

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 055**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/FR2012/052934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12815741 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2791356**

54 Título: **Procedimiento de amplificación transcripcional de ácidos nucleicos que reúne etapas de temperaturas diferentes**

30 Prioridad:

**16.12.2011 FR 1161758**

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

**22.02.2018**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)  
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**LAAYOUN, ALI;  
LAURENT, ALAIN y  
MESTA, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 656 055 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

Procedimiento de amplificación transcripcional de ácidos nucleicos que reúne etapas de temperaturas diferentes

5 La presente invención se refiere a un procedimiento en el que al menos un ácido nucleico diana, presente en una muestra biológica, se amplifica mediante un procedimiento de amplificación transcripcional que permite reunir etapas de temperaturas diferentes, a saber la desnaturalización y la amplificación propiamente dicha.

10 El estado de la técnica está constituido de un cierto número de artículos científicos que tratan del efecto termo-estabilizante de los polioles sobre las enzimas, es en particular el caso de:

- Lee en 1981 en J. Biol. Chemistry 256(14):7193-7201, titulado: «The stabilization of proteins by sucrose», que describe el efecto termoestabilizante de la sacarosa sobre la  $\alpha$ -quimotripsina, el quimotripsinógeno y la ARNasa.

15 - Bernier en 1988 en J. Biotechnol. 7:293-298, que tiene por título: «Stabilization of  $\alpha$ -glucosidase by polyhydric alcohols» desmostrando el efecto termo-estabilizante de los polioles sobre la  $\alpha$ -glucosidasa.

- Carninci en 1998 en Proc. Natl Acad. Sci. 95 :520-524, titulado: «Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA» que presenta la termo-estabilización mediante la trehalosa de enzimas de transcripción inversa y de enzimas de restricción.

20 - Spiess en 2004 en Clinical chemistry 50 (7): 1256- 1259, titulado «Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by disaccharide trehalose», en el que se pone en evidencia el efecto termo-estabilizante de la trehalosa sobre la Taq polimerasa.

25 Es, por lo tanto, evidente que, desde hace una treintena de años, un número importante de investigadores se han interesado por el efecto termo-estabilizante de los polioles sobre las enzimas. Por otro lado, se ha depositado hace unos quince años una solicitud de patente bajo el número EP-A-0.821.058, que propone un método de mejora de una activación enzimática a temperatura elevada. La patente correspondiente reivindica la utilización de polioles para termo-estabilizar una polimerasa y una enzima de restricción.

30 A pesar del interés de los científicos, parece que nadie ha intentado adaptar este enfoque a las tecnologías de amplificación transcripcional, de tipo NASBA, TMA, etc. que, para funcionar, utilizan varias actividades enzimáticas diferentes. La primera etapa consiste en la desnaturalización de la diana, un ácido nucleico, generalmente un ácido ribonucleico (ARN), a 65°C durante 2 minutos, y la segunda etapa consiste en añadir unas enzimas necesarias para la amplificación isotermal a 41°C. Estas dos etapas hacen que el método sea técnicamente restrictivo para el usuario debido a la utilización de dos temperaturas sucesivas.

35 Además, la utilización de una sola temperatura (41°C) plantea actualmente problemas diversos, tales como la amplificación de las dianas ricas en guanina y citosina que presentan unas estructuras secundarias difícilmente amplificables. La solución más conocida para hacer que estas estructuras secundarias sean fácilmente amplificables mediante las técnicas de amplificación transcripcional es la utilización de un quinto nucleótido en la mezcla de amplificación, que es la ribosina trifosfato (K Nakahara *et al.* Nucleic Acids Res. 1 de abril de 1998; 26(7): 1854-1856).

40 Se pueden utilizar fácilmente unas dianas de ácido desoxirribonucleico (ADN) con la tecnología NASBA. Para hacer esto, es suficiente, por ejemplo, aplicar previamente a la muestra tratada un procedimiento según la patente EP-B-0.397.269 o según la solicitud de patente WO-A-02/070735, para permitir la amplificación de las dianas ADN.

45 Mientras que el experto en la materia ha utilizado este tipo de transcripción de las dianas de ADN con dos etapas de temperaturas diferentes durante décadas, no ha pensado aún en intentar mejorar la termo-estabilidad de las enzimas utilizadas para disminuir las restricciones de este tipo de procedimiento de amplificación transcripcional.

50 La presente invención describe por lo tanto una simplificación del método de amplificación transcripcional que se realiza en una sola etapa mediante la adición simultánea del ácido nucleico diana y de los reactivos de amplificación, tales como tampones, enzimas, nucleótidos, en presencia de aditivos químicos termo-estabilizantes, que permiten la utilización de una temperatura de amplificación más elevada con una alineación con la temperatura de la etapa de desnaturalización de dichas dianas. Es un efecto que es particularmente inesperado y por lo tanto sorprendente.

55 La novedad reside en la termo-estabilización simultánea del conjunto de las actividades enzimáticas, en particular de las tres actividades enzimáticas presentes en el método de amplificación NASBA, por la utilización de aditivos químicos de tipo polioles que permite preservar las actividades de ARN polimerasa T7, ARNasa H y AMV-RT a temperaturas más elevadas que 41°C, y que permiten así reunir las etapas experimentales de desnaturalización y de amplificación.

60 La presente invención propone un procedimiento de amplificación transcripcional en el que:

a) al menos un ácido nucleico diana, presente en una muestra biológica, se pone en presencia:

\* de cebadores de amplificación,

\* del conjunto de los reactivos necesarios para la realización de la amplificación, incluyendo las enzimas que participan en la amplificación, y

\* de al menos un poliol que permite estabilizar las enzimas necesarias para la realización de la amplificación,

b) se calienta la mezcla a una temperatura superior a 41°C,

c) se realiza una amplificación transcripcional del ácido nucleico diana a una temperatura superior a 41°C.

Según un modo de realización del procedimiento de amplificación, la temperatura a la que se realiza la amplificación está comprendida entre 41 y 49°C.

La presente invención propone un procedimiento de amplificación transcripcional isotérmica tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

Según otro modo de realización del procedimiento de amplificación, la temperatura a la que se realiza la amplificación es superior o igual a 46°C.

Sea cual sea el modo de realización del procedimiento de amplificación, las actividades enzimáticas aseguradas por las enzimas son:

\* la actividad ARN polimerasa (T7, SP6, etc.),

\* la actividad transcriptasa inversa (AMV-RT, MMLV-RT, etc.), y

\* la actividad RNasa H.

La actividad RNasa H puede darse por una enzima independiente (actividad denominada individual) o por una enzima que tiene otra actividad enzimática (actividad denominada asociada). Esta otra actividad asociada a la RNasa H puede darse por una enzima transcriptasa inversa o ARN polimerasa o una enzima diferente.

Las actividades enzimáticas permiten realizar unas amplificaciones isotérmicas, tales como:

- la NASBA (nucleic acid sequence-based amplification),

- la TMA (transcription mediated amplification),

- la 3SR (self-sustained sequence replication),

- la SMART (signal mediated amplification of RNA technology),

- la MDA (Multiple Displacement Amplification), y

- cualquier otra amplificación isotérmica que hace intervenir al menos una de las tres actividades citadas anteriormente y utilizadas para amplificaciones del genoma completo (whole genome amplification) o para amplificaciones de una secuencia específica ADN o ARN).

Sea cual sea el modo de realización del procedimiento de amplificación, el o los polioles están constituidos por uno de los compuestos o una combinación de los compuestos siguientes:

\* lactosa,

\* sorbitol,

\* sacarosa,

\* manitol, y

\* trehalosa.

Sea cual sea el modo de realización del procedimiento de amplificación, la concentración en poliol(es) está

comprendida entre 0,4 y 1,5 M.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de detección de amplicones obtenidos mediante el procedimiento de amplificación, tal como se ha descrito anteriormente, que consiste en añadir, durante la etapa a), al menos un tipo de sonda de detección por ácido nucleico diana buscado y susceptible de estar presente en la muestra biológica, y en efectuar la etapa suplementaria siguiente:

d) se efectúa la detección de la presencia de amplicones procedentes de la amplificación realizada en la etapa c) por hibridación de la sonda sobre cada amplicón en solución.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de pretratamiento del o de los ácidos nucleicos dianas buscados y susceptibles de estar presentes en la muestra biológica, y que deben ser amplificados, tales como se ha descrito anteriormente, que consiste en efectuar la etapa suplementaria siguiente antes de la etapa a) en la que dicha muestra biológica se somete a una temperatura inferior o igual a 65°C para el ARN y a una temperatura inferior o igual a 95°C para el ADN.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de pretratamiento del o de los ácidos nucleicos dianas buscados y susceptibles de estar presentes en la muestra biológica, y que deben ser amplificados, tal como se ha descrito anteriormente, que consiste en efectuar una etapa suplementaria, antes de la etapa a), en la que dicha muestra biológica se somete a una temperatura inferior o igual a 49°C.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la presencia de uno o varios tipos de ácidos nucleicos dianas buscados y susceptibles de estar presentes en la muestra biológica, que consiste en:

a) efectuar un procedimiento de pretratamiento, tal como se ha descrito anteriormente,

b) efectuar un procedimiento de amplificación, tal como se ha descrito anteriormente,

c) efectuar un procedimiento de detección, tal como se ha descrito anteriormente.

Según un modo de realización del procedimiento de diagnóstico, el conjunto del procedimiento se realiza en un solo recipiente.

Según una primera variante de realización del procedimiento, el conjunto del procedimiento se realiza a una temperatura única superior a 41°C.

Según una primera variante de realización del procedimiento anterior, el conjunto del procedimiento se realiza a una temperatura única comprendida entre 46 y 49°C.

Las figuras adjuntas se dan a título de ejemplo explicativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

Las figuras 1 representan el cribado funcional de compuestos termoestabilizantes durante amplificaciones NASBA a 46°C en presencia de 7,5 cp/reacción de transcritos VIH-1B (siete réplicas por cribado), con:

- la Figura 1A una concentración en lactosa de 0,21 M,

- la Figura 1B una concentración en maltosa de 0,9 M,

- la Figura 1C una concentración en rafinosa de 0,05 M,

- la Figura 1D una concentración en sorbitol de 1,2 M,

- la Figura 1E una concentración en sacarosa de 0,6 M, y

- la Figura 1F una concentración en turanosa de 1,09 M.

La figura 2 describe la actividad residual (%) del ARN polimerasa T7 después de 3 minutos de pre-incubación a diferentes temperaturas y en presencia de diferentes compuestos termoestabilizantes.

La figura 3A describe la actividad residual del ARN polimerasa T7 después de 15 minutos de pre-incubación a diferentes temperaturas, con o sin trehalosa 0,4 M.

La figura 3B describe la actividad residual de la ARNasa H después de 25 minutos de pre-incubación a diferentes temperaturas, con o sin trehalosa 0,4M.

La figura 3C describe la actividad residual de AMV-RT después de 25 minutos de pre-incubación a diferentes temperaturas, con o sin trehalosa 0,4 M.

5 La figura 4 propone la medición de la sensibilidad (%) obtenida en presencia de diferentes compuestos termo-estabilizantes durante una amplificación NASBA VIH-1 tipo B a 5 cps/ensayo y sin fase de desnaturalización de la diana (N=24). Cabe señalar que, a 46°C, la referencia que no se beneficie de aditivos termo-estabilizantes ya no permite obtener amplificación.

10 A pesar de que la utilización de azúcares, y más generalmente de polioles, para termo-estabilizar las enzimas es una información que puede encontrarse en la bibliografía, su utilización a fuertes concentraciones en una amplificación transcripcional, tal como NASBA, para producir una amplificación isotérmica a más de 41°C, en particular a más de 44°C y preferiblemente a más de 46°C, con una posible pre-incubación de hasta 49°C y un avance técnico que permite simplificar técnicamente este tipo de amplificación para el usuario final.

15 A pesar de que funciona entre 41 y 45°C, es necesario, en particular, aumentar la temperatura de amplificación NASBA a 46°C a fin de facilitar la desnaturalización de dianas estructuradas, permitiendo así mejorar los rendimientos de detección.

20 Los ejemplos siguientes utilizan el método de amplificación transcripcional e isotérmica NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). Sin embargo, el enfoque descrito en este documento es también aplicable a los otros métodos de amplificación isotérmica tales como la TMA (Transcription Mediated Amplification) o 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) por ejemplo (Gill y Ghaemi, 2008, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 27:224-245; Leone *et al.* 1998, NAR, 26-9: 2150-2155).

25 La tecnología NASBA es una tecnología alternativa a la PCR que permite, a diferencia de esta última, la detección de los microorganismos vivos (bacterias, virus, etc.) por amplificación de ARN. Esta tecnología de amplificación requiere tres actividades enzimáticas para funcionar, incluyendo la ARN polimerasa T7, la ARNasa H y la AMV-RT. Entre estas tres actividades enzimáticas, la ARN polimerasa T7 es la enzima más termosensible.

30 Ejemplo 1: selección de los compuestos termo-estabilizantes compatibles con el método de amplificación transcripcional e isotérmica NASBA.

35 Se evaluó un conjunto de compuestos con propiedades termo-estabilizantes o supuestas como tales en un ensayo de amplificación NASBA VIH-1 2.0, sobre una plataforma de amplificación Nuclisens EasyQ™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se han utilizado de 5 cp a 30 cp de un transcrito VIH-1 de tipo B como diana en cada reacción en presencia o en ausencia del compuesto a evaluar.

40 La obtención de una amplificación en presencia del compuesto a una temperatura de 46°C permite validar el compuesto como compatible y termo-estabilizante para la reacción NASBA.

45 Como lo muestran los ejemplos de las figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F, la presencia o la ausencia de una amplificación NASBA a 46°C permite seleccionar fácilmente los compuestos termo-estabilizantes tales como la sacarosa, el sorbitol y la lactosa que dan, en la mayor parte de los casos, una amplificación que tiene una señal correcta (al menos cuatro señales positivas sobre siete réplicas). Los aditivos así aislados se estudian más precisamente a continuación.

50 Ejemplo 2: selección de los compuestos termoestabilizantes por seguimiento de la desnaturalización térmica de la ARN polimerasa T7 por espectrofotometría UV

55 Se demuestra en este ejemplo que la temperatura de desnaturalización de la ARN polimerasa T7 (Tm T7) aumenta considerablemente en presencia de algunos aditivos químicos, en comparación con la del control sin aditivo. La ARN polimerasa T7 se ha seleccionado como enzima modelo ya que es más sensible a la desnaturalización térmica, la Tm T7 sin aditivo es de 48,5°C.

60 Se usa una técnica de espectrofotometría UV para medir las Tm T7. Se mide la evolución de la absorbancia de la proteína a  $\lambda = 280$  nm en función de la temperatura. Cuando la enzima se calienta, la solución se vuelve turbia, se forman unos agregados que corresponden a la forma desnaturalizada. La Tm corresponde a la temperatura para la cual se tiene el 50% de forma nativa y el 50% de forma desnaturalizada (primera derivada de la curva absorbancia = f(temperatura)).

65 En un frasco de polipropileno, se mezclan 4 ml de tampón fosfato PBS 300 mM (Aldrich P-4417, St Quentin Fallavier, Francia), después 12  $\mu$ l de enzima ARN polimerasa T7 (bioMérieux, Marcy, Francia) a 17 mg/ml, es decir una concentración final en proteína de 0,05 mg/ml. Se introduce después en un recipiente de cuarzo para espectrofotometría UV, 500  $\mu$ l de una solución de ARN polimerasa T7 a 0,05 mg/ml y 500  $\mu$ l de una solución de aditivos (Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) concentrada o de PBS 300 mM para el control. Después de la

homogeneización, se mide la evolución de la absorbancia a  $\lambda = 280$  nm en función de la temperatura, entre 30 y 65°C a 1°C/min., a fin de determinar la Tm T7 como se ha descrito anteriormente (espectrofotómetro UV Cary, Varian, Les Ulis, Francia).

- 5 Algunos resultados representativos obtenidos según el método descrito anteriormente se detallan en la tabla 1 siguiente (los  $\Delta T_m$  se detallan en función del tipo de aditivo).

	<b>Aditivos</b>	<b><math>\Delta T_m</math> (°C)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Número de experimentos</b>
ARN polimerasa T7 a 0,05 mg/ml	PBS, 150 mM, pH 7,5	-	1,6	26
idem	PBS, 150 mM, pH 7,5 / Sorbitol 1M	+ 0,9	1,1	3
idem	PBS, 150 mM, pH 7,5 / sacarosa 1M	+ 5,8	1,0	3
idem	PBS, 150 mM, pH 7,5 / Lactosa (0,35M)	+ 5,5	0,2	3
idem	PBS, 150 mM, pH 7,5 / Rafinosa (0,085M)	+0,5	0,2	3
idem	PBS, 150 mM, pH 7,5 / D-Turanosa (0,15 M)	-4,4	0,1	2

Tabla 1: Tabla resumen de las mediciones de  $\Delta T_m$  observadas en función del tipo de aditivo

- 10 Se observa claramente que el calentamiento de la enzima ARN polimerasa T7 en presencia de algunos aditivos como el sorbitol, la sacarosa o la lactosa permite aumentar muy significativamente la temperatura de desnaturalización de la enzima, en varios grados, lo que confirma su termo-estabilización.
- 15 Ejemplo 3: medición de termo-estabilidad ( $T_{1/2}$ ) a 46°C para la ARN polimerasa T7

En este ejemplo, los valores de  $T_{1/2}$  de la ARN polimerasa T7 se determinan en presencia o en ausencia de polioles. Se presenta a continuación una descripción del método de medición, así como los diferentes reactivos utilizados.

<b>Tampón A</b>	<b>Tampón B</b>	<b>Tampón C</b>	<b>Tampón D</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM, pH 7,5 NaCl 100 mM Trehalosa 1 M EDTA 1 mM Triton X-100 0,268% (v/v) BSA 0,1 mg/ml DTT 1mM	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 KCl 300 mM Trehalosa 1 M EDTA 7 mM Triton X-100 0,21% (p/v) BSA 0,2 mg/ml DTT 1 mM Acetato de magnesio 20m M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 200 mM, pH 7,2 Trehalosa 1 M Triton X-100 0,21% (p/v)  DTT 1 mM	Tris-HCl 3,2mM, pH 7,5  NaCl 6,4 mM DTT 0,13 mM BSA 1,3 mg/ml Trehalosa 340 mM

- 20 Solución W1:

Mezclar los tampones B, C y D según las proporciones siguientes a los reactivos Nuclisens™ VIH-1 2.0 (ref.: 285033, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) siguiente (para ocho reacciones):

- 25 - 36,08  $\mu$ l de tampón A
- 6,32  $\mu$ l de tampón B
- 30 - 25,36  $\mu$ l de tampón C
- 173,6  $\mu$ l de tampón D
- ocho microesferas de tipo accusphere «reagent accuspheres Nuclisens™ VIH-1 2.0»
- 35 - 960  $\mu$ l de diluyente «Reagent diluent Nuclisens™ VIH-1 2.0»

Solución S (mezcla sustrato):

- 40 - Tris-HCl a 70 mM, pH 8,5
- dNTP a 1,3 mM cada uno

## ES 2 656 055 T3

- rATP, rCTP et rUTP a 2,6 mM cada uno
- rGTP a 2 mM
- 5 - rITP a 0,6 mM
- sacarosa a 60 mM
- Manitol a 40 mM
- 10 - Dextrano T-40 a 7 g/l
- MgCl<sub>2</sub> a 16 mM
- 15 - KCl a 320 mM
- DTT a 20 mM
- DMSO a 3,5 M
- 20 - Baliza molecular (Molecular Beacon) MB1 entre 0,1 a 0,3 μM
- oligonucleótido T7-Min entre 10 nM y 20 nM
- 25 - oligonucleótido T7-plus entre 10 nM y 20 nM

Secuencias utilizadas (orientación 5' – 3'):

T7-min	AATTCTAATACGACTCACTATAGTATGAGGGCAGCAGACATCGAATTT
T7-plus	AAATTCGATGTCTGCTGCCCTCATACTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
MB1	FAM - CTATCCCTTCGATGTCTGCTGCCCTCGGGATAG - Dabcyl

- 30 1. Las enzimas a evaluar se diluyen de tal manera que obtengan una actividad volumétrica de 109 kU/ml.
- 2. Un volumen de 20 μl de la enzima a evaluar se diluye en 840 μl de solución W1.
- 3. Después, se añaden 114 μl del compuesto a evaluar a 193,5 μl de mezcla enzimática descrita en el punto 2
- 35 anterior.
- 4. Se realizan 12 porciones de 20 μl de la mezcla que se ha generado en el punto 3, se reparten en tubos de 0,2 ml y se incuban a la temperatura de 46°C en un termociclador. Se retira un tubo del termociclador cada 10 minutos durante 110 minutos y se almacena a 4°C antes de la medición de la actividad enzimática residual.
- 40 5. A 5 μl de esta mezcla preincubada se añaden 20 μl de solución S a fin de medir la velocidad de aumento de fluorescencia entre 5 y 10 minutos asociada a la actividad residual de la enzima.
- 45 6. La actividad residual de cada ARN polimerasa T7 se expresa en porcentaje de la fracción de enzima que no ha sido pre-incubada y que corresponde al 100% de actividad según el cálculo siguiente:
- \*  $\rho_N$  = pendiente obtenida entre 5 y 10 minutos para la ARN polimerasa T7 no pre-incubada,
- \*  $\rho_T$  = pendiente obtenida entre 5 y 10 minutos para la ARN polimerasa T7 pre-incubada a 46°C en presencia o en
- 50 ausencia de polioles, y
- \* % de actividad relativa =  $\% (\rho_T / \rho_N)$ .
- 7. el valor de  $T_{1/2}$  corresponde al tiempo que se necesita para que la enzima no posea más del 50% de su actividad
- 55 inicial.

Los resultados de la medición de  $T_{1/2}$  de la ARN polimerasa T7 se describen en la Tabla 2:

	Molaridad final	T <sub>1/2</sub> 46°C (min)
<b>Referencia</b>	-	7
<b>Trehalosa</b>	0,40	63
<b>Lactosa</b>	0,26	17

<b>Sacarosa</b>	0,74	~125
<b>Sorbitol</b>	1,48	>125

Tabla 2: Valores de las termo-estabilidades  $T_{1/2}$  de la ARN polimerasa T7 a 46°C

5 Según la tabla 2, se constata que todos los compuestos químicos evaluados tienen un efecto termo-estabilizante sobre la actividad ARN polimerasa T7 que funciona en un entorno propio de la NASBA. El sorbitol 1,48 M genera el efecto termo-estabilizante más importante, mientras que la lactosa posee un bajo poder termo-estabilizante sobre la ARN polimerasa T7, incluso si es visible y significativa.

10 Ejemplo 4: Medición de la temperatura máxima de pre-incubación que permite conservar la actividad ARN polimerasa T7

En este ejemplo, se determina la temperatura máxima que podía soportar la ARN polimerasa T7 durante una pre-incubación de 3 minutos en presencia de compuestos termo-estabilizantes. Esta etapa se puede comparar con una fase de pre-desnaturalización o de pre-incubación de las dianas.

15 El protocolo utilizado en este ejemplo es similar al del ejemplo 2 con la excepción del hecho de que las temperaturas son variables y que el tiempo de pre-incubación se ha fijado a 3 minutos.

20 La figura 2 muestra que la sacarosa 0,7 M, la trehalosa 0,4 M y el sorbitol 1,4 N permiten preservar el 100% de la actividad ARN polimerasa T7 durante 3 minutos a 48°C, incluso 3 minutos a 49°C para el sorbitol.

Ejemplo 5: Medición de termo-estabilidad a diferentes temperaturas para la ARN polimerasa T7, la ARNasa H y la AMV-RT en presencia o en ausencia de trehalosa 0,4 M

25 Por un lado, y como lo muestran las figuras 3A, 3B y 3C, este ejemplo pone en evidencia que la ARN polimerasa T7 (T7) es la más termosensible y que la utilización de aditivo tal como trehalosa permite hacerla más termoestable. Por otro lado, se pone también en evidencia el efecto termo-estabilizante de la trehalosa sobre las actividades ARNasa H (RH) y AMV-RT (RT).

30 Descripción del método de medición de las actividades ARN polimerasa T7, ARNasa H y AMV-RT para el ejemplo 5:

1. Las enzimas ARN polimerasa T7, ARNasa H y AMV-RT se utilizan para actividades volumétricas de 109 kU/ml, 1 kU/ml y 25 kU/ml respectivamente.

35 2. Las enzimas ARN polimerasa T7, ARNasa H y AMV-RT se diluyen en la solución w1 del ejemplo 3 según las relaciones 1/43, 2/191 y 2/27 respectivamente, a fin de mimetizar el entorno fisicoquímico de la reacción NASBA.

3. A las mezclas anteriores se añade entonces una solución de trehalosa 1,1 M a fin de obtener una concentración final de 0,4 M.

40 4. Se distribuyen entonces unas porciones de 20  $\mu$ l de la solución en unos tubos de 0,2 ml y se incuban durante un tiempo determinado a diferentes temperaturas.

45 5. La actividad residual de cada una de las actividades ARN polimerasa T7, ARNasa H o AMV-RT se mide entonces por adición de 5  $\mu$ l de solución enzimática a 20  $\mu$ l de solución S que contiene los reactivos que corresponden a cada una de las actividades medidas.

Solución S para medir la actividad ARN polimerasa T7:

50 Similar al ejemplo 3

Solución S para medir la actividad ARNasa H:

55 - dNTP a 1,3 mM cada uno,

- rATP, rCTP, rUTP a 2,6 mM cada uno,

- rGTP a 2 mM,

60 - rITP a 0,25mM,

- sacarosa a 60 mM,

## ES 2 656 055 T3

- Manitol a 40 mM,
  - Dextrano T-40 a 7 g/l,
  - 5 - MgCl<sub>2</sub> a 16 mM,
  - KCl a 400 mM,
  - DTT a 25 mM,
  - 10 - Tris-HCl a 80mM, pH 8,5,
  - DMSO a 4,4M, y
  - 15 - Sonda RNaseH entre 0,2 y 2 μM: 5' FAM-AUAA-TAMRA 3'.
- Solución S para medir la actividad ADN-dependiente de AMV-RT:
- dNTP a 0,3 mM cada uno,
  - 20 - rATP, rCTP, rUTP a 0,6 mM cada uno,
  - rGTP a 0,5 mM,
  - 25 - rITP a 0,25 mM,
  - sacarosa 15 mM,
  - Manitol a 10 mM,
  - 30 - Dextrano T-40 a 1,7 g/l,
  - MgCl<sub>2</sub> a 4 mM,
  - 35 - KCl a 800 mM,
  - DTT a 50 mM,
  - Tris-HCl a 165 mM, pH 8,5,
  - 40 - DMSO a 8,8 M,
  - Baliza molecular MB2 entre 0,2 y 2 μM, y de fórmula: 5' ROX-GATGCGGAGCGCAGTAGACATGCATCCGAACATCACAGCAGACACAGCCTGGTTTT-DABCYL 3', y
  - 45 - Oligonucleótido PRT entre 1 y 5 μM y de fórmula: 5' - AAAACCAGGCTGTGTCTG - 3'
6. La actividad residual de cada mutante se expresa en porcentaje de la fracción de enzima que no se ha pre-incubado y que corresponde al 100% de actividad según el cálculo siguiente:
- 50 -  $\rho_N$  = pendiente obtenida entre 5 y 10 min para la enzima no pre-incubada,
  - $\rho_T$  = pendiente obtenida entre 5 y 10 min para la enzima pre-incubada a diferentes temperaturas, con o sin la presencia del poliol a estudiar, y
  - 55 - porcentaje de actividad relativa = % ( $\rho_T / \rho_N$ ).
- Ejemplo 6: Estudio de la sensibilidad de la detección mediante un método de amplificación transcripcional NASBA a 46°C y en presencia de compuestos termo-estabilizantes
- 60 En este ejemplo, se pone en evidencia que es posible realizar una amplificación NASBA a 46°C en presencia de compuestos termo-estabilizantes y sin fase de desnaturalización de los transcritos VIH-1B utilizados como dianas a la concentración de 5 cps/reacción, límite de la detección NASBA. Esto tiene como objetivo simplificar el método mediante la adición simultánea de las dianas a las mezclas enzimas y reactivos de amplificación.
- 65 Se ha utilizado un kit de amplificación Nuclisens™ HIV-1 2.0 (Ref.: 285033, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) para

## ES 2 656 055 T3

realizar los experimentos de amplificación en presencia de trehalosa, sacarosa o sorbitol, en límite de detección con un transcrito VIH-1 tipo B a 5 cps/ensayo. Cada amplificación se replica 24 veces a fin de estimar la sensibilidad del ensayo en presencia de compuestos termo-estabilizantes a 46°C.

- 5 La sensibilidad se expresa en porcentaje de señales positivas determinadas por el sistema de análisis EasyQ™ con respecto al número total de réplicas.

10 La figura 4 demuestra el interés de utilizar unas temperaturas de reacción más elevadas que 41°C en presencia de algunos polioles de por las ganancias de sensibilidad obtenidas, en particular con el sorbitol que permite detectar el 100% de los transcritos VIH1-B.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de amplificación transcripcional isoterma en una sola etapa en el que:
- 5 a) al menos un ácido nucleico diana, presente en una muestra biológica, se pone en presencia de los compuestos siguientes:
- \* cebadores de amplificación,
  - 10 \* del conjunto de los reactivos necesarios para la realización de la amplificación, incluyendo las enzimas que participan a la amplificación, y
  - \* de al menos un poliol que permite estabilizar las enzimas necesarias para la realización de la amplificación,
- 15 b) se realiza una desnaturalización de las dianas calentando la mezcla a una temperatura superior a 44°C, en presencia del conjunto de los compuestos,
- c) se realiza una amplificación transcripcional del ácido nucleico diana a dicha temperatura superior a 44°C,
- 20 reuniéndose las etapas de desnaturalización y de amplificación.
2. Procedimiento de amplificación, según la reivindicación 1, en el que la temperatura a la que se realizan la desnaturalización y la amplificación está comprendida entre 44 y 49°C.
- 25 3. Procedimiento de amplificación, según la reivindicación 1, en el que la temperatura a la que se realizan la desnaturalización y la amplificación es superior o igual a 46°C.
4. Procedimiento de amplificación, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las actividades enzimáticas aseguradas por las enzimas son:
- 30 i. la actividad ARN polimerasa (T7, SP6, etc.),
- ii. la actividad transcriptasa inversa (AMV-RT, MMLV-RT, etc.), y
- 35 iii. la actividad ARNasa H.
5. Procedimiento de amplificación, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el o los polioles están constituidos por uno de los compuestos o una combinación de los compuestos siguientes:
- 40 i. lactosa,
- ii. sorbitol,
- iii. sacarosa,
- 45 iv. manitol, y
- v. trehalosa.
- 50 6. Procedimiento de amplificación, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración en poliol(es) es de 0,4 a 1,5 M.
7. Procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que una etapa de pretratamiento del o de los ácidos nucleicos dianas buscados y susceptible(es) de estar presente(s) en la muestra biológica y que debe(n) ser amplificado(s) se efectúa antes de la etapa a) y en la que dicha muestra biológica se somete a una temperatura inferior o igual a 65°C para el ARN y a una temperatura inferior o igual a 95°C para el ADN.
- 55 8. Procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que una etapa de pretratamiento del o de los ácidos nucleicos dianas buscados y susceptible(s) de estar presente(s) en la muestra biológica y que debe(n) ser amplificado(s) se efectúa antes de la etapa a) y en la que dicha muestra biológica se somete a una temperatura inferior o igual a 49°C.
- 60 9. Procedimiento de detección de amplicones obtenidos mediante el procedimiento de amplificación, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que consiste en añadir durante la etapa a) al menos un tipo de sonda de detección por ácido nucleico diana buscado y susceptible de estar presente en la muestra biológica, y en efectuar la etapa suplementaria siguiente:
- 65

d) se efectúa la detección de la presencia de amplicones procedentes de la amplificación realizada en la etapa c) por hibridación de la sonda sobre cada amplicón en solución.

5 10. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la presencia de uno o diferentes tipos de ácidos nucleicos dianas buscados y susceptibles de estar presentes en la muestra biológica, que consiste:

a) en efectuar un procedimiento de amplificación, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

10 b) en efectuar un procedimiento de detección, según la reivindicación 9.

11. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado por que el conjunto del procedimiento se realiza en un solo recipiente.

15 12. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, caracterizado por el hecho de que el conjunto del procedimiento se realiza a una temperatura única superior a 44°C.

13. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, caracterizado por el hecho de que el conjunto del procedimiento se realiza a una temperatura única comprendida entre 46 y 49°C.

20

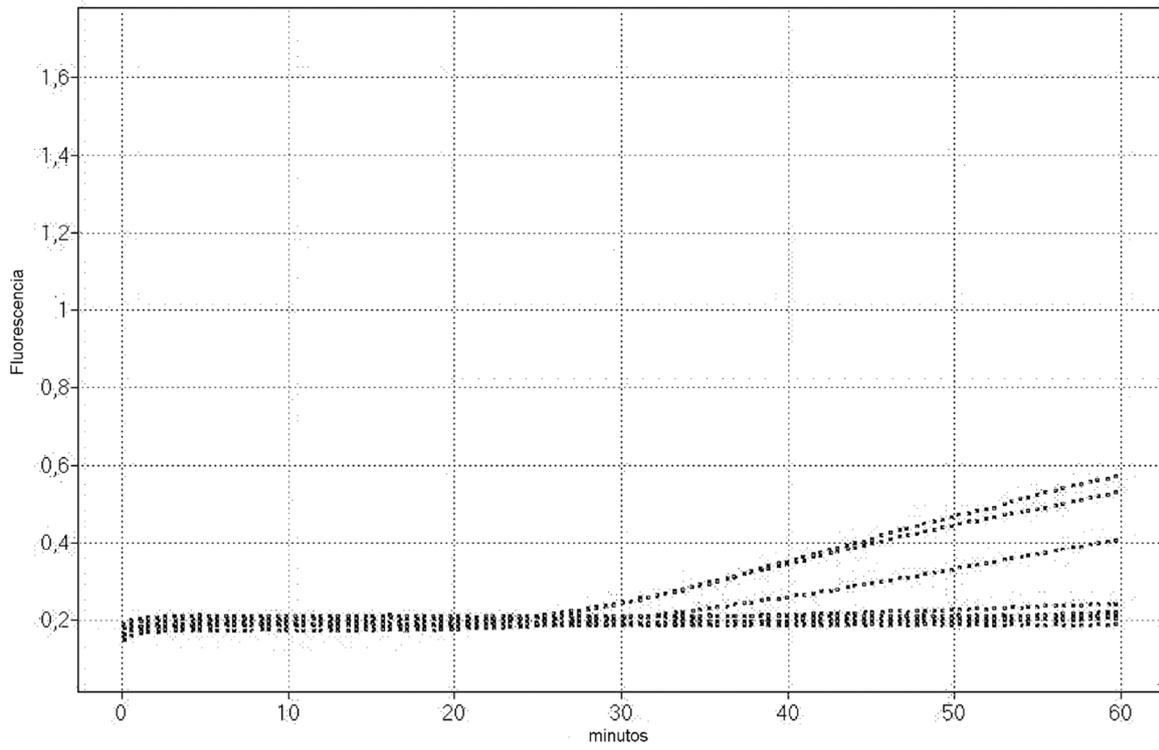


Figura 1A

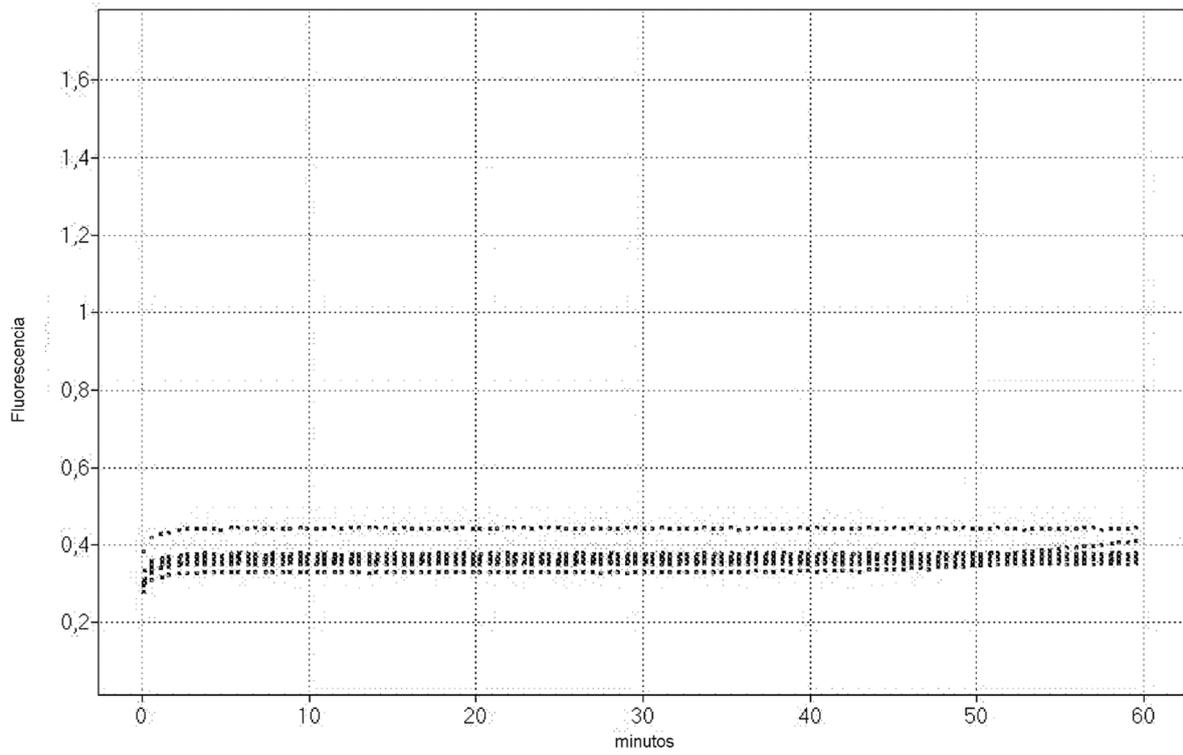


Figura 1B

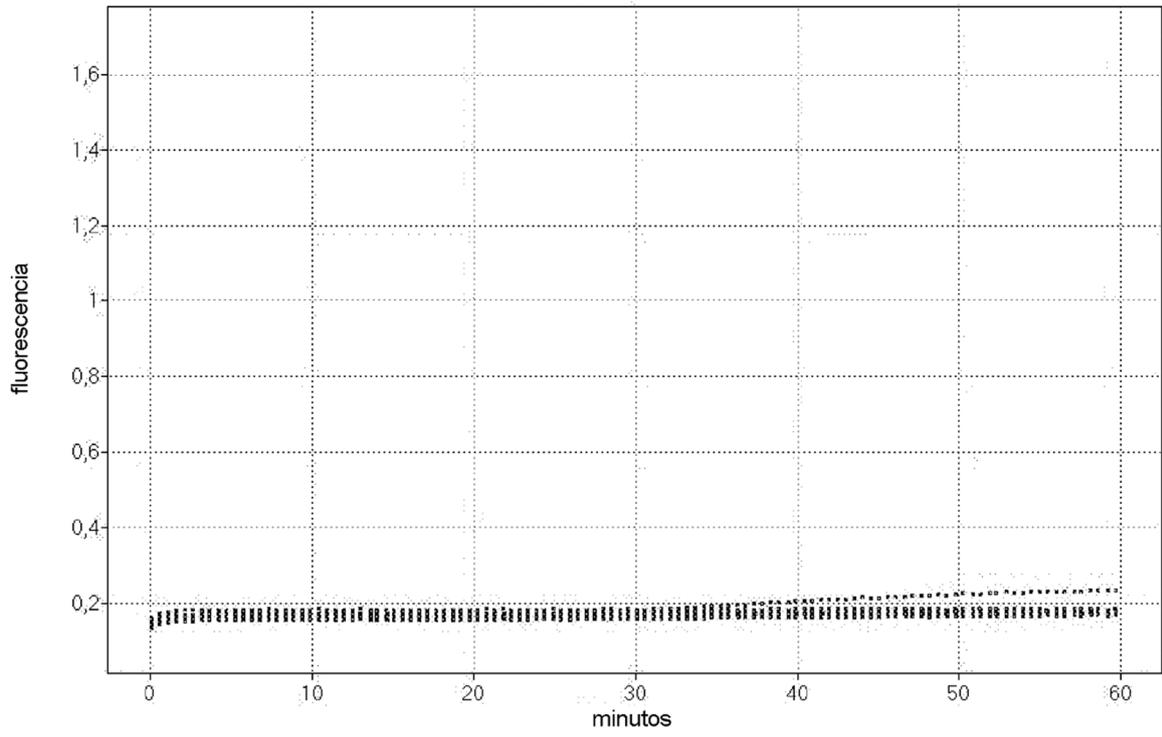


Figura 1C

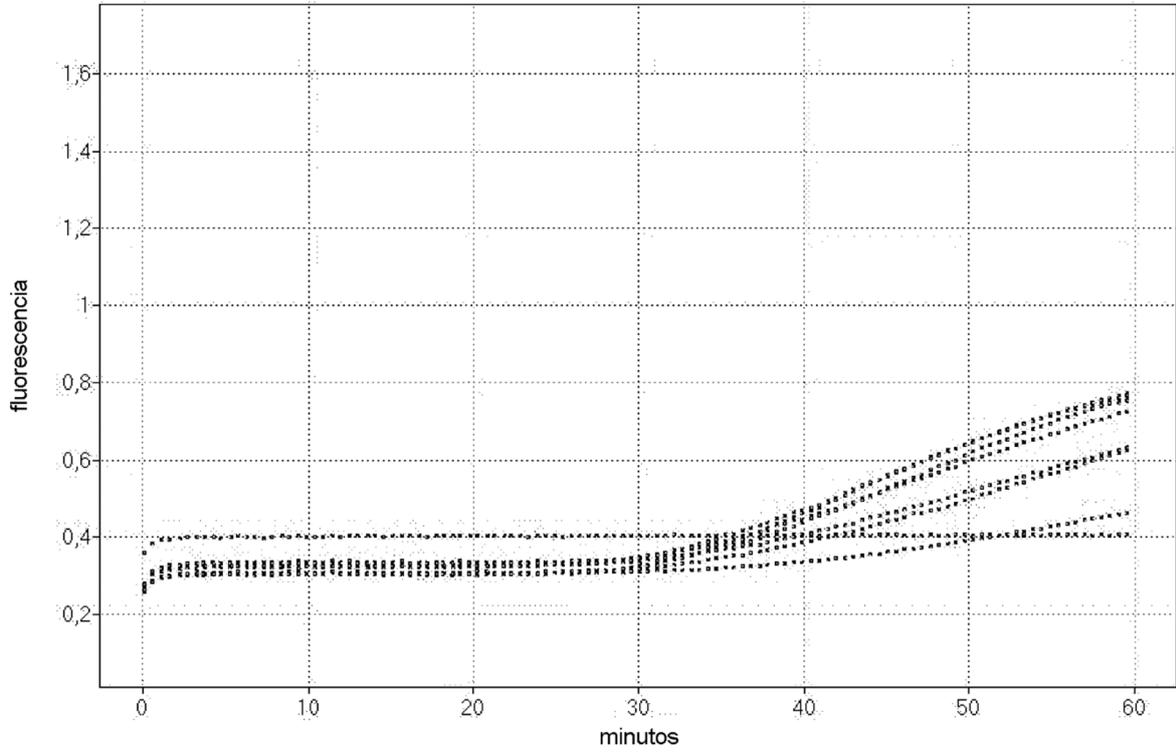


Figura 1D

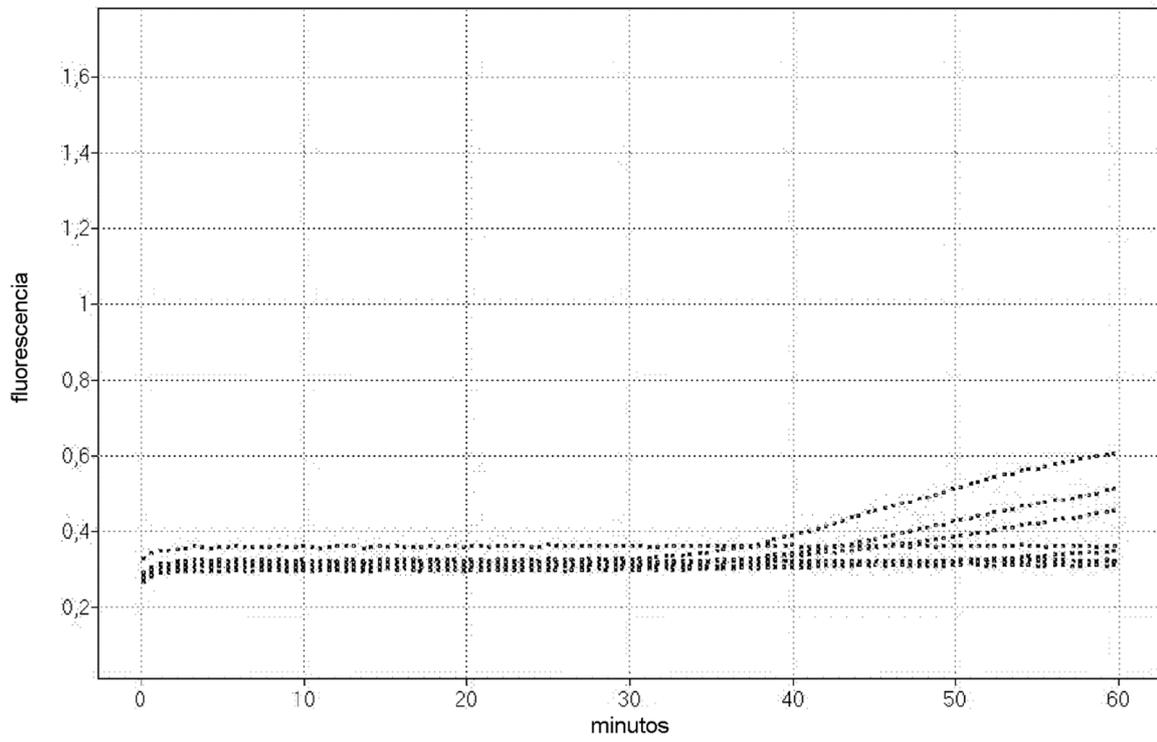


Figura 1E

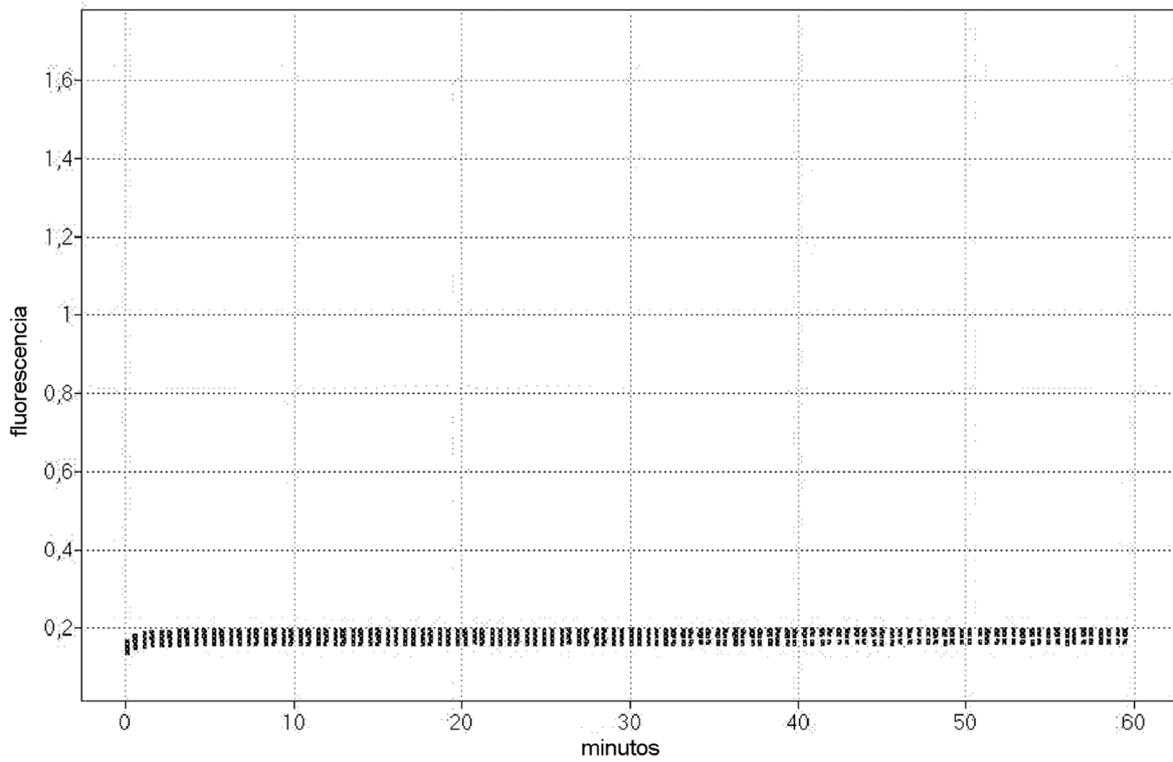


Figura 1F

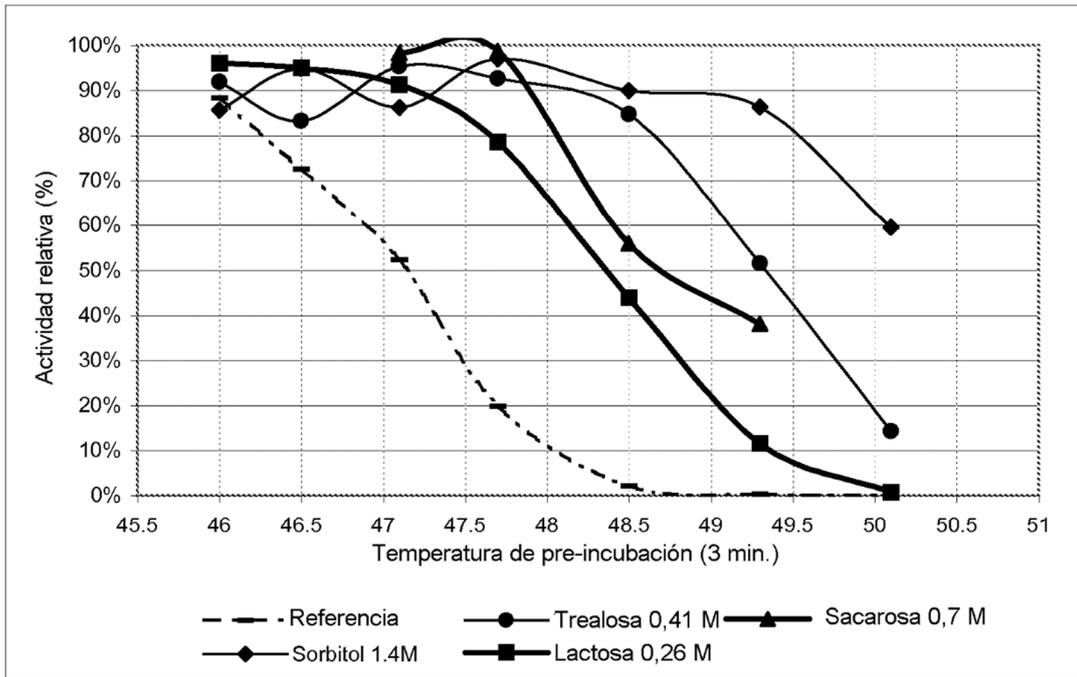


Figura 2

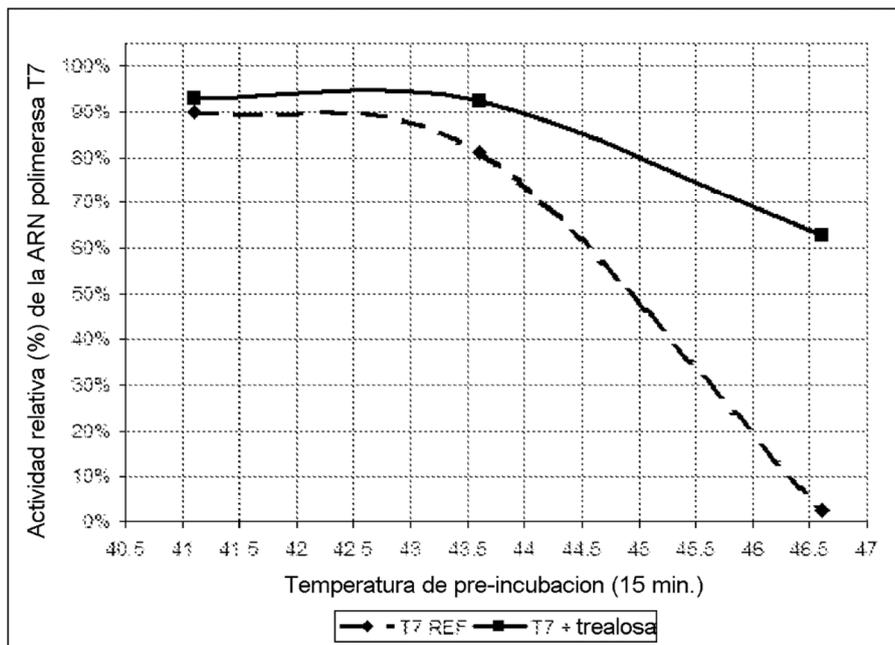


Figura 3A

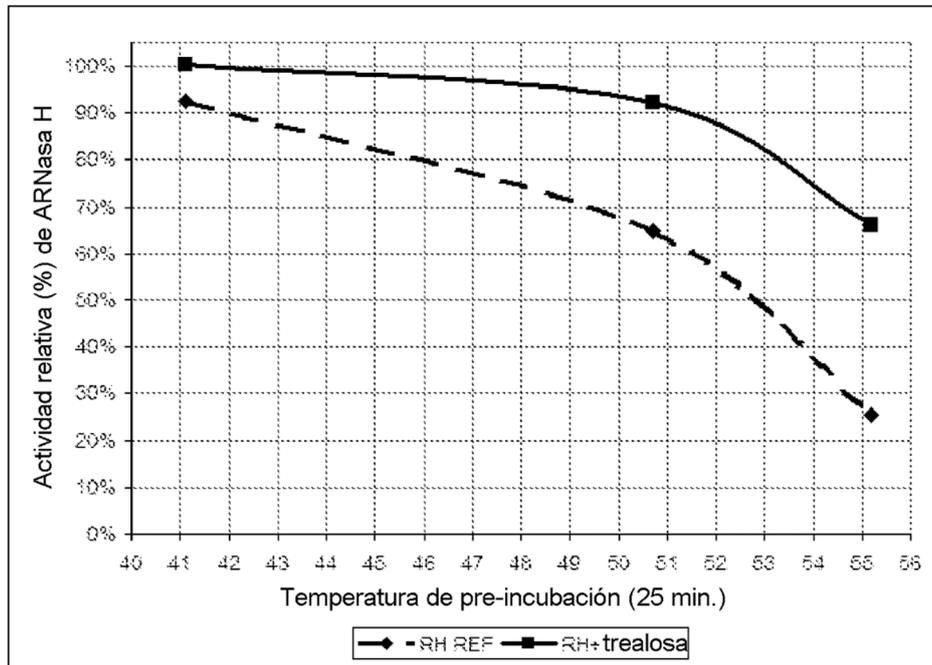


Figura 3B

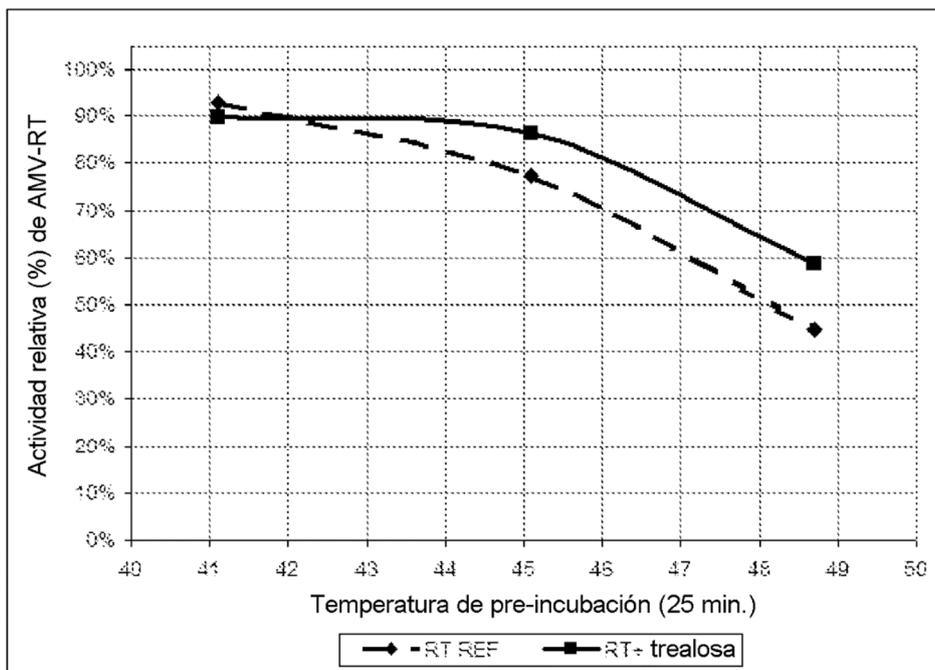


Figura 3C

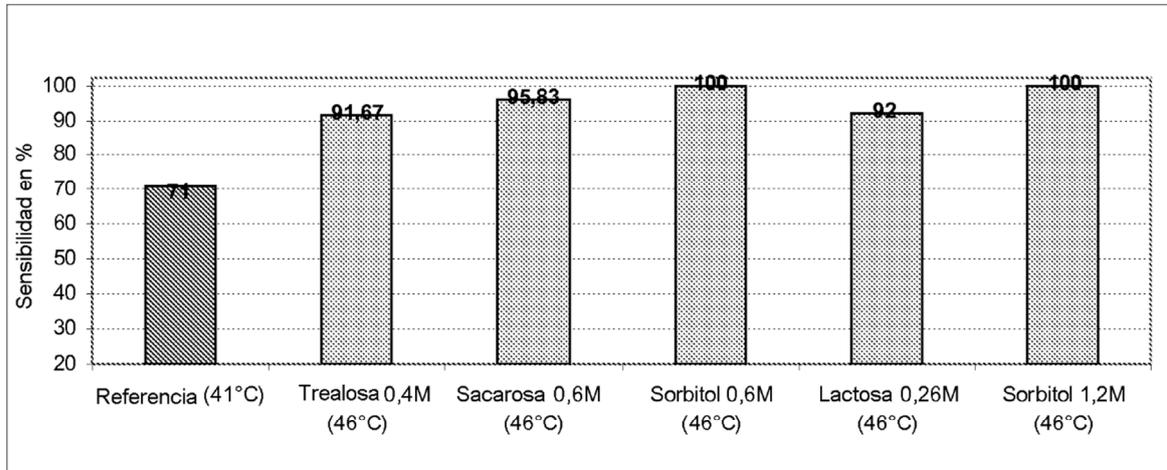


Figura 4