacarosa 250 mM (calles 3 y 8), maltosa 200 mM (calles 4 y 9) o agarosa al 0,025 % (5 y 10). No se añadieron sustancias a las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1 y 6.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 8. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, después de la conservación a temperatura ambiente o a 37 °C durante una semana. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y las enzimas Hot Start ADN polimerasa se obtuvieron en la compañía W (calles 1-5) o en la compañía R (calles 6-10). Como estabilizante se añadió a las mezclas liofilizadas y listas para usar: trehalosa 200 mM (calles 2 y 7), sacarosa 250 mM (calles 3 y 8), maltosa 200 mM (calles 4 y 9) o agarosa al 0,025 % (5 y 10). No se añadieron sustancias a las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1 y 6.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 9. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen estabilizantes, inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía W (calles 1-5) o en la compañía R (calles 6-10). A las mezclas liofilizadas y listas para usar se añadieron: trehalosa 250 mM (calles 2 y 7), dextrosa al 6,6 % (calles 3 y 8), celobiosa 200 mM (calles 4 y 9) o amilopectina al 6,6 % (5 y 10). No se añadieron sustancias a las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1 y 6.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 10. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen estabilizantes, después de conservación a 37 °C durante una semana. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía

W (calles 1-5) o en la compañía R (calles 6-10). A las mezclas liofilizadas y listas para usar se añadieron: trehalosa 250 mM (calles 2 y 7); dextrosa al 6,6 % (calles 3 y 8), celobiosa 200 mM (calles 4 y 9) o amilopectina al 6,6 % (5 y 10). No se añadieron sustancias a las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1 y 6.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 11. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen celobiosa, inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía W (calles 1-5) o en la compañía R (calles 6-10). A las mezclas liofilizadas y listas para usar se añadieron: trehalosa 250 mM (calles 2 y 7), dextrosa al 6,6 % (calles 3 y 8), celobiosa 200 mM (calles 4 y 9) o amilopectina al 6,6 % (5 y 10). No se añadieron sustancias a las mezclas liofilizadas y listas para usar usadas en las calles 1 y 6.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 12. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen celobiosa, después de conservación a 37 °C durante dos semanas. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía R (calles 1-13). La celobiosa se añadió a diferentes concentraciones (mM) a las mezclas liofilizadas y listas para usar: 0 (calle 1), 50 (calle 2), 100 (calle 3), 150 (calle 4), 200 (calle 5), 250 (calle 6), 300 (calle 7), 350 (calle 8), 400 (calle 9), 450 (calle 10), 500 (calle 11), 600 (calle 12), 700 (calle 13).

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 13. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen celobiosa o trehalosa, inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía R (calles 1-16). A las mezclas liofilizadas y listas para usar se añadieron: celobiosa 100 mM (calles 1-5), celobiosa 200 mM (calles 6-10) o trehalosa 200 mM (calles 12-16). No se añadieron sustancias a la mezcla liofilizada y lista para usar en la calle 11.

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 14. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen celobiosa o trehalosa, después de la conservación a 37 °C durante dos semanas. Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía R (calles 1-15). A las mezclas liofilizadas y listas para usar se añadieron: celobiosa 100 mM (calles 1-5), celobiosa 200 mM (calles 6-10) o trehalosa 200 mM (calles 11-15).

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

Figura 15. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen celobiosa o trehalosa, después de la conservación a 55 °C durante: 24 horas (calles 1 y 6), 48 horas (calles 2 y 7), 72 horas (calles 3 y 8), 96 horas o una semana (calles 5 y 10). Las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas se obtuvieron en la compañía R (calles 1-10).

M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

Productos de PCR: 268bp: fragmento del gen de beta-globina humana; 240bp; fragmento del gen 18s de ARN de *Plasmodium* spp.

En todas las figuras, "M" corresponde a la calle del peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas" de la compañía Promega; los fragmentos de dicho marcador varían de 50 bp a 1000 bp.

Figura 16. Patrón de electroforesis en gel de agarosa de la muestra de control de ADN de tipo silvestre (wt) (C1), una muestra de ADN desconocido (C2), la muestra de control de ADN mutante (C3) los productos amplificados de control sin molde (N) obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar y con el método de referencia.

Figura 16a. Resultados antes del procedimiento de purificación de los productos amplificados.

Figura 16b. Resultados después del procedimiento de purificación de los productos amplificados.

Figura 17. Resultados de la secuenciación directa.

Figura 17a. Resultados de la secuenciación directa de productos amplificados de una secuencia de tipo silvestre y de una mutante obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar.

Figura 17b. Resultados de la secuenciación directa de productos amplificados de una secuencia de tipo silvestre y de una mutante obtenidos con el método de referencia.

Figura 18. PCR y PCR en tiempo Real.

Figura 18a (i). Patrón de electroforesis en gel de agarosa de la muestra de control de ADN de tipo silvestre (wt)

(C1), una muestra de ADN desconocido (C2), la muestra de control de ADN mutante (C3) y los productos amplificados de control sin molde (N) obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar;
Figura 18a (ii). Curvas de derivación de PCR en tiempo real obtenidas con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar;

Figura 18a (iii). Resultados comparativos de PCR cuantitativa en tiempo real obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar.

Figura 18b (i). Patrón de electroforesis en gel de agarosa de la muestra de control de ADN de tipo silvestre (wt) (C1), una muestra de ADN desconocido (C2), la muestra de control de ADN mutante (C3) y los productos amplificados de control sin molde (N) obtenidos con el método de referencia;

Figura 18b (ii). Curvas de derivación de PCR en tiempo real obtenidas con el método de referencia;

Figura 18b (iii). Resultados comparativos de PCR cuantitativa en tiempo real obtenidos con el método de referencia.

Figura 19a. Resultados del análisis de curvas de fusión obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar;

Figura 19b. Resultados del análisis de curvas de fusión obtenidos con el método de referencia.

Figura 20a. Resultados del Análisis de Fusión de Alta Resolución (HRM) obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar;

Figura 20b. Resultados del Análisis de Fusión de Alta Resolución (HRM) obtenidos con el método de referencia.

Figura 21a. Ferograma de Fluorescencia Cuantitativa (QF), resultados obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar;

Figura 21b. Ferograma de Fluorescencia Cuantitativa (QF), resultados obtenidos con el método de referencia;

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0030] Con el fin de facilitar la comprensión de la invención, algunos términos se definen a continuación.

[0031] La expresión "agente estabilizante" se refiere a un agente que, cuando se añade a un material biológicamente activo, puede prevenir o retardar la pérdida de actividad en el tiempo en comparación con la conservación del material en ausencia del agente estabilizante.

[0032] El término "polimerasa" se refiere a una enzima o a sus fragmentos activos capaces de sintetizar hebras de ácidos nucleicos (ARN o ADN) a partir de un molde de ARN o ADN y la disponibilidad de ribonucleósido trifosfatos o desoxinucleósido trifosfatos.

[0033] La expresión "actividad de la polimerasa" se refiere a la capacidad de una enzima para sintetizar hebras de ácido nucleico (ARN o ADN) a partir de ribonucleósido trifosfatos o desoxinucleósido trifosfatos.

[0034] Las expresiones: "tampón" o "agentes de tamponamiento" se refieren a sustancias o preparaciones que, cuando se añaden a una solución, confieren resistencia a los cambios de pH en la misma.

[0035] La expresión "agente reductor" se refiere a un dador de electrones, es decir, un material que dona electrones a un segundo material para reducir el estado oxidativo de uno o más de los átomos del segundo material.

[0036] El término "solución" se refiere a una mezcla, acuosa o no acuosa.

[0037] La expresión "solución tampón" se refiere a una solución que contiene un agente de tamponamiento.

[0038] La expresión "tampón de reacción" se refiere a una solución tampón en la que se desarrolla una reacción enzimática.

[0039] La expresión "tampón de almacenamiento" se refiere a una solución tampón en la que se conserva una enzima.

[0040] El término "molde" se refiere a un ácido nucleico que se origina a partir de una muestra biológica que se analiza para la presencia de la "diana".

[0041] El término "diana" se refiere, cuando se usa en referencia a las técnicas de biología molecular, a la región del ácido nucleico reconocida por los cebadores específicos usados para la reacción de amplificación. En el caso de PCR para uso diagnóstico, el ADN diana consiste en el ácido nucleico del agente patógeno.

[0042] El término "cebadores" o iniciadores se refiere a oligonucleótidos sintetizados capaces de actuar como iniciadores de la síntesis cuando se usan en condiciones que inducen la síntesis de ácidos nucleicos (presencia de nucleótidos y polimerasa).

[0043] El término dNTP (desoxinucleósido trifosfatos) se refiere a una mezcla de desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicidina en la que se indican las concentraciones de cada uno de los desoxinucleósido trifosfatos.

[0044] La expresión "producto de PCR" o "fragmento amplificado" se refiere un fragmento de ADN, generalmente en una doble hélice, que resulta de dos o más ciclos de PCR, es decir, polimerización en cadena, después de las etapas de desnaturalización de la cadena de ADN molde, hibridación de los cebadores específicos a la misma y extensión o elongación de la cadena complementaria al molde de ADN, comenzando partir del OH terminal del cebador.

Descripción detallada

[0045] La presente invención se refiere al uso del disacárido celobiosa para estabilizar enzimas de polimerización de ácidos nucleicos aisladas, específicamente ADN polimerasa, Hot Start ADN polimerasa, ARN polimerasa, o sus fragmentos activos, durante la liofilización (o desecación), y para conservarlas en esta forma con el tiempo.

[0046] En un aspecto preferente, la presente invención se refiere a una composición desecada o liofilizada adecuada para su disolución con un disolvente apropiado, que comprende una enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada estabilizada para soportar la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C, caracterizada por que dicha composición tiene una concentración de enzima de polimerización de ácidos nucleicos en el intervalo de 0,01 a 250 Unidades; celobiosa en una concentración en el intervalo de 50 mM (17,115 g/l) a 500 mM (171,15 g/l) y un tampón, en la que el tampón es preferentemente Tris HCl y en el que dicha enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada es una ADN polimerasa seleccionada preferentemente entre el grupo que consiste en Taq Polimerasa, Hot Start polimerasa o sus fragmentos activos.

[0047] Además, dicha composición se denomina "mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar" o "Mezcla Maestra Universal".

[0048] La composición desecada o liofilizada se obtiene por liofilización (o desecación) a partir de una mezcla líquida o congelada, en la que la celobiosa es la concentración comprendida entre 50 mM y 500 mM o comprendida entre 150 mM (59,345 g/l) y 250 mM (85,575 g/l) o preferentemente 250 mM y en la que la concentración de enzima de polimerización de ácidos nucleicos está en el intervalo de 0,01 a 250 Unidades o preferentemente al menos 2 Unidades. La celobiosa usada para la liofilización es preferentemente de calidad analítica.

[0049] En un aspecto preferente de la presente invención se contempla una composición adecuada para su dilución con un disolvente apropiado, que comprende una enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada estabilizada para soportar la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C, caracterizada por que dicha composición tiene una concentración de enzima de polimerización de ácidos nucleicos en el intervalo de 0,01 a 250 Unidades, celobiosa en una concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, un tampón, dNTP, KCl y $MgCl_2$, en la que el tampón es preferentemente Tris HCl.

[0050] La composición comprende preferentemente, de acuerdo con una realización de la enzima en la forma lista para usar en PCR, incluso más preferentemente al menos uno de los siguientes reactivos:

- i. estabilizantes seleccionados entre el grupo que consiste en: tensioactivos, detergentes iónicos o no iónicos, tales como NP40, Tween 20 o Triton-X100 y/o azúcares no reductores, tales como: dextrosa, sacarosa, trehalosa;
- ii. agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en: β -mercaptoetanol, DTT o sulfato amónico;
- iii. al menos una sonda, marcada opcionalmente.

[0051] Opcionalmente, cuando la composición liofilizada se usa para PCR en Tiempo Real, puede comprender sondas, posiblemente marcadas con, por ejemplo, grupos fluorescentes seleccionados entre el grupo que consiste en sondas TaqMan[®], Molecular Beacons[®], sondas Scorpions[®], sondas HiBeacon[®], u otras sondas que se pueden usar para PCR en Tiempo Real.

[0052] Cuando la composición de la invención se reconstituye en agua o en un sistema tampón que contiene ADN, la celobiosa está en una concentración comprendida entre 50 mM y 500 mM, o comprendida entre 150 mM y 250 mM o preferentemente 250 mM, y a esta concentración no interfiere con la reacción de amplificación genética.

[0053] Incluso más preferentemente, la composición consiste en preparaciones liofilizadas o desecadas listas para usar, que contienen todos los reactivos que se describen en la realización preferente y se preparan por adelantado para amplificación genética directamente después de la reconstitución en un solo envase, tal como un tubo o microplaca, o a granel.

[0054] Además, la invención se refiere al uso de la composición para la amplificación de ácidos nucleicos, que se puede llevar a cabo de una forma automatizada, en particular para aplicaciones de biología molecular tales como, pero no limitadas a PCR, PCR en Tiempo Real, análisis de curvas de Fusión, análisis de Fusión de Alta Resolución, Secuenciación; PCR Cuantitativa Fluorescente, PCR Multiplex, Amplificación de Todo el Genoma, Amplificación Isotérmica.

[0055] La invención también proporciona un producto listo para usar que comprende la composición desecada o liofilizada de acuerdo con la invención y un disolvente para la reconstitución de dicha composición.

[0056] La composición liofilizada preparada de acuerdo con la invención da como resultado una simplificación considerable del proceso de PCR realizado a partir de la misma, permitiendo, por lo tanto, que se eviten problemas de contaminación, pero permitiendo principalmente una flexibilidad considerable con respecto a los volúmenes de ácidos nucleicos necesarios para la reacción, con un consiguiente aumento notable en la solidez del ensayo. Este último aspecto es particularmente interesante en la ciencia forense ya que se puede usar un gran volumen de ácidos nucleicos con las composiciones liofilizadas.

[0057] Además, el aumento considerable en la estabilidad de la temperatura ambiente de la composición que contiene polimerasa se refiere a que las aplicaciones de interés específico en los campos de diagnóstico veterinario y humano, y los campos de análisis de alimentos, se hacen posibles, particularmente si se llevan a cabo en instalaciones no muy bien equipadas. Por lo tanto, estos usos son particularmente preferentes. El aumento de la estabilidad de la composición para su almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C también permite más flexibilidad de transporte y de almacenamiento.

[0058] Además, la invención se refiere adicionalmente a un proceso para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende las etapas de:

- i. reconstituir la composición de la invención en agua o en un tampón;
- ii. añadir cebadores específicos para un ADN diana;
- iii. añadir un molde de ácido nucleico;
- iv. opcionalmente, añadir uno o más de los reactivos seleccionados entre el grupo que consiste en: KCl, MgCl₂, dNTP, al menos una sonda marcada opcionalmente, agentes reductores y estabilizantes adicionales.

[0059] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para preparar una composición desecada o liofilizada que contiene una polimerasa estable a temperatura ambiente, preferentemente una ADN polimerasa, e incluso más preferentemente una Taq Polimerasa o aún más preferentemente una Hot Start Polimerasa básicamente caracterizado por la mezcla de dicha enzima (o dichas enzimas) con celobiosa a concentraciones entre 50 mM y 500 mM, preferentemente entre 150 mM y 250 mM en un tampón de liofilización y almacenamiento que puede consistir, por ejemplo, en Tris-HCl de acuerdo con un protocolo definido como "mínimo" y sometiendo la solución a liofilización o desecación, preferentemente después de un congelado rápido.

[0060] La enzima se añade en una cantidad de al menos 1-5 IU: el método mínimo también proporciona la adición de una sal, seleccionada preferentemente entre el grupo que consiste en: KCl, MgCl₂, antes de la liofilización.

[0061] Una de las ventajas de la presente invención es que el sistema estabilizado por medio de celobiosa se adapta a todas las ADN polimerasas a partir las diversas compañías de fabricación.

[0062] Además, la celobiosa produce mediante un sistema de hidrólisis enzimática que parte de celulosa, una molécula que consiste en cadenas largas de glucosa (azúcar) de origen vegetal. El origen vegetal garantiza la ausencia de posibles contaminantes de ácidos nucleicos que tienen su origen en la contaminación bacteriana que se produce probablemente cuando, tal como en el caso de la trehalosa, la producción implica el uso de cultivos bacterianos para su síntesis.

[0063] Existen muchos sistemas, todos los cuales se pueden aplicar, para mezclar la enzima o las enzimas y el estabilizante (celobiosa) solos o en combinación con los otros componentes. Por ejemplo, un método en el que una solución que contiene la enzima disuelta se añade con el estabilizante, o un método en el que una solución que contiene la enzima se mezcla con una segunda solución que contiene el estabilizante, o un método en el que la enzima se disuelve en una solución que contiene el estabilizante y otro método en el que una solución que contiene tanto la enzima como el estabilizante se conserva como un líquido o liofilizada.

[0064] La liofilización se lleva a cabo de acuerdo con criterios conocidos por el experto en la materia. Un ejemplo de un protocolo posible para liofilización es el que sigue a continuación:

Protocolo de Liofilización Larga:

- Gradiente de +20 °C a -40 °C en 5 minutos

- 40 °C durante 3 horas
- Gradiente de -40 °C a -10 °C en 30 minutos
- -10 °C durante 4 horas
- Gradiente de -10 °C a +10 °C en 15 minutos
- +10 °C durante 2 horas
- Gradiente de +10 °C a +30 °C en 15 minutos
- +30 °C durante 4-8 horas.

[0065] La liofilización se puede llevar a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo más corto, también aplicable en razón de los pequeños volúmenes implicados. Un ejemplo de un protocolo posible para liofilización es el que sigue a continuación:

Protocolo de Liofilización Corta:

- Gradiente de +20 °C a -40 °C en 5 minutos
- 40 °C durante 30 min
- Gradiente de -40 °C a -10 °C en 15 minutos
- -10 °C durante 30 min
- Gradiente de -10 °C a +10 °C en 15 minutos
- +10 °C durante 60 min
- Gradiente de +10 °C a +30 °C en 15 minutos
- +30 °C durante 60 min.

[0066] El Protocolo de Liofilización Corta es particularmente indicado cuando la enzima no se almacena en glicerol, mientras que el Protocolo de Liofilización Larga se puede usar tanto si la enzima se almacena o no en glicerol.

[0067] En una realización adicional y preferente, particularmente para uso diagnóstico, la invención se refiere a un método para preparar la composición para liofilizar una polimerasa en una forma lista para usar, que comprende las siguientes etapas:

- mezclar la enzima con celobiosa en concentraciones comprendidas entre 50 y 500 mM, preferentemente entre 150 y 250 mM, o viceversa, en un tampón de liofilización y almacenamiento que puede consistir, por ejemplo, en Tris-HCl, de acuerdo con un protocolo definido como "mínimo",
- adición de sales seleccionadas preferentemente entre el grupo que consiste en KCl, Tris-HCl, MgCl₂,
- adición opcional de:
 - o dNTP,
 - o cebadores, preferentemente al menos un cebador en la posición 5' (directo) y un cebador en la posición 3' (inverso), específico para el ADN diana presente en la muestra,
 - o adición opcional de un estabilizante adicional seleccionado entre el grupo que consiste en: detergentes iónicos o no iónicos, tales como NP40, Tween-20 y/o azúcares no reductores, tales como: dextrosa, sacarosa, trehalosa, o un agente reductor tal como DTT o p-mercaptoetanol,
- liofilización (o desecación) tal como se ha indicado anteriormente preferentemente después de congelación rápida, y conservación de la enzima en esta forma.

[0068] El método también puede incluir la adición de un ADN de control para la reacción en cadena de polimerización y cebadores específicos antes de la liofilización.

[0069] El término estabilizantes se refiere a detergentes (o tensioactivos) tales como: NP-40 (etoxilato de alquil-fenol), Tween-20 (monolaurato de sorbitán polioxietilado) o Triton=X100 o análogos de los mismos, y azúcares no reductores tales como dextrosa, sacarosa, trehalosa.

[0070] Los reactivos adicionales se pueden añadir de forma individual o mezclados previamente en una mezcla de reacción, tal como los suministrados con la enzima por el fabricante, estando n veces más concentrados (generalmente x10) que la concentración final usada para la reacción de polimerización.

5 **[0071]** La enzima en forma liofilizada, posiblemente lista para usar, se puede mantener a temperatura ambiente durante varios meses.

10 **[0072]** La liofilización y la estabilidad de la enzima en esta forma, posiblemente combinada con reactivos específicos para la reacción en cadena de la polimerasa posterior, permite que se preparen envases (tubos, tubos de ensayo o microplacas) que comprenden la mezcla en forma desecada y lista para usar después de la reconstitución con un tampón o con agua, conteniendo posiblemente el molde de ADN/ARN en la muestra que, si estuviera presente, se tiene que amplificar.

15 **[0073]** Por lo tanto, este aspecto permite la estandarización de reacciones de amplificación posteriores para todos los usos de la presente invención que comprenden el uso de diagnóstico. Además, los protocolos de liofilización y de conservación son adecuados para ambas reacciones de amplificación en cadena mediante PCR clásica y en Tiempo Real, y por lo tanto para usos de tipo tanto cuantitativo como cualitativo.

20 **[0074]** Una de las ventajas de la presente invención es que el estabilizante usado (celobiosa) es eficaz tanto para liofilización como para conservación de la enzima, mientras que los estabilizantes de la técnica conocida se usa generalmente para un fin o el otro. Aunque son compatibles con otras moléculas usadas para este fin, el uso de celobiosa hace innecesario el uso de otras moléculas de "estabilización" para las diversas etapas. Además, ya que la celobiosa es menos soluble que la trehalosa, también se espera que sea menos higroscópica y por lo tanto capaz de transmitir una vida media superior al producto liofilizado.

25 **[0075]** Además, la invención comprende kits para amplificación por PCR de una muestra de ADN que comprende la composición de acuerdo con la invención y opcionalmente instrucciones para la reconstitución y uso de la enzima en una reacción en cadena de la polimerasa.

30 **[0076]** Una realización particularmente preferente de la invención consiste en el uso de celobiosa para la conservación de una polimerasa de ácido nucleico durante la liofilización y para una almacenamiento a largo plazo a una temperatura de hasta 55 °C.

35 **[0077]** Dicha composición liofilizada para una sola reacción es adecuada para amplificar una muestra de ADN de al menos 1 ng, después de reconstitución en un volumen mínimo de unos pocos µl (2-50, preferentemente 5-30).

40 **[0078]** El liofilizado también se puede reconstituir directamente en un tampón que contiene el ADN de la muestra. La concentración de los diversos reactivos en la composición liofilizada en la forma lista para usar, o en la mezcla de reacción a añadir inmediatamente después de la reconstitución de la enzima, debe ser de tal modo que sea óptima, después de reconstituir la composición con agua o con tampón en un volumen adecuado, para la amplificación del ADN por PCR, es decir, preferentemente en la que KCl está en una concentración entre 20 y 150 mM, MgCl₂ está en una concentración entre 0,5 y 5 mM, los cebadores específicos para la reacción de polimerización y amplificación del ADN diana están en una concentración entre 0,05 y 0,2 mM y dNTP están en una concentración entre 50 y 200 mM. Dicho kit, que contiene la enzima en forma liofilizada, se puede mantener a temperatura ambiente.

45 **[0079]** Otro aspecto de la invención se refiere al uso de celobiosa para la conservación de la ADN polimerasa, preferentemente una Hot Start ADN polimerasa durante la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C.

50 **[0080]** Tal como se ha indicado anteriormente, la liofilización de la enzima y su estabilidad incluso en la forma de una mezcla de reacción lista para usar, en dosis individuales o a granel, permite que las condiciones de la reacción de amplificación en cadena estén más estandarizadas. Por lo tanto, un uso preferente de la composición de la invención y del proceso de liofilización que es posible con la presente invención, se refiere a la preparación de kits de diagnóstico específicamente para la determinación de la presencia de agentes parásitos en fluidos o tejidos biológicos. Por lo tanto, son particularmente preferentes las composiciones liofilizadas o desecadas en forma lista para usar, que comprenden, además de la enzima y de la celobiosa y de los reactivos que se han definido anteriormente (por ejemplo, sales y dNTP), cebadores específicos para el ADN diana de *Plasmodium* (un par para cada una de las especies *falciparum*, *malariae*, *vivax* y *ovale*) preferentemente diseñados en la región conservada 18s del ARN, o de *Leishmania*, con cebadores diseñados preferentemente en la región conservada 18s del ARN o de otro modo de *Toxoplasma*, con cebadores diseñados preferentemente en la región de alta repetición HRE, para identificación diagnóstica de dichos agentes patógenos en una muestra de ADN.

60 **[0081]** Cada composición liofilizada, en la forma lista para usar, también comprende un control de amplificación interna que corresponde preferentemente a un par cebador de un gen expresado normalmente en el sistema de referencia, tal como preferentemente el gen de beta-globina humana y, opcionalmente, un molde de ADN de control para la amplificación.

[0082] Componentes adicionales presentes preferentemente en la composición producida en la forma lista para usar son: KCl en una concentración final después de la reconstitución comprendida entre 20 y 150 mM y MgCl₂ entre 0,05-5 mM, preferentemente en un tampón Tris-HCl 5-20 mM (pH 8,0), opcionalmente cebadores específicos para la amplificación del ADN que requieren su presencia para la detección en la muestra, en una concentración de 0,05-0,2 mM, y dNTP en una concentración comprendida entre 50 y 200 mM. La puesta en práctica de la invención se describe en el presente documento en algunos ejemplos específicos no limitantes.

Parte Experimental

Materiales

[0083] Métodos. Las composiciones de liofilización que se describen en la parte experimental contienen generalmente, cuando no se indique de otro modo y separadamente, los siguientes reactivos específicos añadidos en el momento apropiado: una ADN polimerasa (dentro del intervalo de 1 a 5 unidades), el tampón de reacción proporcionado por el fabricante, MgCl₂, dNTP y cebadores.

[0084] En particular, en los ejemplos que se proporcionan para la presente invención, la mezcla de reacción contiene cebadores para amplificar dos regiones en el ADN: 1) un fragmento de 240 bp (pares de bases) diseñado en el gen 18s del ARN ribosómico de *Plasmodium spp.* (ADN diana), 2) un fragmento de 268 bp diseñado en el gen de β -globina humana, usado como control de amplificación interna (ADN de control), sales y dNTP.

[0085] Después de la liofilización, aproximadamente 10 ng (nanogramos) del ADN genómico extraído mediante el método de gel de sílice a partir de sangre periférica positiva para *Plasmodium falciparum* se añadieron a la mezcla liofilizada y el volumen final se llevó a 25 μ l (microlitros) con agua destilada estéril.

[0086] Después de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, se realizaron Ciclos de amplificación que consistían en desnaturalización (94 °C durante 2 minutos), hibridación (55 °C durante 30 segundos) y extensión (72 °C durante 45 segundos). Para completar la reacción, se realizaron 40 ciclos tal como se ha descrito anteriormente.

[0087] Uno de los protocolos de liofilización usados consistía en:

- Gradiente de +20 °C a -40 °C en 5 minutos
- -40 °C durante 3 horas.
- Gradiente de -40 °C a -10 °C en 30 minutos
- -10 °C durante 4 horas
- Gradiente de -10 °C a +10 °C en 15 minutos
- +10 °C durante 2 horas
- Gradiente de +10 °C a +30 °C en 15 minutos
- +30 °C durante 4-8 horas.

Ejemplo 1. Comparación entre ADN polimerasa y Hot Start polimerasa

[0088] Con el objetivo de identificar el tipo de ADN polimerasa que mantiene una buena actividad de polimerasa después del proceso de liofilización, se comparó una ADN polimerasa comercial con dos Hot Start ADN polimerasas disponibles en dos fabricantes diferentes.

[0089] En la figura 1, las calles 1 a 6 muestran productos de PCR amplificados con mezclas liofilizadas y listas para usar preparadas con Hot Start polimerasa de la compañía X; en particular, los volúmenes de la reacción antes de la liofilización corresponden a 25 μ l para las calles 1 a 3, y 9,1 μ l para las calles 4 a 6. Las calles 7 a 12 corresponden a productos de amplificación obtenidos con las mezclas liofilizadas y listas para usar preparadas con Hot Start ADN polimerasa de la compañía Y; en particular los volúmenes de reacción antes de la liofilización corresponden a 25 μ l para las calles 7 a 9, y 7,5 μ l para las calles 10 a 12. Las calles 13 a 15 corresponden con los productos de PCR obtenidos con las mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar preparadas con polimerasa obtenida en la compañía X; los volúmenes de reacción son 25 μ l.

[0090] No se añadió estabilizante a la mezcla de reacción antes de la liofilización.

[0091] Tal como se muestra en la figura 1, en la que los productos de amplificación se analizaron inmediatamente después del proceso de liofilización, se puede observar a partir de las calles 7 a 12 que la mezcla que contiene la Hot Start ADN polimerasa obtenida en la compañía Y no permite la amplificación de los dos productos de amplificación esperados, mientras que ambas polimerasas, Hot Start y no Hot Start (respectivamente de 1 a 6 y de 13 a 15) obtenidas en la compañía X, mantienen su actividad de polimerasa después de la liofilización.

[0092] La compañía X incluye dentro de su propio tampón de reacción sustancias que aumentan físicamente la densidad de la solución, siendo definida solamente y genéricamente como estabilizantes. Con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica de las mezclas liofilizadas y listas para usar para PCR, preparados con las polimerasas obtenidas en la compañía X, las mismas mezclas se conservaron a temperatura ambiente y a 37 °C durante 3 semanas. La fotografía 2 muestra los productos de amplificación obtenidos con las mezclas de amplificación que contienen Hot Start ADN polimerasa de la compañía X; en particular los volúmenes finales antes de la liofilización de las mezclas usadas para PCR corresponden a 25 µl para las calles 1 a 4 y 9,1 µl para las calles 5 a 8. Las calles 9 a 12 muestran los productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar que contienen ADN polimerasa de la compañía X; los volúmenes de reacción antes de la liofilización corresponden a 25 µl. Dichas mezclas de reacción liofilizadas se conservaron a temperatura ambiente (calles 1 a 3, 5 a 7, 9 a 11) o a 37 °C (calles 4, 8 y 12) durante 3 semanas después de la liofilización.

[0093] Tal como se muestra en la fotografía, después de 3 semanas a temperatura ambiente, los productos de amplificación obtenidos con las mezclas que contienen Hot Start ADN polimerasa (calles 1 a 3 y 5 a 7) demostraron ser más intensos que los obtenidos con ADN polimerasa sencilla (calles 9 a 11). Además, la Hot Start ADN polimerasa no da como resultado la formación de dímeros de cebador, en contraste con la otra polimerasa.

[0094] En conclusión, después de una conservación de 3 semanas a 37 °C, la Hot Start ADN polimerasa mantuvo su actividad enzimática (calles 4 y 8) mientras que la ADN polimerasa sencilla no lo hizo (calle 12).

[0095] Por lo tanto, es absolutamente cierto que: 1) el uso de estabilizantes es crítico para conservar la actividad enzimática de la ADN polimerasa durante el proceso de liofilización, 2) la Hot Start ADN polimerasa es más adecuada que la ADN polimerasa normal para la eficacia de amplificación, pero no para el proceso de liofilización, ya que ambas categorías de ADN polimerasa presentan comportamientos similares, es decir, requieren estabilizantes para la liofilización.

[0096] Por último, en este experimento, se sometieron a ensayo 2 volúmenes diferentes antes de la etapa de liofilización (25 y 9,1 µl) sin indicar cambio alguno en los resultados.

Ejemplo 2. Comparación entre Hot Start ADN polimerasas

[0097] En el siguiente experimento, se prepararon mezclas de amplificación liofilizadas listas para usar que contenían Hot Start ADN polimerasas obtenidas en 4 compañías diferentes (W, X, R, Y), cada una combinada con sus 4 tampones de reacción o con estabilizantes añadidos tales como NP-40, Tween-20 y sacarosa, para un total de 19 combinaciones.

[0098] En las figuras 3 y 4, las calles 1 a 4, 5 a 8, 9 a 12 y 13 a 19 representan productos amplificados por PCR usando las mezclas listas para usar liofilizadas que contienen respectivamente los tampones de reacción obtenidos a partir de las compañías W, X, R o Y. En las mismas figuras, las calles 1, 5, 9 y 13 corresponden a los productos de amplificación obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía W; las calles 2, 6, 10, 14, 17, 18 y 19 corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía Y; las calles 3, 7, 11 y 15, corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía X; las calles 4, 8, 12 y 16 corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía R. En las figuras 3 y 4, las calles 17, 18 y 19 corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas liofilizadas y listas para usar que también contienen respectivamente NP-40 al 0,25 % y Tween-20 al 0,25 %, sacarosa 100 mM y NP-40 al 0,25 %, Tween-20 al 0,25 % y sacarosa 100 mM.

[0099] Los productos de PCR presentados en la figura 3 se amplificaron usando las mezclas liofilizadas y listas para usar inmediatamente después de la finalización del protocolo de liofilización.

[0100] Por el contrario, la figura 4 muestra resultados de las mismas mezclas conservadas a temperatura ambiente durante 6 meses.

[0101] Tal como se muestra claramente en la figura 3, las mezclas que contienen el tampón de reacción de la compañía X, que se controlaron justo después de la liofilización, mantuvieron su actividad enzimática en 3 de 4 polimerasas, mientras que, para la cuarta, la actividad solamente se mantuvo parcialmente.

[0102] Las mezclas preparadas con el tampón de reacción de las compañías W o R conservaron la actividad de 1 de 4 polimerasas. Por último, en presencia del tampón de reacción obtenido en la compañía Y, no se observó 5 amplificación correspondiente a los dos fragmentos esperados; solamente se pudo observar una actividad enzimática residual en presencia de sacarosa 100 mM. Además, las mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar se conservaron a temperatura ambiente durante 6 semanas, antes de llevar a cabo la amplificación por PCR. Tal como se muestra en la figura 4, solamente las mezclas liofilizadas preparadas con el tampón de reacción 10 de la compañía X fueron capaces de conservar la actividad enzimática en tres de las cuatro Hot Start ADN polimerasas usadas.

[0103] Estos resultados enfatizan la importancia de incluir un estabilizante en la mezcla de reacción de PCR durante el proceso de liofilización para conservar la actividad enzimática de las polimerasas.

Ejemplo 3. Estabilidad de las composiciones liofilizadas y listas para usar para PCR, que contienen sacarosa 250 mM

[0104] Con el objetivo de evaluar la mejora de la estabilidad de las mezclas de reacción liofilizadas para PCR, se evaluó inicialmente el efecto de la presencia de sacarosa 250 mM en el tampón de almacenamiento, en el tampón de reacción o en ambos. Se evaluaron dos Hot Start ADN polimerasas diferentes obtenidas en las dos compañías diferentes.

[0105] En las figuras 5 y 6, las calles 1 a 7 y las calles 8 a 21 representan los productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar que contienen Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía X o R respectivamente. En las figuras 5 y 6, las calles 1, 8 y 9, corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar preparados con el tampón de reacción de la 25 compañía X; las calles 2 y 3 y las calles 14 a 17, corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar preparados con el tampón de reacción de la compañía W; las calles 4 y 5 y las calles 10 a 13, corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar preparados con el tampón de reacción de la compañía R; las calles 6 y 7 y las calles 18 a 21, corresponden a productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar 30 preparados con el tampón de reacción de la compañía Y. En las figuras 5 y 6, las calles 3, 5, 7, 11, 15 y 19, representan productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar preparados mediante la adición de sacarosa 250 mM al tampón de reacción; las calles 9, 12, 16 y 20, representan productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar separados mediante la adición de 35 sacarosa 250 mM al tampón de almacenamiento; las calles 13, 17 y 21, representan productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar preparados mediante la adición de sacarosa 250 mM al tampón de reacción y al tampón de almacenamiento.

[0106] Los productos de amplificación que se muestran en la figura 5 se amplificaron con las mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar usadas inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización mientras 40 que los resultados de la figura 6 son los mismos que los de la figura 5 pero después de conservar las mezclas liofilizadas y listas para usar a temperatura ambiente durante 8 semanas.

[0107] Tal como se resalta en la figura 5, la presencia de sacarosa 250 mM en el tampón de reacción pero no en el 45 tampón de almacenamiento es básica para mantener la actividad enzimática durante y después del proceso de liofilización. Después de 8 semanas de conservación a temperatura ambiente, la conservación de la actividad enzimática solamente fue posible en la mitad de los casos (5 de 10) (figura 6).

[0108] En consecuencia, se puede concluir que la sacarosa tiene una acción protectora frente a la actividad 50 enzimática, aunque no es eficaz para la conservación a largo plazo.

Ejemplo 4. Estabilidad de las composiciones liofilizadas preparadas con diferentes sustancias estabilizantes

[0109] Con el objetivo de comparar la estabilidad térmica de las mezclas de amplificación liofilizadas y listas para 55 usar que contienen diferentes estabilizantes, se usaron elementos tales como disacáridos, polisacáridos o hidratos de carbono, siendo éstos añadidos a las mezclas de amplificación preparadas tal como se ha descrito en la introducción.

[0110] En las figuras 7 y 8, las calles 1 a 5 y las calles 6 a 10, representan los productos de amplificación obtenidos con mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen, respectivamente, Hot Start ADN 60 polimerasas obtenidas en las compañías W o R. En las figuras 7 y 8, las calles 1 y 6, 2 y 7, 3 y 8, 4 y 9, y 5 y 10 corresponden a mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar que contienen respectivamente: ningún estabilizante; trehalosa 200 mM, sacarosa 250 mM, maltosa 200 mM y agarosa al 0,025 %.

[0111] Los productos de amplificación que se muestran en la figura 7 se obtuvieron con las mezclas de 65 amplificación liofilizadas y listas para usar inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización mientras que los resultados que se muestran en la figura 8 son los mismos que los de la figura 7 pero después de

conservar las mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar a 37 °C durante una semana.

[0112] La presencia de sacarosa 250 mM, trehalosa 200 mM, maltosa 200 mM y agarosa al 0,025 % en la mezcla de reacción liofilizada y lista para usar se evaluó inicialmente usando dos Hot Start ADN polimerasas diferentes obtenidas en las dos compañías diferentes. Tal como se resalta en la figura 7, la presencia de trehalosa, sacarosa, y maltosa (calles 2 y 7, 3 y 8 y 4 y 9 respectivamente) en las mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar permite que la actividad enzimática de ambas enzimas se conserve, aunque la acción parece ser menos eficaz en la enzima obtenida en la compañía R (calles 7, 8 y 9); esto es particularmente evidente para la sacarosa (calle 8). No se indicó banda de amplificación para la agarosa (figura 7, calles 5 y 10). Además, las mezclas liofilizadas y listas para usar se conservaron a 37 °C durante una semana antes de su procesamiento por PCR. Las mezclas liofilizadas que contienen trehalosa 200 mM mantuvieron intacta la actividad enzimática tanto de las Hot Start ADN polimerasas (figura 8, calles 2 y 7) mientras que las que contenían sacarosa 250 mM y agarosa al 0,025 % no lo hicieron (figura 8, calles 3 y 8, 5 y 10 respectivamente).

[0113] La maltosa 200 mM mantuvo la actividad de una polimerasa (figura 8, calle 9), pero solo mantuvo parcialmente la de la otra.

[0114] La acción de trehalosa 250 mM, dextrosa al 6,6 %, celobiosa 200 mM (Fluka Analytical 22150 D-(+)-Celobiosa) y amilopectina al 6,6 %, añadidas a las mezclas de reacción antes de su liofilización, se evaluó a continuación sobre las mismas dos polimerasas.

[0115] En las figuras 9 y 10, las calles 1 a 5 y las calles 6 a 10, representan los productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar preparadas con las Hot Start ADN polimerasas obtenidas respectivamente en las compañías W o R. En las figuras 9 y 10, las calles 1 y 6, 2 y 7, 3 y 8, 4 y 9, 5 y 10, corresponden a mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar que contienen: ningún estabilizante, trehalosa 250 mM, dextrosa al 6,6 %, celobiosa 200 mM o amilopectina al 6,6 %, respectivamente. Los resultados de la figura 9 corresponden a las mezclas liofilizadas procesadas inmediatamente después de haber completado el proceso de liofilización, mientras que los resultados que se muestran en la figura 10 corresponden a las mezclas de reacción con las mismas características preparadas al mismo tiempo tal como las anteriores, pero conservadas a 37 °C durante una semana.

[0116] Tal como se muestra en la figura 9, la introducción de trehalosa y celobiosa en la mezcla de reacción liofilizada conservó la actividad enzimática de ambas de las Hot Start ADN polimerasas (calles 2 y 7, 4 y 9 respectivamente) mientras que la dextrosa y la amilopectina protegieron solamente una de las dos enzimas (calles 3 y 8, 5 y 10 respectivamente). Además, las mezclas de reacción con las mismas características y preparadas al mismo tiempo que las anteriores, se conservaron durante una semana a 37 °C antes de su procesamiento por PCR. Las mezclas de reacción liofilizadas que contienen trehalosa 250 mM y celobiosa 200 mM como estabilizantes protegieron la actividad enzimática de ambas polimerasas (figura 10, calles 2 y 7, 4 y 9, respectivamente), mientras que la dextrosa al 6,6 % y la amilopectina al 6,6 % no la protegieron (figura 10, calles 3 y 8, 5 y 10 respectivamente).

[0117] Además, también se evaluaron albúmina al 0,5 %, albúmina al 2 % y lactosa al 3 % pero no se obtuvieron resultados comparables con los conseguidos con trehalosa y celobiosa.

[0118] En consecuencia, se demostró claramente que solamente la celobiosa y la trehalosa proporcionan protección a la ADN polimerasa.

[0119] Ejemplo 5. Evaluación de la concentración óptima de celobiosa para estabilizar composiciones liofilizadas

Con el objetivo de identificar la concentración de celobiosa más eficaz para conservar la actividad enzimática de la ADN polimerasa, se prepararon mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar tal como se ha descrito en la introducción que contenían concentraciones crecientes de celobiosa.

[0120] Las concentraciones analizadas varían de 0 a 700 mM de celobiosa.

[0121] En las figuras 11 y 12, las calles 1 a 13 representan productos de amplificación obtenidos con mezclas de reacción liofilizadas que contienen celobiosa añadida a una concentración de, respectivamente: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, y 700 mM.

[0122] Los productos de amplificación de la figura 11 se obtuvieron usando la mezcla de reacción liofilizada inmediatamente después de finalizar el proceso de liofilización, mientras que los resultados de la figura 12 corresponden a mezclas de reacción con las mismas características y preparadas al mismo tiempo que las anteriores, pero conservadas a 37 °C durante dos semanas.

[0123] Tal como se muestra en las figuras 11 y 12, las concentraciones de celobiosa que conservan mejor la actividad enzimática de las polimerasas permanecen en el intervalo de 150 a 250 mM, incluso después de la conservación 37 °C durante una semana (figura 12).

[0124] En consecuencia, se demostró que la celobiosa proporciona la mejor estabilidad a las mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar dentro del intervalo de concentraciones de 150 a 250 mM.

Ejemplo 6. Evaluación de la estabilidad en el tiempo de composiciones liofilizadas y listas para usar que contienen trehalosa o celobiosa como estabilizantes

[0125] Con el objetivo de identificar la estabilidad en el tiempo de las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen trehalosa o celobiosa, se prepararon mezclas de reacción liofilizadas listas para usar tal como se ha descrito en la introducción, pero con celobiosa 200 mM o trehalosa 200 mM añadidas. Las mezclas se liofilizaron antes de someterlas a amplificación por PCR.

[0126] En la figura 13, las calles 1 a 5, 6 a 10, 11 y 12 a 16 corresponden a mezclas que contienen celobiosa 100 mM, celobiosa 200 mM, ningún estabilizante y trehalosa 200 mM respectivamente.

[0127] Los productos de amplificación que se muestran en la figura 13 se obtuvieron con las mezclas de reacción liofilizadas inmediatamente después de la finalización del proceso de liofilización, mientras que los resultados de la figura 14 corresponden a mezclas de reacción con las mismas características preparadas al mismo tiempo que las anteriores, pero conservadas a 37 °C durante dos semanas.

[0128] En la figura 14, las calles 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15 corresponden a las mezclas liofilizadas que contienen celobiosa 100 mM, celobiosa 200 mM o trehalosa 200 mM respectivamente. Los productos de amplificación que se muestran en la figura 15 se obtuvieron con la mezcla de reacción liofilizada conservada a 55 °C respectivamente durante: 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y una semana (calles 1, 6 y 11; 2, 7 y 12; 3, 8 y 13; 4, 9 y 14; 5, 10 y 15 respectivamente).

[0129] En la figura 15, las calles 1 a 5 representan el patrón de electroforesis en gel de agarosa de las mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar, que contienen celobiosa o trehalosa, después de la conservación a 55 °C durante 24 horas (calles 1 y 6), 48 horas (calles 2 y 7), 72 horas (calles 3 y 8), 96 horas y una semana (calles 5 y 10). Las mezclas liofilizadas y listas para usar contienen tampones de reacción y Hot Start ADN polimerasas obtenidas en la compañía R (calles 1-10). M: peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas", Promega.

[0130] Productos de PCR: 268bp: fragmentos del gen de beta-globina humana; 240bp: fragmento del gen 18s del ARN de *Plasmodium* spp.

[0131] En todas las figuras, "M" corresponde a la calle del peso molecular del marcador "Marcadores para PCR para Banco de Pruebas" de la compañía Promega; los fragmentos de dicho marcador varían de 50 bp a 1000 bp. Tal como se muestra en la figura 13, los estabilizantes presentes en las mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar de este ejemplo conservan la actividad de la polimerasa muy bien. Las mezclas de reacción liofilizadas también se conservaron a 37 °C durante una semana antes de su procesamiento con PCR.

[0132] Incluso después de la exposición a esta tensión, las polimerasas presentes en las mezclas de reacción liofilizadas y listas para usar que contienen celobiosa 200 mM (figura 14, calles 6 a 10) mantuvieron intacta su actividad enzimática, tal como lo hicieron las que tenían 200 mM trehalosa añadida, (figura 14, calles 11 a 15). Después de dos semanas de conservación a 37 °C, con celobiosa 200 mM (figura 14, calles 6 a 10) o trehalosa 200 mM (figura 14, calles 11 a 15), las enzimas mantuvieron su actividad.

[0133] Por último, las mezclas de reacción con las demás características y preparados al mismo tiempo que las precedentes se conservaron a 55 °C durante 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y una semana (figura 15) a continuación se sometieron a amplificación por PCR. El uso de trehalosa como un estabilizante (figura 15, calles 6 a 10) permite que se proteja la actividad enzimática de las Hot Start ADN polimerasas, incluso después de la tensión a 55 °C. Los tratamientos prolongados a 55 °C (48 horas, 72 horas y 96 horas) dañan particularmente la actividad enzimática (figura 15, calles 2, 3 y 4 respectivamente).

[0134] Sin embargo, las mezclas liofilizadas y listas para usar que contienen celobiosa 200 mM tienen la misma estabilidad que las mezclas que contienen trehalosa 200 mM. Por lo tanto, se puede afirmar que, como un estabilizante, la celobiosa tiene las mismas propiedades que la trehalosa, aunque, en comparación con la misma, tiene las ventajas que se han indicado anteriormente que incluyen su producción mediante un sistema de hidrólisis enzimática a partir de celulosa, una molécula que consiste en cadenas largas de glucosa (azúcar) de origen vegetal. El origen vegetal asegura la ausencia de posibles contaminantes de ácidos nucleicos que se originan a partir de contaminaciones bacterianas que siempre son probables cuando, como en el caso de la producción de trehalosa, se usan cultivos bacterianos para sintetizarla.

Ejemplo 7. Uso del estabilizante de celobiosa para formar composiciones listas para usar para kits de diagnóstico en el campo de la parasitología

[0135] La celobiosa se usó como un estabilizante para la enzima Hot Start ADN polimerasa en la preparación de mezclas listas para usar y liofilizadas adecuadas para la formación de kits de diagnóstico en el campo de la parasitología.

[0136] En particular para cada uno de los parásitos investigados, una mezcla de reacción final que contenía los siguientes se preparó por adelantado:

Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 50 mM, cebador directo 0,25 µM, cebador inverso 0,25 µM, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 2 Unidades de Taq Polimerasa.

[0137] Los iniciadores o cebadores para *Plasmodium* (un par para cada una de las especies *falciparum*, *malariae*, *vivax* y *ovale*) se diseñaron en la región conservada 18s del ARN. Los cebadores para *Leishmania* se diseñaron en la región conservada 18s del ARN. Los cebadores para *Toxoplasma* se diseñaron en la región de alta repetición HRE.

[0138] Todas las mezclas preparadas contienen un control interno que corresponde a un par cebador diseñado en las secuencias genéticas de beta-globina humana.

[0139] Cada cebador, en las diversas configuraciones, se suministró a concentraciones de 0,25 µM.

Ejemplo 8. Comparación de la amplificación de ADN y rendimiento de la secuenciación directa

[0140] Se amplificaron el patrón de electroforesis en gel de agarosa de la muestra de control de ADN de tipo silvestre (wt) (C1), una muestra de ADN desconocido (C2), la muestra de control de ADN mutante (C3) y el control sin molde (N).

[0141] La amplificación del ADN se realizó para comparar los productos de PCR obtenidos con las mezclas de amplificación liofilizadas y listas para usar y las obtenidas con un método de referencia.

[0142] A la composición de amplificación liofilizada y lista para usar se añadieron los siguientes componentes:

Cebador Directo	0,4 µM
Cebador inverso	0,4 µM
ADN	30 ng
H ₂ O	a 25 µl

[0143] El método de referencia tenía las siguientes composiciones:

dNTP	0,2 mM cada uno
Tampón de reacción	1x
MgCl ₂	1,5 mM
Cebador Directo	0,4 µM
Primer Reverse	0,4 µM
Cebador inverso	0,003 U/µl
ADN	30 ng
H ₂ O	a 25 µl

[0144] El rendimiento de PCR era comparable con ambos sistemas. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis sobre un gel de agarosa al 2 % (Figura 16a).

[0145] Antes del análisis de secuenciación, cada producto de PCR se purificó usando el sistema Colector de Distribución de Vacío Multiscreen HTS (Millipore). El procedimiento de purificación se realizó en un periodo de tiempo más corto para los productos de PCR obtenidos usando la Mezcla Maestra Universal en comparación con los obtenidos con el método de referencia. La forma liofilizada garantizaba la alta calidad de los productos de PCR, eliminando la presencia de aditivos convencionales que podrían alterar y retrasar la etapa de purificación, generando cantidades suficientes de productos amplificados para el análisis de secuenciación posterior (Figura 16b).

[0146] Los resultados muestran que la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) es ideal para la reacción de amplificación y el análisis de secuenciación posterior (Figura 17).

Ejemplo 9. Comparación de PCR en tiempo real en presencia de un colorante fluorescente, análisis de curvas de fusión y rendimiento del análisis de fusión de alta resolución (HRM)

[0147] El rendimiento de la muestra de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) se evaluó mediante el uso de Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science). Este instrumento permitió 3 aplicaciones diferentes en la misma sesión analítica: una en PCR tiempo real en presencia de un colorante específico bicatenario fluorescente (Eva-Green, Biotium), un Análisis de curvas de fusión y un análisis de Fusión de Alta Resolución. Para cada aplicación, la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) se comparó con el método de referencia.

[0148] Para cada una de las 3 aplicaciones, los resultados se muestran para una muestra de control de ADN de tipo silvestre (C1), una muestra de ADN desconocido (C2), una muestra de ADN mutante que porta una sustitución A>G (C3), y un control sin molde (N). que mostraron una eficacia de amplificación similar.

[0149] Los resultados del análisis de amplificación y los valores de derivación de PCR en Tiempo Real mostraron que la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) es ideal para PCR y para PCR en Tiempo Real.

[0150] El análisis de fusión permitió la identificación de una temperatura de fusión bien definida (T de fusión) cuando se usa tanto la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) como el método de referencia. En particular, la T de fusión de las muestras obtenidas con la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) se identificó a 89 °C mientras que la obtenida con el método de referencia se identificó a 87 °C. Además, los perfiles de fusión obtenidos con la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) permitió un solapamiento completo entre las diferentes muestras; esta condición no se observó para los perfiles de fusión obtenidos con el método de referencia. Los resultados del análisis de Curvas de Fusión y del análisis de Fusión de Alta Resolución muestran que la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) es ideal para su uso en ambas aplicaciones.

Ejemplo 10. Comparación del rendimiento en PCR Cuantitativa Fluorescente (QF)

[0151] El rendimiento y los resultados obtenidos con la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) se evaluaron y se compararon con los obtenidos con el método de referencia en PCR QF, en particular para el diagnóstico prenatal de las aneuploidías más habituales de cromosomas autosómicos y sexuales. El análisis de PCR QF incluye amplificación, detección y análisis de microsatélites de ADN específicos de cromosomas. Se usan cebadores de marcadores específicos marcados con fluorescencia para amplificación por PCR de marcadores individuales y el número de copia de cada marcador es indicativo del número de copia del cromosoma. Los productos de PCR resultantes se pueden analizar y cuantificar usando un analizador genético automatizado.

[0152] Protocolos de PCR QF:

Mezcla de amplificación del método de referencia 7,5 µl
 Conjunto de cebadores 7,5 µl
 ADN 50 ng
 H₂O a 25 µl

Composición

[0153]

Conjunto de cebadores 7,5 µl
 ADN 50 ng
 H₂O a 25 µl

[0154] Los productos de PCR QF se analizaron usando el software GeneMarker. El análisis de las relaciones de altura del pico y área del pico de cada uno de los productos amplificados muestran que la mezcla de amplificación liofilizada y lista para usar (Mezcla Maestra Universal) es ideal para su uso en Fluorescencia Cuantitativa.

REIVINDICACIONES

1. Una composición desecada o liofilizada adecuada para su dilución con un disolvente apropiado que comprende una enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada, estabilizada para soportar la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C, en la que dicha composición tiene:
 - una concentración de enzima de polimerización de ácidos nucleicos en el intervalo de 0,4
 - 10000 U/ml,
 - celobiosa en una concentración en el intervalo de 50 mM (17,115 g/l) a 500 mM (171,15 g/l),
 - un tampón, y
 - en la que dicha enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada es una ADN polimerasa seleccionada entre el grupo que consiste en: Taq Polimerasa, Hot Start Polimerasa o fragmentos activos de las mismas; y en la que las concentraciones se refieren a la composición antes de su desecado o liofilización.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende celobiosa 250 mM y 2 Unidades de enzima de polimerización de ácidos nucleicos.
3. Una composición adecuada para su dilución con un disolvente apropiado, que comprende una enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada estabilizada para soportar la liofilización y el almacenamiento a una temperatura de hasta 55 °C, en la que dicha composición tiene:
 - una concentración de enzima de polimerización de ácidos nucleicos en el intervalo de 0,4
 - 10000 U/ml,
 - celobiosa en una concentración en el intervalo de 50 mM a 500 mM,
 - un tampón, dNTP, KCl, MgCl₂, y
 - en la que dicha enzima de polimerización de ácidos nucleicos aislada es una ADN polimerasa seleccionada entre el grupo que consiste en: Taq Polimerasa, Hot Start Polimerasa o fragmentos activos de las mismas.
4. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3, en la que dicho tampón es Tris HCl.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende adicionalmente uno o más de los siguientes componentes (i-iii):
 - i. estabilizantes seleccionados entre el grupo que consiste en: tensioactivos y/o azúcares no reductores;
 - ii. agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en: (3-mercaptoetanol, DTT;
 - iii. al menos una sonda, marcada opcionalmente.
6. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3 para la amplificación de ácidos nucleicos.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho proceso de amplificación se lleva a cabo de una forma automatizada.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 para realizar PCR, PCR en Tiempo Real, Análisis de curvas de fusión, análisis de Fusión de Alta Resolución, Secuenciación, PCR Cuantitativa Fluorescente, PCR Multiplex, Amplificación de Todo el Genoma o Amplificación Isotérmica.
9. Un proceso para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende las etapas de:
 - a. reconstituir la composición de acuerdo con la reivindicación 1 en agua o en un tampón;
 - b. añadir cebadores específicos para un ADN diana;
 - c. añadir un molde de ácido nucleico;
 - d. añadir uno o más de los reactivos seleccionados entre el grupo que consiste en: KCl, MgCl₂, dNTP, al menos una sonda marcada opcionalmente, agentes reductores y estabilizantes adicionales.
10. Un proceso para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende las etapas de:
 - a. reconstituir la composición de acuerdo con la reivindicación 3 en agua o en un tampón;
 - b. añadir cebadores específicos para un ADN diana;
 - c. añadir un molde de ácido nucleico;
 - d. opcionalmente, añadir al menos una sonda marcada opcionalmente, agentes reductores y estabilizantes adicionales.
11. Un producto listo para usar que comprende:
 - a. La composición desecada o liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3;
 - b. un disolvente para reconstituir dicha composición.

- 12.** Un kit para amplificación por PCR de una muestra de ADN que comprende la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3 y opcionalmente instrucciones para la reconstitución y uso de la enzima en una reacción en cadena de la polimerasa.
- 5 **13.** Uso de celobiosa para la conservación de una polimerasa de ácidos nucleicos durante la liofilización y el almacenamiento a largo plazo a una temperatura de hasta 55 °C.
- 14.** Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha polimerasa de ácidos nucleicos es la ADN polimerasa.

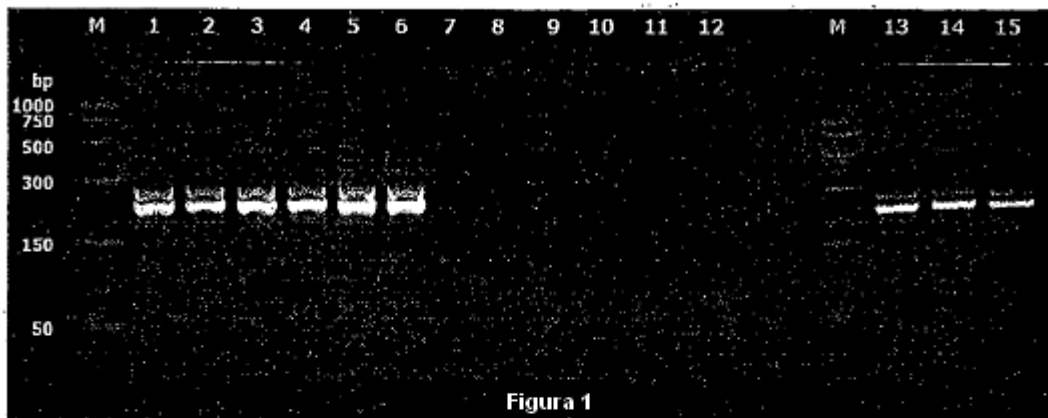


Figura 1

Figura 1

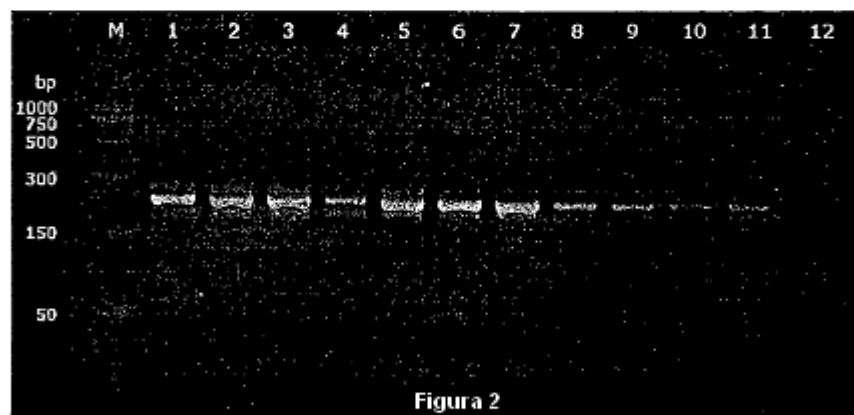


Figura 2

Figura 2

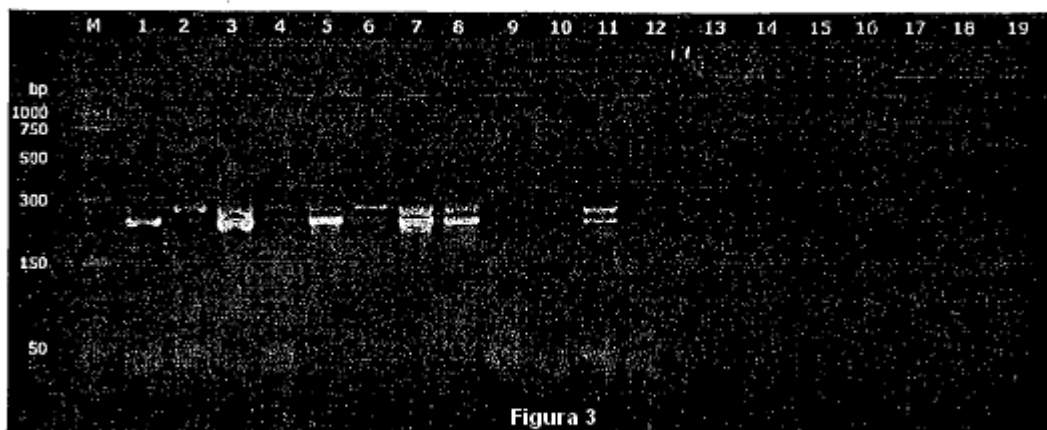


Figura 3

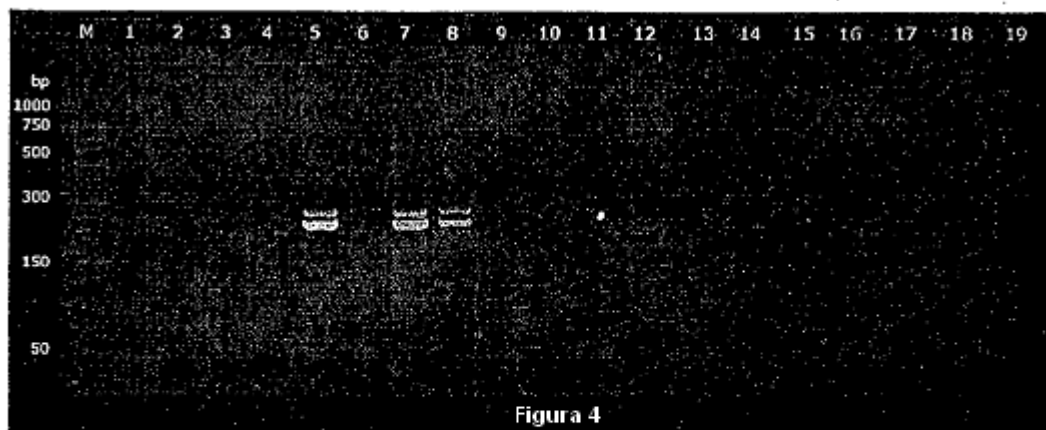


Figura 4

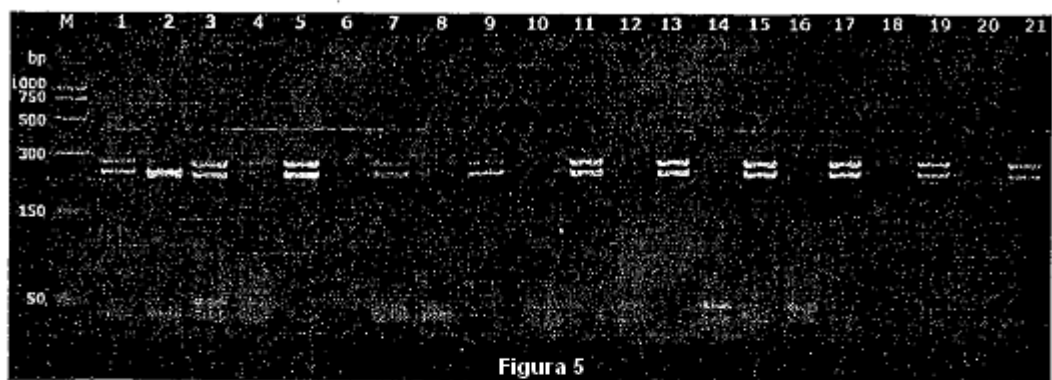


Figura 5

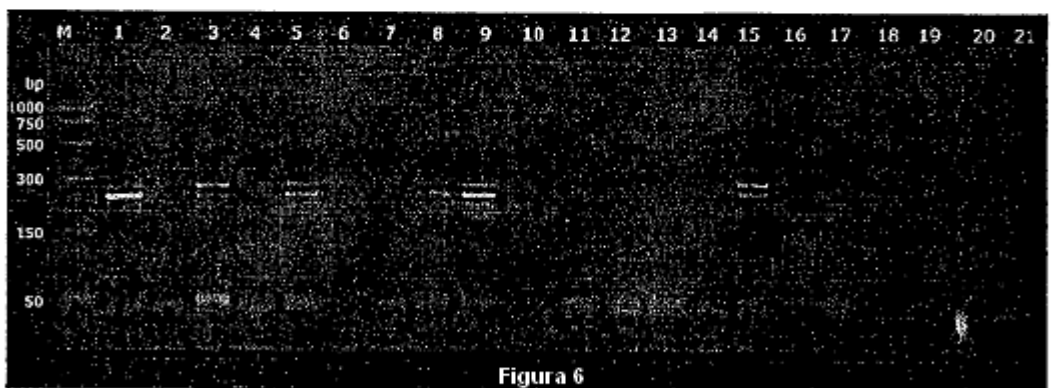


Figura 6

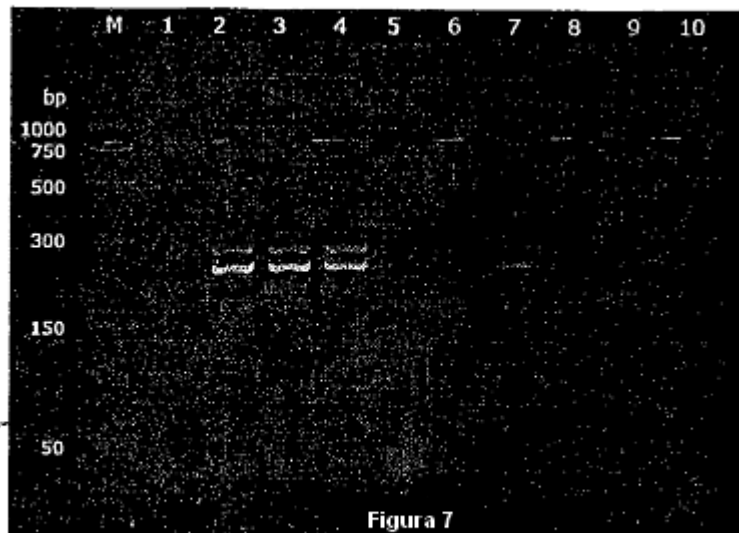


Figura 7

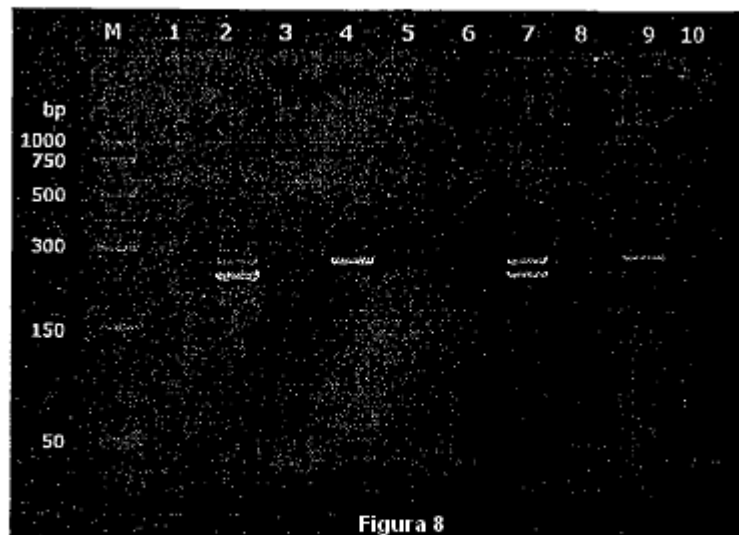


Figura 8

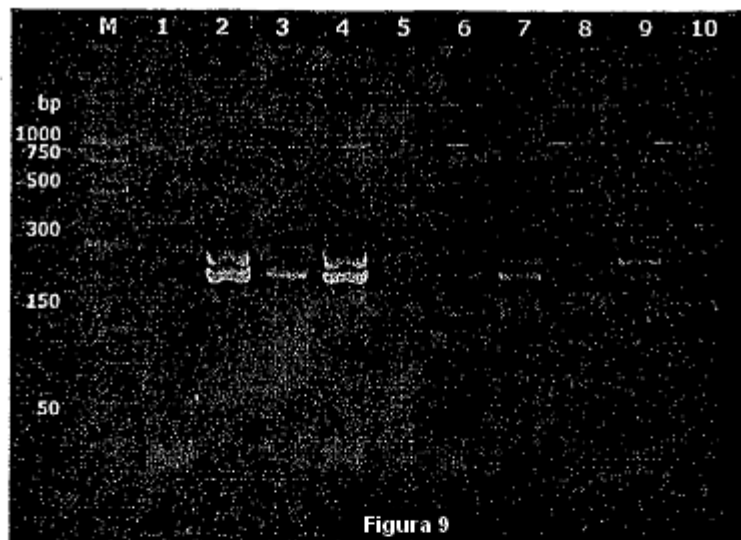


Figura 9

Figura 9

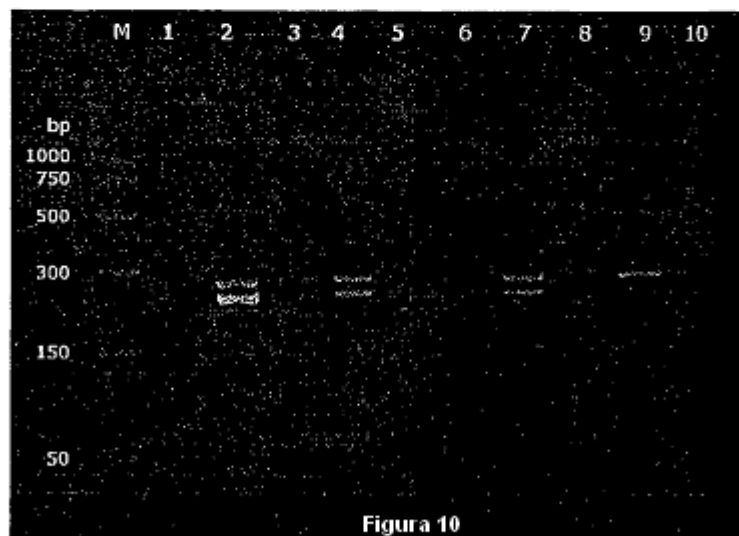


Figura 10

Figura 10

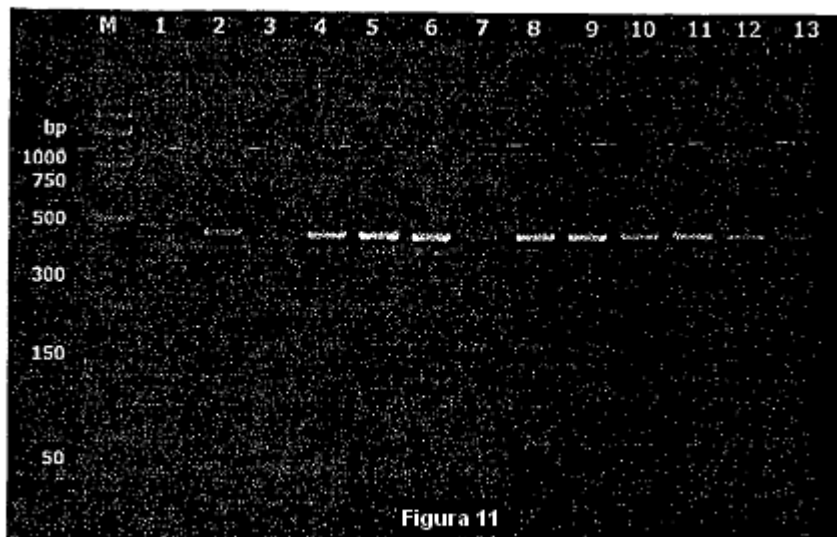


Figura 11

Figura 11

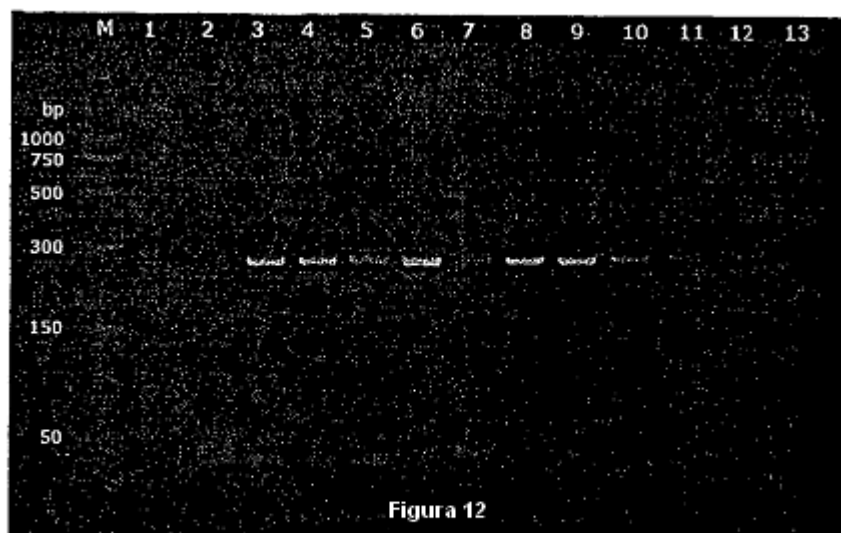


Figura 12

Figura 12

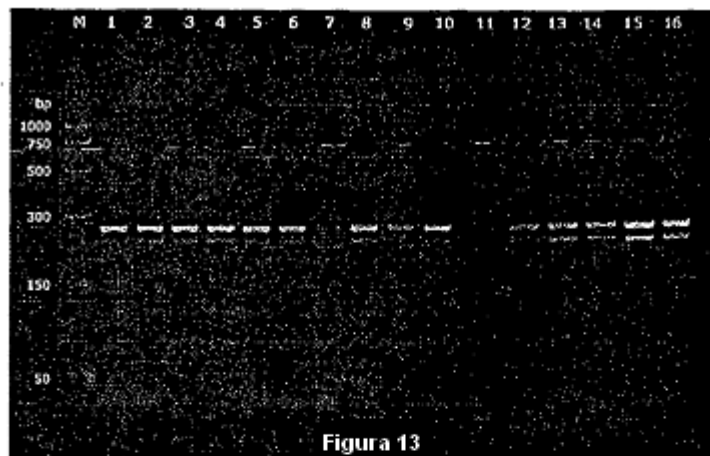


Figura 13

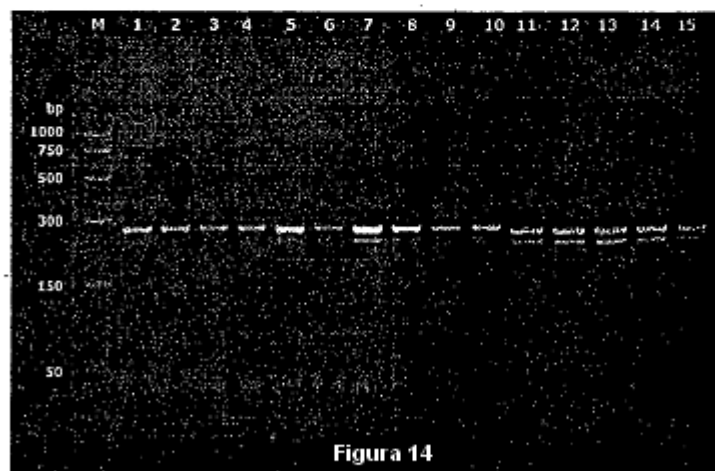


Figura 14

X liofilización

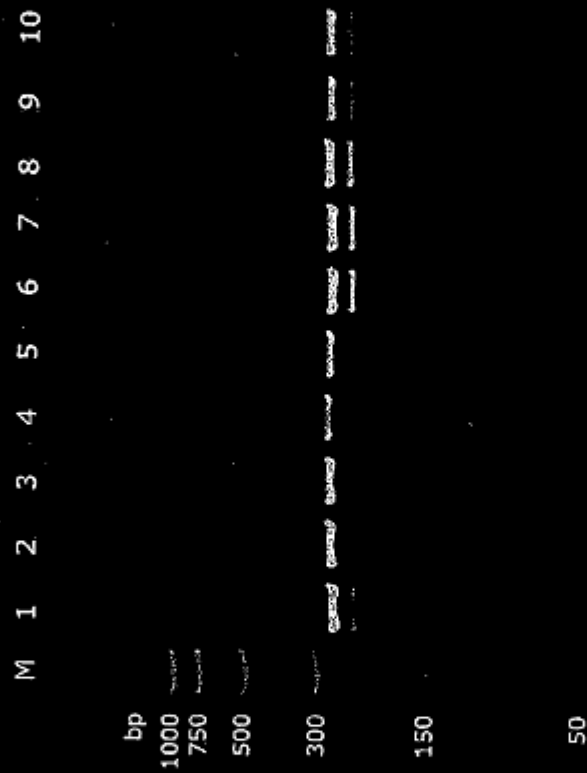
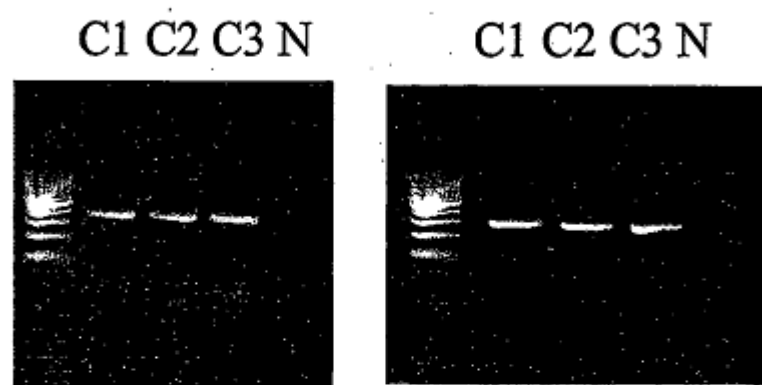


Figura 15

Figura 16

Figura 16a

Antes de la purificación

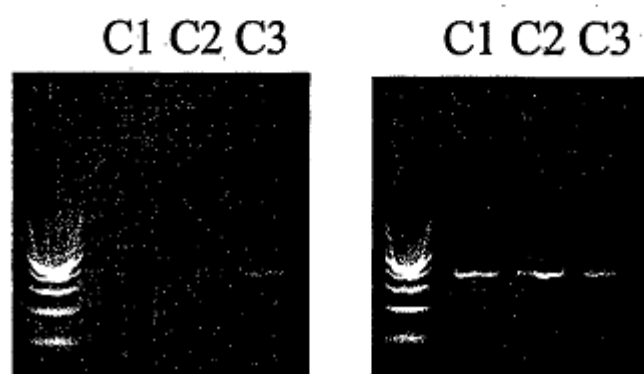


Mezcla Maestra Universal

Método de Referencia

Figura 16b

Después de la purificación



Mezcla Maestra Universal

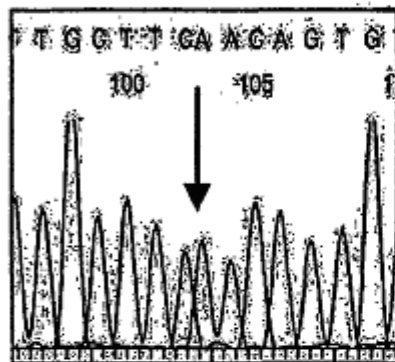
Método de Referencia

Figura 17

Figura 17a

Mezcla Maestra Universal

tipo silvestre



mutante (variación A>G)

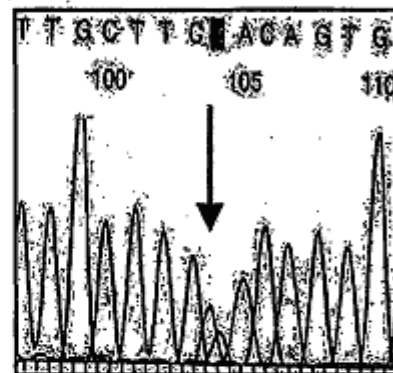
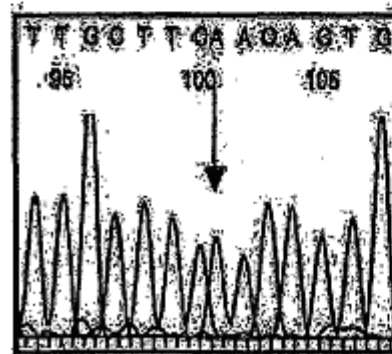


Figura 17b

Método de Referencia

tipo silvestre



mutante (variación A>G)

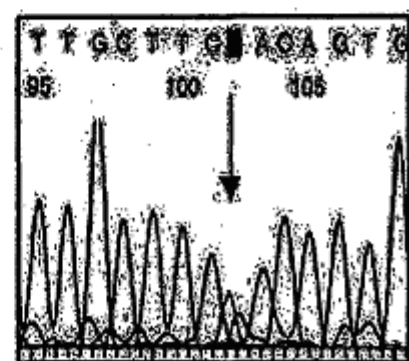
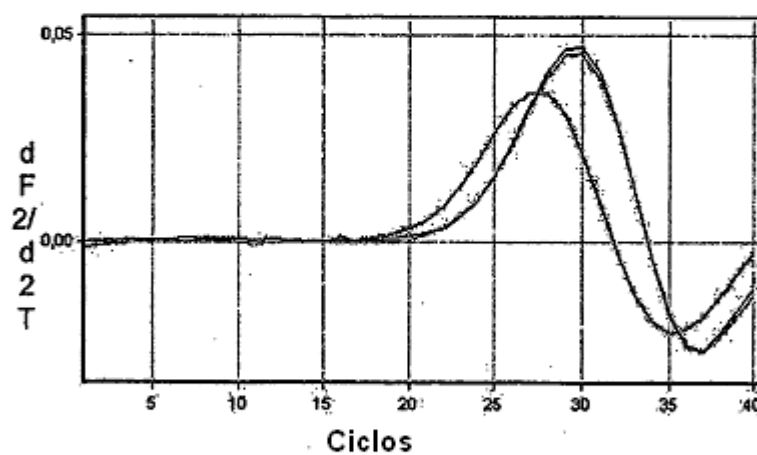


Figura 18

Figura 18a

Mezcla Maestra Universal

C1 C2 C3**Curva de derivación**

Color	Nombre	Derivación	Amplificación	Conc. Comparativa
■	C1	24,6	1,58	7,26E-06
■	C2	24,5	1,57	7,62E-06
■	C3	22,3	1,70	2,20E-05

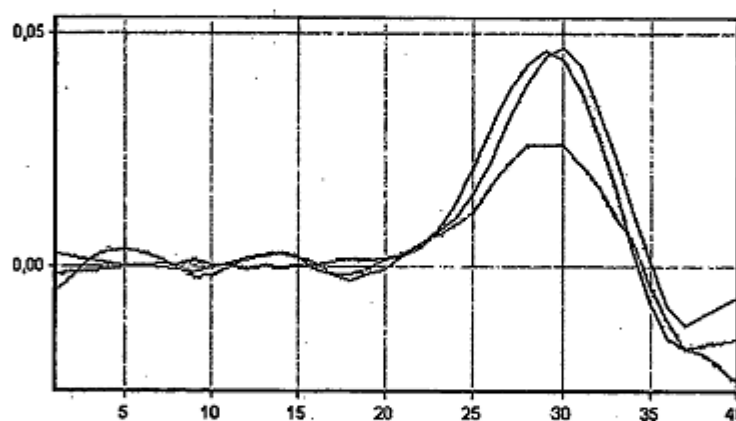
Figura 18b

Método de Referencia

C1 C2 C3



Curva de derivación



Nº	Color	Nombre	Derivación	Eficacia	Conc. Comparativa
5	■	C1	24,5	1,63	1,00E+00
6	■	C2	22,6	1,79	2,91E+00
7	■	C3	24,1	1,84	1,25E+00

Figura 19

Figura 19a

Mezcla Maestra Universal

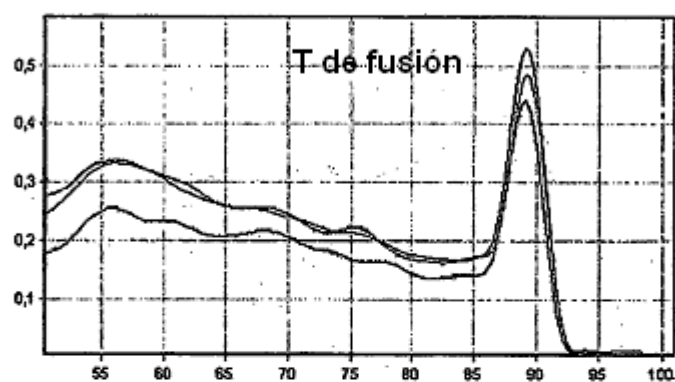


Figura 19b

Método de Referencia

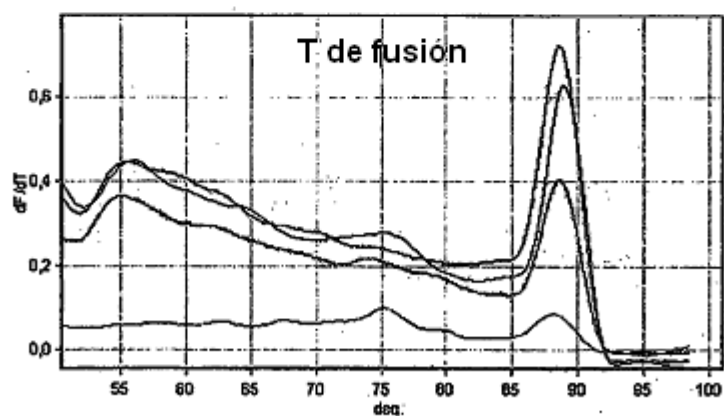
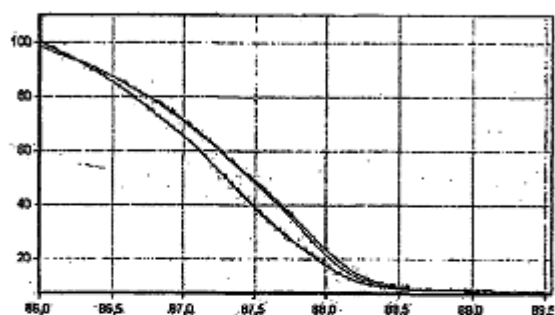
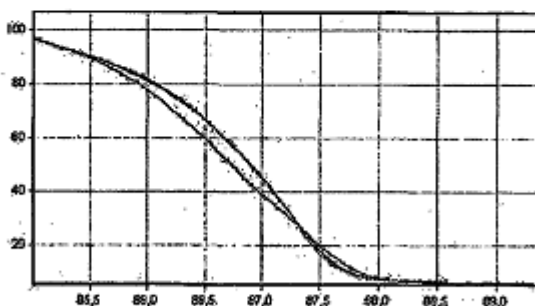


Figura 20**Figura 20a**
Mezcla Maestra Universal

Intervalo 85°C – 96°C

Color	Hombre	Genotipo	% Confianza
■	C1	wt	100,00
■	C2	wt	98,32
■	C3	Variación	50,50

Figura 20b
Método de Referencia

Intervalo 85°C – 96°C

Nº	Color	Hombre	Genotipo	% Confianza
5	■	C1	wt	100,00
6	■	C2	wt	99,09
7	■	C3	Variación	61,06

Figura 21

Figura 21a: Mezcla Maestra Universal

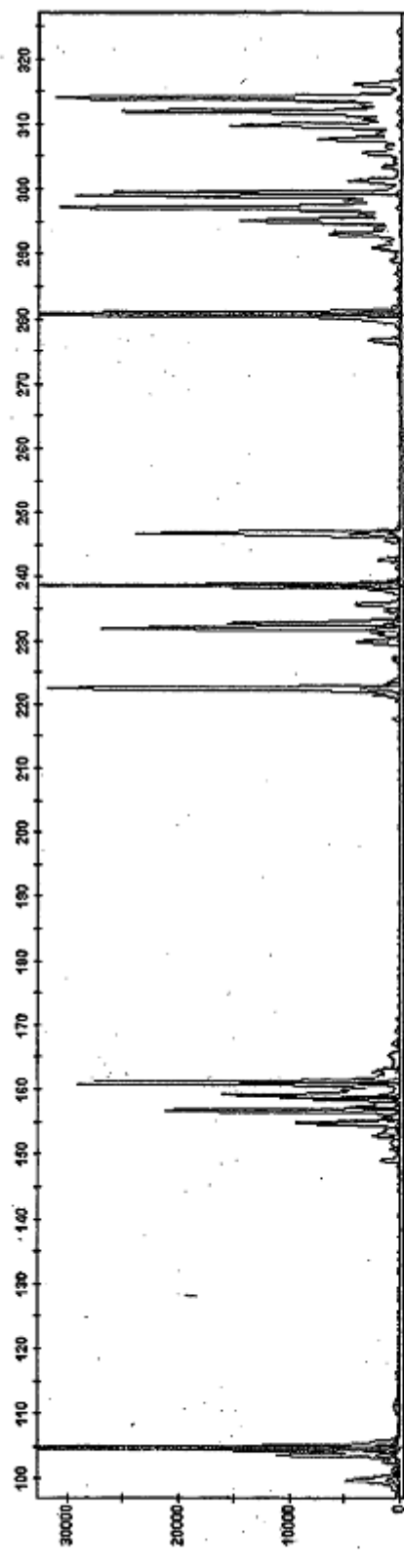


Figura 21b: Método de Referencia

