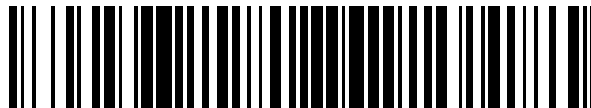


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 538**

51 Int. Cl.:

C12N 9/96

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080387**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15816751 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3234127**

54 Título: **Mezclas de reacción estables**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094284 P

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

21.06.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ, TOMAS y
SMITH, EDWARD**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 717 538 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

Mezclas de reacción estables

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona mezclas de reacción estables y procedimientos para su preparación. Las mezclas de reacción estables son útiles en muchas técnicas de ADN recombinante, especialmente la amplificación de ácido nucleico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Para abordar la dificultad de producción de composiciones polipeptídicas estables, las proteínas se preparan típicamente en forma sólida para proporcionar un período de validez aceptable. Un procedimiento estándar para preparar composiciones de proteínas en forma sólida es la liofilización (secado por congelación), pero este procedimiento crea tensiones que pueden desnaturalizar las proteínas en diversos grados (Wang, W. (2000) *International Journal of Pharmaceutics* 203; 1-60). Pocos compuestos de reacción biológicos son estables en forma solubilizada durante cualquier período de tiempo y esto es especialmente cierto para el almacenamiento a temperatura ambiente. En consecuencia, se han realizado numerosos estudios para evaluar las posibilidades de potenciar las capacidades de almacenamiento de los compuestos de reacción biológicos en forma seca. En general se acepta que será necesario usar al menos un aditivo estabilizante a fin de asegurar la actividad biológica, por ejemplo, de una polimerasa tras su resolubilización.

15

20

25

30

El documento WO 2008/36544 describe el uso de los llamados materiales de relleno a fin de proporcionar composiciones secadas, los materiales de relleno son, por ejemplo, carbohidratos tales como FICOLL, sacarosa, glucosa, trehalosa, melecitosa, DEXTRANO o manitol, proteínas tales como BSA, gelatina o colágeno y polímeros tales como PEG o polivinilpirrolidona (PVP). Los materiales de relleno formadores de vidrio para estabilizar reactivos biológicos se describen además en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.098.893, 5.200.399 y 5.240.843. El material de relleno FICOLL es un copolímero divulgado en la patente de EE. UU. n.º 3.300.474. Los procedimientos de secado de las mezclas de reacción líquidas son la mayoría del tiempo muy complejos por su naturaleza y, por lo tanto, los procedimientos de secado son exigentes y costosos.

35

El secado por congelación (patente de EE. UU. n.º 5.593.824) o secado a vacío (patente de EE. UU. n.º 5.565.318) se usa para secar los materiales biológicos en una matriz polimérica de carbohidratos. La liofilización o secado por congelación es una técnica bien establecida para el almacenamiento de proteínas que se divulga en muchos documentos del estado de la técnica (por ejemplo, Passot, S., *et al.*, *Pharmaceutical Development and Technology* 12 (2007) 543-553; Carpenter, J. F., *et al.*, *Pharmaceutical Research* 14(8) (1997) 969-975; Schwegman, J. J., *et al.*, *Pharmaceutical Development and Technology* 10 (2005) 151-173).

40

Una selección de las condiciones de secado para diferentes mezclas de reacción para aplicaciones de secuenciación que comprenden modificaciones genéticas de la polimerasa Taq se describe en la patente de EE. UU. n.º 7.407.747. Los procedimientos de secado usados son el secado por congelación, SpeedVac sin calor adicional, SpeedVac con calor adicional y secado al aire a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción dentro de la presente patente se sometieron a prueba con respecto a una variedad de crioprotectores tales como trehalosa, sacarosa, glucosa y trimetilamina-*N*-óxido (TMANO). Además, también se realizaron experimentos sin crioprotectores en absoluto, pero no se divulgó ningún dato relativo a la estabilidad de esas mezclas de reacción con el tiempo. Se informó de una buena estabilidad durante hasta 8 semanas solo para mezclas de reacción que comprenden trehalosa y seroalbúmina bovina (BSA).

45

50

Además, la patente de EE. UU. n.º 7.407.747 divulga experimentos con la polimerasa en diferentes mezclas de secuenciación donde cada mezcla de secuenciación comprende diferentes composiciones de solución tampón, nucleótidos trifosfato y nucleótidos con marcador de fluorescencia y cebadores. Sin embargo, no se divulga si una polimerasa en mezclas para amplificaciones de PCR ultrarrápida, a saber, mezclas que comprenden solución tampón, nucleótidos trifosfato, cebadores y sondas de detección, se puede secar y almacenar sin afectar a la actividad de PCR de la polimerasa.

55

La patente de EE. UU. n.º 8.652.811 divulga un procedimiento para secar una ADN polimerasa Taq dentro de una mezcla de PCR ultrarrápida, mientras que la composición seca obtenida se puede almacenar sin afectar al rendimiento de la PCR de la ADN polimerasa Taq. El documento US2003/0119042 A1 describe el uso de carbohidratos no reductores para preparar composiciones secadas que contienen enzimas.

60

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona mezclas de reacción estables usadas para la amplificación de ácidos nucleicos por PCR y RT-PCR (PCR con retrotranscriptasa) que comprenden un sacárido (por ejemplo, sacarosa)

65

que se han secado sin necesidad de liofilización o secado por congelación. La presente invención también proporciona procedimientos para preparar mezclas de reacción secadas.

5 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención implica una composición de mezcla de reacción seca para la
amplificación de ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la
polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR) que comprende al menos una enzima relacionada con la
amplificación de un ácido nucleico, monómeros de nucleósidos, acetato de manganeso ($Mn(OAc)_2$) y un sacárido,
en la que la composición se prepara secando la composición de mezcla de reacción en forma acuosa en
ausencia de liofilización. También se divulga que la composición tiene una estabilidad mejorada en comparación
10 con una mezcla de reacción que se (i) liofiliza; y/o (ii) carece de un sacárido. En algunos modos de realización, el
sacárido se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa,
ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos. También se divulga que la composición conserva su actividad tras el
almacenamiento en condiciones que son, o equivalen a, 45 °C durante 3 meses. En algunos modos de
realización, la composición comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste
15 en un aptámero, un detergente, un tampón, una sal y un oligonucleótido. En algunos modos de realización, la al
menos una enzima relacionada con la amplificación de un ácido nucleico es una polimerasa termoestable
seleccionada del grupo que consiste en ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.*
Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasa de *Thermotoga maritima*, polimerasa de *Thermotoga neapolitana*,
polimerasa TMA-25, polimerasa TMA-30, ADN polimerasa Tth, así como polimerasas termoestables modificadas,
20 o cualquier combinación de las mismas. En algunos modos de realización, el sacárido está presente en una
cantidad tal que si la composición se reconstituye en solución acuosa, la concentración del sacárido está entre
aproximadamente 50 mM a aproximadamente 1000 mM. En algunos modos de realización, el sacárido es
sacarosa. También se divulga que la composición conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones
que son, o equivalen a, la temperatura ambiente durante 12 meses.

25 En otro aspecto, la presente invención implica un procedimiento de preparación de una composición de mezcla
de reacción seca, comprendiendo el procedimiento secar una mezcla de reacción en forma acuosa en ausencia
de liofilización, en el que la mezcla de reacción en forma acuosa comprende al menos una enzima relacionada
con la amplificación de un ácido nucleico, monómeros de nucleósidos, acetato de manganeso ($Mn(OAc)_2$) y un
sacárido. En algunos modos de realización, el sacárido se selecciona del grupo que consiste en sacarosa,
30 trehalosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos. También se divulga
que la composición conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones que son, o equivalen a, 45 °C
durante 3 meses. En algunos modos de realización, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente. En
algunos modos de realización, el sacárido está en una concentración entre aproximadamente 50 mM y
35 aproximadamente 1000 mM en la mezcla de reacción en forma acuosa. En algunos modos de realización, el
sacárido es sacarosa. En algunos modos de realización, la al menos una enzima relacionada con la
amplificación de un ácido nucleico es una polimerasa termoestable seleccionada del grupo que consiste en ADN
polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*,
polimerasa de *Thermotoga maritima*, polimerasa de *Thermotoga neapolitana*, polimerasa TMA-25, polimerasa
40 TMA-30, ADN polimerasa Tth, así como polimerasas termoestables modificadas, o cualquier combinación de las
mismas. También se divulga que la composición conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones
que son, o equivalen a, la temperatura ambiente durante 12 meses.

45 Los modos de realización y ventajas de la invención se describen con más detalle en la descripción detallada de
la invención y en las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La FIG. 1 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas
lioofilizadas (A) y no liofilizadas (B) el día 1 de almacenamiento a 42 °C.

La FIG. 2 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas
lioofilizadas (A) y no liofilizadas (B) el día 15 de almacenamiento a 42 °C.

55 La FIG. 3 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas
lioofilizadas (A) y no liofilizadas (B) el día 29 de almacenamiento a 42 °C.

La FIG. 4 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas
lioofilizadas (A) y no liofilizadas (B) el día 49 de almacenamiento a 42 °C.

60 La FIG. 5 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas
no liofilizadas el día 90 de almacenamiento a 42 °C.

65 La FIG. 6 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas
no liofilizadas el día 26 de almacenamiento a temperatura ambiente.

La FIG. 7 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas no liofilizadas el día 71 de almacenamiento a temperatura ambiente.

5 La FIG. 8 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas no liofilizadas el día 222 de almacenamiento a temperatura ambiente.

La FIG. 9 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas no liofilizadas el día 299 de almacenamiento a temperatura ambiente.

10 La FIG. 10 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas no liofilizadas el día 353 de almacenamiento a temperatura ambiente.

La FIG. 11 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas por las mezclas maestras de reacción secas no liofilizadas el día 379 de almacenamiento a temperatura ambiente.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona mezclas de reacción estables, procedimientos para su preparación, procedimientos para su uso y kits que las comprenden. Las mezclas de reacción estables son útiles en muchas técnicas de ADN recombinante, especialmente la amplificación de ácido nucleico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En particular, la presente invención proporciona mezclas de reacción no liofilizadas estables que contienen una enzima (por ejemplo, una enzima usada en la amplificación de ácido nucleico) y un glúcido. Dichas mezclas de enzima se pueden secar en ausencia de liofilización y almacenar a largo plazo a temperatura ambiente sin una pérdida significativa de la actividad enzimática.

25 **I. Definiciones**

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se puede usar esencialmente cualquier procedimiento y material similar a los descritos en el presente documento, en la práctica o pruebas de la presente invención, solo se describen procedimientos y materiales ejemplares. Para los propósitos de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

30 Los términos "un", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural, a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

El término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención engloba variaciones del valor indicado de +/-15 %, +/-10 %, +/-5 %, +/-3 %, +/-2 % o +/-1 % y el valor indicado por sí mismo.

40 El término "liofilización" se refiere a la creación de una preparación estable de una sustancia biológica por congelación rápida y deshidratación del producto congelado en alto vacío y también se denomina comúnmente "secado por congelación".

45 El término "no liofilizado", "secado" o "seco" se refiere a un procedimiento para secar una sustancia biológica no utilizando el procedimiento de liofilización.

El término "temperatura ambiente" se refiere a la temperatura del entorno y es sinónimo de "temperatura ambiente" cuando se refiere a la temperatura de un edificio interior con control de temperatura. Típicamente, la temperatura ambiente se refiere a un intervalo de temperatura de entre 15 °C y 25 °C, aunque temperaturas un poco más frescas o más cálidas todavía se pueden considerar dentro del intervalo de temperatura ambiente.

50 El término "aptámero" se refiere a un ADN monocatenario que reconoce y se une a ADN polimerasa e inhibe eficazmente la actividad de polimerasa como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.693.502. El uso de aptámero y dUTP/UNG en RT-PCR también se analiza, por ejemplo, en Smith, E.S. *et al*, (Amplification of RNA: High-temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-activated Thermostable DNA Polymerase, en PCR Primer: A Laboratory Manual, 2.ª edición, Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 211-219, (2003)).

60 "Recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se ha modificado intencionalmente por procedimientos recombinantes. El término "ácido nucleico recombinante" en el presente documento significa un ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general, por la manipulación de un ácido nucleico por endonucleasas de restricción, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por tanto, un ácido nucleico de ADN polimerasa mutante aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que no están unidas normalmente se consideran ambos recombinantes para los propósitos de la presente invención. Se entiende que

una vez que se prepara un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula huésped, se replicará de forma no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de las manipulaciones *in vitro*; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque se replican de forma no recombinante posteriormente, todavía se consideran recombinantes para los propósitos de la invención. Una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

Un ácido nucleico se "enlaza de forma funcional" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si se sitúa para facilitar la traducción.

El término "célula huésped" se refiere tanto a los organismos eucariotas y procariotas unicelulares (por ejemplo, bacterias, levaduras y actinomicetos) como a células sueltas de animales o plantas de orden superior cuando se cultivan en cultivo celular.

El término "vector" se refiere a una porción de ADN, típicamente bicatenario, que puede tener insertada en la misma una porción de ADN exógeno. El vector puede ser, por ejemplo, de origen plasmídico. Los vectores contienen secuencias de polinucleótidos de "replicón" que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula huésped. El ADN exógeno se define como ADN heterógeno, que es ADN no encontrado naturalmente en la célula huésped, que, por ejemplo, replica la molécula del vector, codifica un marcador seleccionable o cribable o codifica un transgén. El vector se usa para transportar el ADN exógeno o heterógeno en una célula huésped adecuada. Una vez en la célula huésped, el vector se puede replicar independientemente o coincidiendo con el ADN cromosómico del huésped y se pueden generar varias copias del vector y su ADN insertado. Además, el vector también puede contener los elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado en una molécula de ARNm o de otro modo provocar la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión contienen adicionalmente elementos de secuencia adyacentes al ADN insertado que incrementan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula de proteína. Se pueden sintetizar rápidamente, por tanto muchas moléculas de ARNm y polipéptido codificadas por el ADN insertado.

El término "nucleótido", además de hacer referencia a los monómeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido naturales, se entenderá que en el presente documento se refiere a variantes estructurales relacionadas del mismo, incluyendo derivados y análogos, que sean funcionalmente equivalentes con respecto al contexto particular en el que se usa el nucleótido (por ejemplo, hibridación a una base complementaria), a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que se puede corresponder con un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo del mismo. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo, modificadas química o bioquímicamente) de los mismos y polímeros mixtos (por ejemplo, que incluyen subunidades tanto de ADN como de ARN). Las modificaciones ejemplares incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), restos pendientes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, soraleno y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada por medio de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros de nucleótido se enlazan por medio de enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describe en Nielsen *et al.* (*Science* 254:1497-1500, 1991)). Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ARN o ADN no marcado, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario, bicatenario o tricatenario y no está limitado a ninguna longitud particular. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos). Un oligonucleótido incluye típicamente de aproximadamente seis a aproximadamente 175 unidades monoméricas de ácido nucleico, más típicamente de aproximadamente ocho a aproximadamente 100 unidades monoméricas de ácido nucleico, y todavía más típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o más unidades monoméricas de ácido nucleico). El tamaño exacto de un oligonucleótido dependerá de muchos

factores, incluyendo el uso o función final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, pero no limitado a, aislamiento de una secuencia existente o natural, replicación o amplificación de ADN, retrotranscripción, clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa por un procedimiento tal como el procedimiento de fosfotriéster de Narang *et al.* (*Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979); el procedimiento de fosfodiéster de Brown *et al.* (*Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979); el procedimiento de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.* (*Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862, 1981); el procedimiento de triéster de Matteucci *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191, 1981); procedimientos de síntesis automatizados; o el procedimiento de soporte sólido de Caruthers *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.458.066, u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

El término "cebador" como se usa en el presente documento se refiere a un polinucleótido que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos dirigida por molde cuando se dispone en condiciones en las que se inicia la extensión de polinucleótidos (por ejemplo, en condiciones que comprenden la presencia de nucleósidos trifosfato requeridos (como se dicta por el molde que se copia) y una polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada o ciclo(s) de temperatura (por ejemplo, como en una reacción en cadena de la polimerasa)). Para ilustrar adicionalmente, también se pueden usar los cebadores en una variedad de otros procedimientos de síntesis mediada por oligonucleótidos, incluyendo como iniciadores de la síntesis de ARN *de novo* y procedimientos relacionados con la transcripción *in vitro* (por ejemplo, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), etc.). Un cebador es típicamente un oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, oligodesoxirribonucleótido). La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero típicamente varía de 6 a 40 nucleótidos, más típicamente de 15 a 35 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas requieren, en general, temperaturas más frescas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero debe ser suficientemente complementario para hibridarse con un molde para que se produzca la elongación del cebador. En determinados modos de realización, el término "par de cebadores" significa un conjunto de cebadores que incluye un cebador en sentido 5' (a veces llamado "directo") que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a amplificar y un cebador en antisentido 3' (a veces llamado "inverso") que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia que se va a amplificar (por ejemplo, si la secuencia diana se expresa como ARN o es un ARN). Un cebador se puede marcar, si se desea, incorporando un marcador detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, tintes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (como se usan comúnmente en ensayos ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

El término "convencional" o "natural" cuando se refiere a bases de ácidos nucleicos, nucleósidos trifosfato o nucleótidos se refiere a los que se producen naturalmente en el polinucleótido que se describe (es decir, para el ADN estos son dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Adicionalmente, con frecuencia se utilizan dITP y 7-desaza-dGTP en lugar de dGTP y se puede utilizar 7-desaza-dATP en lugar de dATP en reacciones de síntesis de ADN *in vitro*, tales como secuenciación. Conjuntamente, estos se pueden denominar dNTP.

El término "no convencional" o "modificado" cuando se refiere a una base de ácidos nucleicos, nucleósido o nucleótido incluye modificación, derivaciones o análogos de bases, nucleósidos o nucleótidos convencionales que se producen naturalmente en un polinucleótido particular. Determinados nucleótidos no convencionales están modificados en la posición 2' del glúcido ribosa en comparación con los dNTP convencionales. Por tanto, aunque para el ARN los nucleótidos naturales son ribonucleótidos (es decir, ATP, GTP, CTP, UTP, conjuntamente rNTP), porque estos nucleótidos tienen un grupo hidroxilo en la posición 2' del glúcido, que, en comparación, está ausente en los dNTP, como se usa en el presente documento, los ribonucleótidos son nucleótidos no convencionales como sustratos para las ADN polimerasas. Como se usa en el presente documento, los nucleótidos no convencionales incluyen, pero no se limitan a, compuestos usados como finalizadores para la secuenciación de ácidos nucleicos. Los compuestos finalizadores ejemplares incluyen pero no se limitan a los compuestos que tienen una estructura 2',3' didesoxi y se denominan didesoxinucleósidos trifosfato. Los didesoxinucleósidos trifosfato ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP se denominan conjuntamente ddNTP. Los ejemplos adicionales de compuestos finalizadores incluyen análogos de 2'-PO₄ de ribonucleótidos (véase por ejemplo, la publicación de solicitudes de EE. UU. n.ºs 2005/0037991 y 2005/0037398). Otros nucleótidos no convencionales incluyen dNTP de fosforotioato ([α-S]dNTP), 5'-[α-borano]-dNTP, dNTP de [α]-metilfosfonato y ribonucleósidos trifosfato (rNTP). Las bases no convencionales se pueden marcar con isótopos radiactivos, tales como ³²P, ³³P o ³⁵S; marcadores fluorescentes; marcadores quimioluminiscentes; marcadores bioluminiscentes; marcadores con hapteno tales como biotina; o marcadores enzimáticos tales como estreptavidina o avidina. Los marcadores fluorescentes pueden incluir tintes que están cargados negativamente, tales como tintes de la familia de la fluoresceína, o tintes que tienen carga neutra, tales como tintes de la familia de la rodamina, o tintes que están cargados positivamente, tales como tintes de la familia de la cianina. Por ejemplo, los tintes de la familia de la fluoresceína incluyen FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los tintes de la familia de la rodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G y TAMRA. Diversos tintes o nucleótidos marcados con FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, Texas Red y TAMRA se comercializan por Perkin-Elmer (Boston, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA) o Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). Los

tintes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7, y se comercializan por GE Healthcare UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

El término "valor de Pc" o valor de "punto de corte" se refiere a un valor que permite la cuantificación de ácidos nucleicos diana de entrada. Se puede determinar el valor de Pc de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada (Van Luu-The, *et al.*, "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction", *BioTechniques*, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, pp. 287-293). En el procedimiento de la segunda derivada, un Pc corresponde al primer pico de una curva de segunda derivada. Este pico corresponde al comienzo de una fase semilogarítmica. El procedimiento de la segunda derivada calcula un valor de segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia en tiempo real, y solo se obtiene un valor. El procedimiento de Pc original se basa en una aproximación diferenciable definida localmente de los valores de intensidad, por ejemplo, por una función polinómica. A continuación, se calcula la tercera derivada. El valor de Pc es la raíz más pequeña de la tercera derivada. También se puede determinar el Pc usando el procedimiento del punto de ajuste, en el que se determina el Pc por la intersección de una paralela a la línea umbral en la región semilogarítmica (Van Luu-The, *et al.*, *BioTechniques*, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, pp. 287-293). El valor de Pc proporcionado por el instrumento LightCycler ofrecido por Roche se determina mediante cálculo de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada.

El término "eficacia de la PCR" se refiere a una indicación de la eficacia de amplificación de ciclo a ciclo. La eficacia de la PCR se calcula para cada condición usando la ecuación: % de eficacia de la PCR = $(10^{-(\text{pendiente})} - 1) \times 100$, en la que la pendiente se calculó por regresión lineal con el logaritmo del número de copias representado en el eje y, y el Pc representado en el eje x. La eficacia de la PCR se puede medir usando un molde de cebador perfectamente emparejado o emparejado erróneamente.

El término "FRET" o "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" o "transferencia de energía por resonancia de Förster" se refiere a una transferencia de energía entre al menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado extintor). El donante transfiere típicamente la energía al aceptor cuando se excita el donante por radiación lumínica con una longitud de onda adecuada. El aceptor reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. Cuando el aceptor es un extintor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Que un fluoróforo particular actúe como un donante o como un aceptor depende de las propiedades del otro miembro del par de FRET. Los pares donante-aceptor usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated ADN Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se pueden usar de manera intercambiable y todas estas designaciones incluyen su descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula transformada primaria y cultivos derivados de esa célula sin tener en cuenta el número de transferencias. Toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. La descendencia mutante que tiene la misma funcionalidad que la cribada en la célula transformada originalmente se incluye en la definición de transformantes. Las células pueden ser procariontas o eucariotas.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada de forma funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosoma, elementos retrorreguladores positivos (véase la patente de EE. UU. n.º 4.666.848), y posiblemente otras secuencias. Es conocido que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El término "enlazado de forma funcional" se refiere al posicionamiento de la secuencia codificante de modo que las secuencias de control funcionarán para dirigir la expresión de la proteína codificada por la secuencia codificante. Por tanto, una secuencia codificante "enlazada de forma funcional" a secuencias de control se refiere a una configuración en la que las secuencias codificantes se pueden expresar bajo la dirección de una secuencia de control.

Los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas, típicamente de origen bacteriano, que cortan el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

En el presente documento se definen las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína, glicina), cadenas laterales

beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

El término "solución de reactivo" es cualquier solución que contenga al menos un reactivo necesario o usado para propósitos de PCR. Los ingredientes más típicos son polimerasa, nucleótido, cebador, iones, magnesio, sales, agentes de tamponación del pH, nucleótidos trifosfato (NTP) o desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), sonda, tinte fluorescente (se puede fijar a la sonda), agente de unión a ácido nucleico, molde de ácido nucleico. El reactivo también puede ser otro aditivo de reacción de polimerasa, que influye en la reacción de polimerasa o en su supervisión.

El término "mezcla maestra" se refiere a una mezcla de todos o la mayoría de los ingredientes o factores necesarios para que se produzca la PCR, y en algunos casos, todos excepto el molde y los cebadores que son específicos de muestra y amplicón. Las mezclas maestras disponibles comercialmente son normalmente soluciones concentradas. Una mezcla maestra puede contener todos los reactivos comunes para múltiples muestras, pero también se puede preparar para una muestra solo. El uso de mezclas maestras ayuda a reducir los errores de pipeteo y las variaciones entre las muestras debido a las diferencias entre los volúmenes pipeteados.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima que es estable al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de cebadores posteriores después de que se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica y se ejemplifican en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.965.188 y 4.889.818. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura tal como PCR. Los ejemplos de polimerasas de ácido nucleico termoestables incluyen ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga maritima* tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, ADN polimerasa Tth y similares.

Una polimerasa termoestable "modificada" se refiere a una polimerasa en la que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma natural de la polimerasa u otra forma modificada de la polimerasa. Las modificaciones ejemplares incluyen inserciones, deleciones y sustituciones de monómeros. Las polimerasas modificadas también incluyen polimerasas quiméricas que tienen secuencias de componentes identificables (por ejemplo, dominios estructurales o funcionales, etc.) derivadas de dos o más polimerasas originales. También se incluyen dentro de la definición de polimerasas modificadas las que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Los ejemplos de polimerasas termoestables modificadas incluyen ADN polimerasa G46E E678G CS5, ADN polimerasa G46E L329A E678G CS5, ADN polimerasa G46E L329A D640G S671F CS5, ADN polimerasa G46E L329A D640G S671F E678G CS5, una ADN polimerasa G46E E678G CS6, ADN polimerasa Z05, polimerasa ΔZ05, polimerasa ΔZ05-Gold, polimerasa ΔZ05R, ADN polimerasa Taq E615G, polimerasa TMA-25 E678G, polimerasa TMA-30 E678G y similares.

El término "polimerasa termoactiva" se refiere a una enzima que es activa a las temperaturas elevadas necesarias para asegurar un cebado específico y una extensión de cebadores (por ejemplo, 55-80 °C).

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de manera intercambiable. Las secuencias de aminoácidos se escriben desde el extremo amínico al extremo carboxílico, a menos que se indique de otro modo. Las secuencias de ácido nucleico monocatenario se escriben de 5' a 3', a menos que se indique de otro modo. La cadena superior de una secuencia de ácido nucleico bicatenario se escribe de 5' a 3' y la cadena inferior se escribe de 3' a 5', a menos que se indique de otro modo.

II. Composiciones de mezcla de reacción seca

La composición de mezcla de reacción seca de la presente invención comprende al menos una enzima relacionada con la amplificación de ácido nucleico, nucleótidos trifosfato y un sacárido, en la que la composición no se liofiliza. La mezcla de reacción seca de la presente invención tiene una estabilidad mejorada en comparación con una mezcla de reacción seca que carece de un sacárido o que se liofiliza, o tanto que carece de un sacárido como que se liofiliza. En un modo de realización de la mezcla de reacción seca, el sacárido se elige de sacarosa, trehalosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos. En otro modo de realización, la mezcla de reacción seca conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones que son, o equivalen a, 45 °C durante 3 meses. En otro modo de realización, la mezcla de reacción seca conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones que son, o equivalen a la temperatura ambiente durante 12 meses. Aún en otro modo de realización, la mezcla de reacción seca tiene al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un aptámero, un detergente, un tampón, una sal y un oligonucleótido. Aún en otro modo de realización, la mezcla de reacción seca comprende además acetato de manganeso (Mn(OAc)₂). Todavía en otro modo de realización, la mezcla de reacción seca tiene una enzima

relacionada con la amplificación que es una polimerasa termoestable que se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga maritima*, tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, polimerasas de *Thermotoga neapolitana*, ADN polimerasa Tth, así como polimerasas termoestables modificadas, o cualquier combinación de las mismas. Todavía en otro modo de realización, la composición de mezcla de reacción seca tiene un sacárido que está presente en una cantidad tal que si la composición se reconstituye en solución acuosa, la concentración del sacárido está entre aproximadamente 50 mM a aproximadamente 1000 mM. En otro modo de realización, el sacárido es sacarosa.

10 **III. Procedimiento de preparación de composiciones de mezcla de reacción seca**

La composición de mezcla de reacción seca de la presente invención se prepara secando la mezcla de reacción en forma acuosa en ausencia de liofilización, en la que la mezcla de reacción en forma acuosa comprende al menos una enzima relacionada con la amplificación de un ácido nucleico, nucleótidos trifosfato y un sacárido. En un modo de realización, el secado se realiza a temperatura ambiente. En otro modo de realización, el sacárido en la mezcla de reacción seca está en una concentración entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 1000 mM en la mezcla de reacción en forma acuosa. En otro modo de realización, el sacárido es sacarosa. Aún en otro modo de realización, la mezcla de reacción seca comprende además acetato de manganeso (Mn(OAc)₂). Todavía en otro modo de realización, la mezcla de reacción seca tiene una enzima relacionada con la amplificación que es una polimerasa termoestable que se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga maritima*, tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, ADN polimerasa Tth, así como polimerasas termoestables modificadas, o cualquier combinación de las mismas. Aún en otro modo de realización, la composición de mezcla de reacción seca preparada usando el procedimiento de la presente invención conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones que son, o equivalen a, 45 °C durante 3 meses. Aún en otro modo de realización, la composición de mezcla de reacción seca preparada usando el procedimiento de la presente invención conserva su actividad tras el almacenamiento en condiciones que son, o equivalen a, la temperatura ambiente durante 12 meses.

Si bien la invención precedente se ha descrito con algún detalle para propósitos de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la técnica, a partir de la lectura de la presente divulgación, que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle. Por ejemplo, todas las composiciones y procedimientos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar los modos de realización de la presente invención como es preferente en la actualidad para su práctica. Se entenderá que los ejemplos son ilustrativos y que la invención no se considera restringida, excepto como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

40 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Preparación de mezclas maestras de RT-PCR 5X de reacción secas

Las mezclas maestras de RT-PCR 5X de reacción secas se prepararon en primer lugar a partir de soluciones acuosas con la siguiente composición: tricina 250 mM (pH 8,3), KOAc 500 mM (pH 7,5), Tween 20 al 0,05 %, aptámero 1,326 μM (usado para PCR con inicio en caliente), dATP 1000 μM, dCTP 1000 μM, dGTP 1000 μM, dUTP 1500 μM, dTTP 150 μM, NaN₃ al 0,029 %, EDTA 0,5 mM, 0,2 U/μl de uracil-N-glucosilasa (UNG), 2,2 U/μl de ADN polimerasa Z05-D. Se añadió sacarosa 1,5 M en la mitad de las mezclas maestras de RT-PCR 5X [(+) sacarosa] y no se añadió en la otra mitad de las mezclas maestras de RT-PCR 5X [(-) sacarosa]. Un conjunto de mezclas maestras de RT-PCR 5X (+) sacarosa y (-) sacarosa se secó por liofilización y se incubó a 45 °C. El otro conjunto de mezclas maestras de RT-PCR 5X (+) sacarosa y (-) sacarosa se secó a 45 °C en tubos sin tapar y se incubó a 45 °C. La estabilidad de las mezclas maestras de RT-PCR 5X de reacción secas se determinó realizando la RT-PCR durante un período de 3 meses.

Ejemplo 2: Análisis de las mezclas maestras de reacción secas por RT-PCR

Las mezclas maestras de RT-PCR de reacción secas se reconstituyeron a una concentración 1X y se analizaron en la reacción de RT-PCR. La retrotranscripción y la amplificación de la diana de ARN se realizó de acuerdo con el protocolo del kit GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit (P/N 4308206, Applied Biosystems, Foster City, CA). En resumen, se añadieron 1x10⁴ copias de entrada del transcrito de ARN pAW109 de control a cada uno de los cebadores DM151 y DM152 0,2 μM, lo que produce una diana de 308 pares de bases del gen IL-1α. El producto amplificado se detectó usando la sonda TaqMan AL42F a una concentración de 0,1 μM. En algunas reacciones, se le añadió acetato de manganeso (Mn(OAc)₂) a una concentración final de 1,5 mM. Se realizó la RT-PCR en un instrumento LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) llevándose a cabo la fase de retrotranscripción a 55 °C durante 5 minutos, 60 °C durante 5 minutos y 65 °C durante 5 minutos, seguido de PCR a 92 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 40 segundos con 55 ciclos.

Ejemplo 3: Resultados de las reacciones de RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en las mezclas maestras de RT-PCR de reacción secas que se habían almacenado durante 1 día, 15 días, 29 días, 49 días y 90 días y los resultados de las reacciones de RT-PCR llevadas a cabo en cada uno de los días se representan en las curvas de crecimiento mostradas en las figuras 1-5. Después de 1 día, tanto las mezclas maestras (+) sacarosa liofilizadas como las secadas eran estables, mientras que la mezcla maestra (-) sacarosa liofilizada se degradó completamente y la mezcla maestra (-) sacarosa secada comenzó a mostrar degradación (fig. 1A, B). Después de 15 días, las mezclas maestras (+) sacarosa tanto liofilizadas como secadas eran estables y mostraron curvas de crecimiento similares (fig. 2A, B). Después de 29 días, las mezclas maestras (+) liofilizadas comenzaron a mostrar degradación observándose más degradación en las mezclas maestras que no contenían acetato manganoso (fig. 3A). Por el contrario, las mezclas maestras (+) secadas todavía eran estables con curvas de crecimiento que mostraban poca diferencia respecto a las curvas de crecimiento del día 15 (fig. 3B). Después de 49 días, las mezclas maestras (+) sacarosa liofilizadas se degradaron completamente (fig. 4A), mientras que las mezclas maestras (+) sacarosa secadas que contenían $Mn(OAc)_2$ todavía eran estables. Finalmente, después de 90 días, las mezclas maestras (+) sacarosa sin $Mn(OAc)_2$ se degradaron completamente y las mezclas maestras con $Mn(OAc)_2$ mostraron algo de degradación, pero todavía podían generar curvas de crecimiento (fig. 5). Estos resultados muestran claramente no solo los efectos estabilizadores de la sacarosa y el acetato de manganeso, sino también el rendimiento superior de una mezcla maestra no liofilizada en comparación con una mezcla maestra liofilizada.

Ejemplo 4: Preparación y análisis de mezclas maestras de RT-PCR 5X de reacción secas a temperatura ambiente

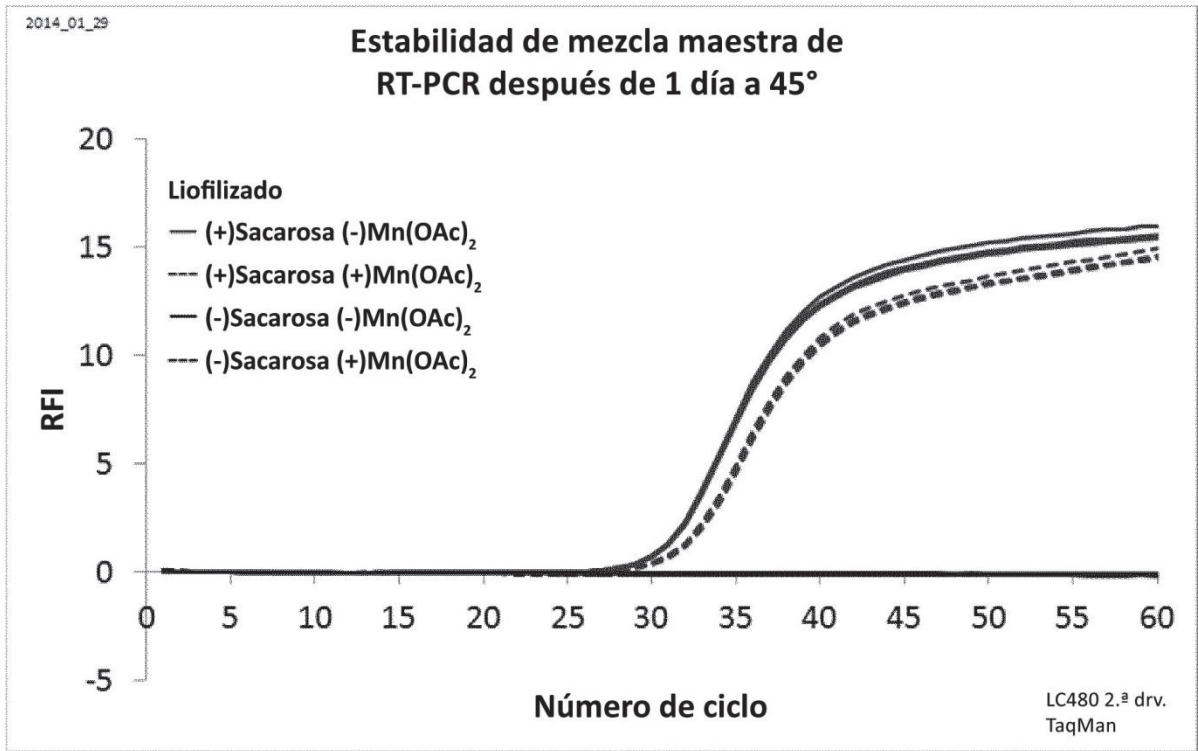
Se pipetearon las mezclas maestras de RT-PCR 5X de reacción secas con la composición como se describe en el ejemplo 1 (con o sin sacarosa en la mezcla maestra) en tubos de polipropileno de 2 ml. Se le añadió $Mn(OAc)_2$ a la mitad de los tubos y la otra mitad se dejó sin $Mn(OAc)_2$. Estas muestras se secaron a 45 °C y a presión atmosférica en los tubos de polipropileno de 2 ml sin tapar. Al final de 7 días a 45 °C, se taparon los tubos de 2 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se determinaron los puntos temporales de estabilidad durante un período de un año. Se analizaron estas mezclas maestras por reacciones de RT-PCR usando los reactivos de amplificación y las condiciones como se describe en el ejemplo 2.

Los resultados de las reacciones de RT-PCR se representan en las curvas de crecimiento mostradas en las figuras 6-11. La figura 6 muestra que después de 26 días a temperatura ambiente, las mezclas maestras de RT-PCR secadas con sacarosa eran estables y generaron crecimientos de las curvas, mientras que las mezclas maestras de RT-PCR secadas sin sacarosa se degradaron completamente y no generaron curvas de crecimiento. Las mezclas maestras de RT-PCR con sacarosa mostraron estabilidad en el almacenamiento a temperatura ambiente después de 71 días (figura 7), 222 días (figura 8), 299 días (figura 9), 353 días (figura 10) y 379 días (figura 11). La mezcla maestra de RT-PCR que se secó con $Mn(OAc)_2$ añadido mostró una estabilidad igual o mayor que la del mismo material secado sin el metal. Estos resultados de RT-PCR mostraron que se logró una amplificación eficaz con las formulaciones de mezcla maestra de RT-PCR con sacarosa después de más de 12 meses de estar en la oscuridad a temperatura ambiente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de mezcla de reacción seca para la amplificación de ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR) que comprende al menos una enzima relacionada con la amplificación de un ácido nucleico, nucleótidos trifosfato, acetato de manganeso ($Mn(OAc)_2$) y un sacárido, en la que la composición se prepara secando la composición de mezcla de reacción en forma acuosa en ausencia de liofilización.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el sacárido se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos.
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un aptámero, un detergente, un tampón, una sal y un oligonucleótido.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha al menos una enzima relacionada con la amplificación de un ácido nucleico es una polimerasa termoestable seleccionada del grupo que consiste en ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasa de *Thermotoga maritima*, polimerasa de *Thermotoga neapolitana*, polimerasa TMA-25, polimerasa TMA-30, ADN polimerasa Tth, así como polimerasas termoestables modificadas, o cualquier combinación de las mismas.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sacárido está presente en una cantidad tal que si la composición se reconstituye en solución acuosa, la concentración del sacárido está entre aproximadamente 50 mM a aproximadamente 1000 mM.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el sacárido es sacarosa.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el secado se realiza a temperatura ambiente.
8. Un procedimiento de preparación de una composición de mezcla de reacción seca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el procedimiento secar una mezcla de reacción en forma acuosa en ausencia de liofilización, en el que la mezcla de reacción en forma acuosa comprende al menos una enzima relacionada con la amplificación de un ácido nucleico, nucleótidos trifosfato, acetato de manganeso ($Mn(OAc)_2$) y un sacárido.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el sacárido se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, dextrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, ciclodextrinas, maltodextrinas y dextranos.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que se realiza a temperatura ambiente.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el sacárido está en una concentración entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 1000 mM en la mezcla de reacción en forma acuosa.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el sacárido es sacarosa.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que la al menos una enzima relacionada con la amplificación de un ácido nucleico es una polimerasa termoestable seleccionada del grupo que consiste en ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasa de *Thermotoga maritima*, polimerasa de *Thermotoga neapolitana*, polimerasa TMA-25, polimerasa TMA-30, ADN polimerasa Tth, así como polimerasas termoestables modificadas, o cualquier combinación de las mismas.

A



B

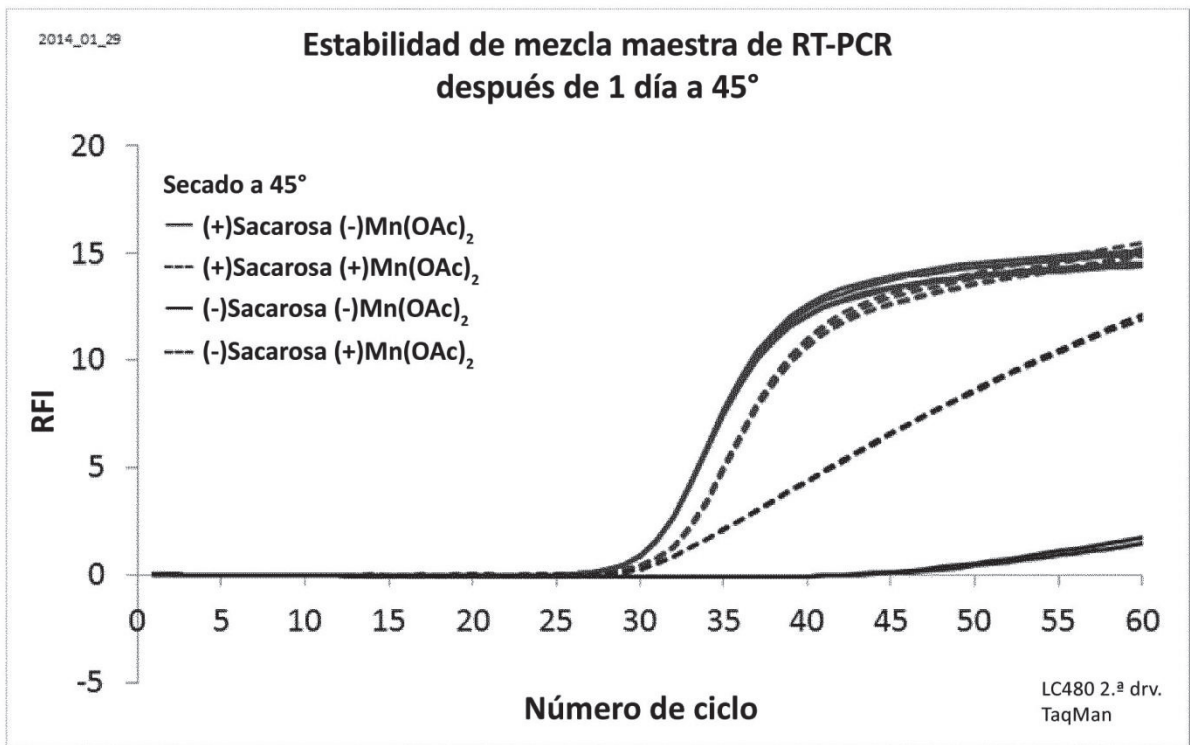
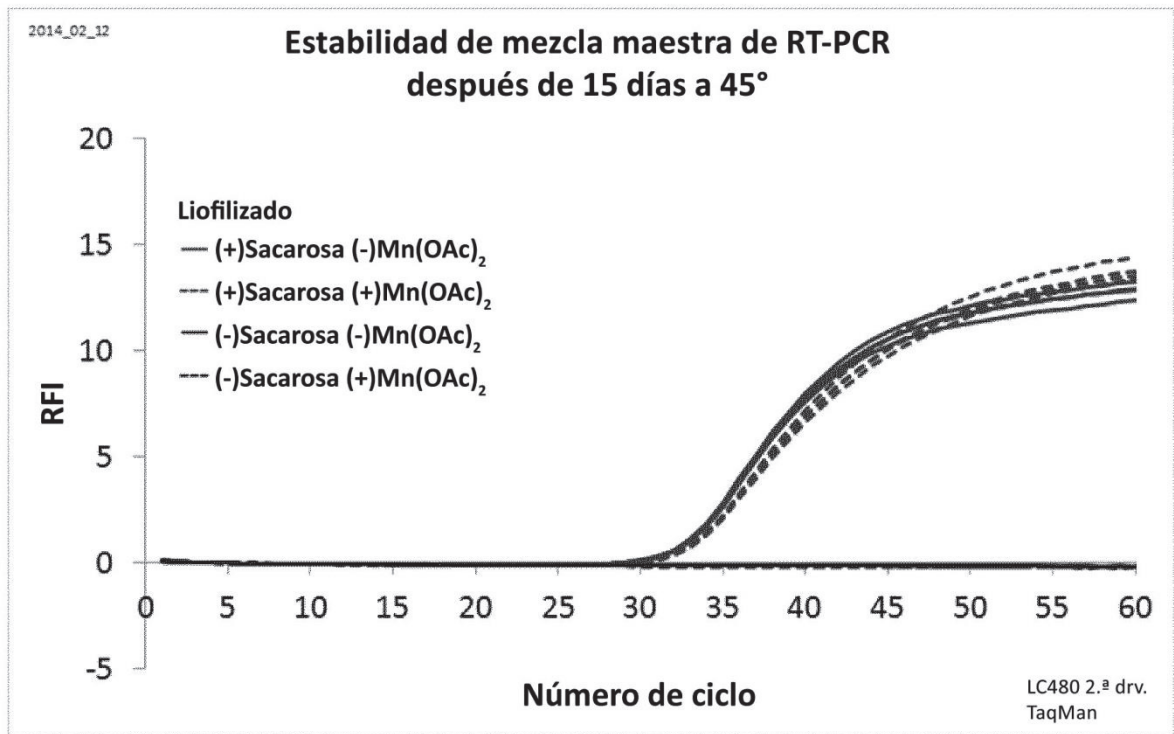


FIG. 1

A



B

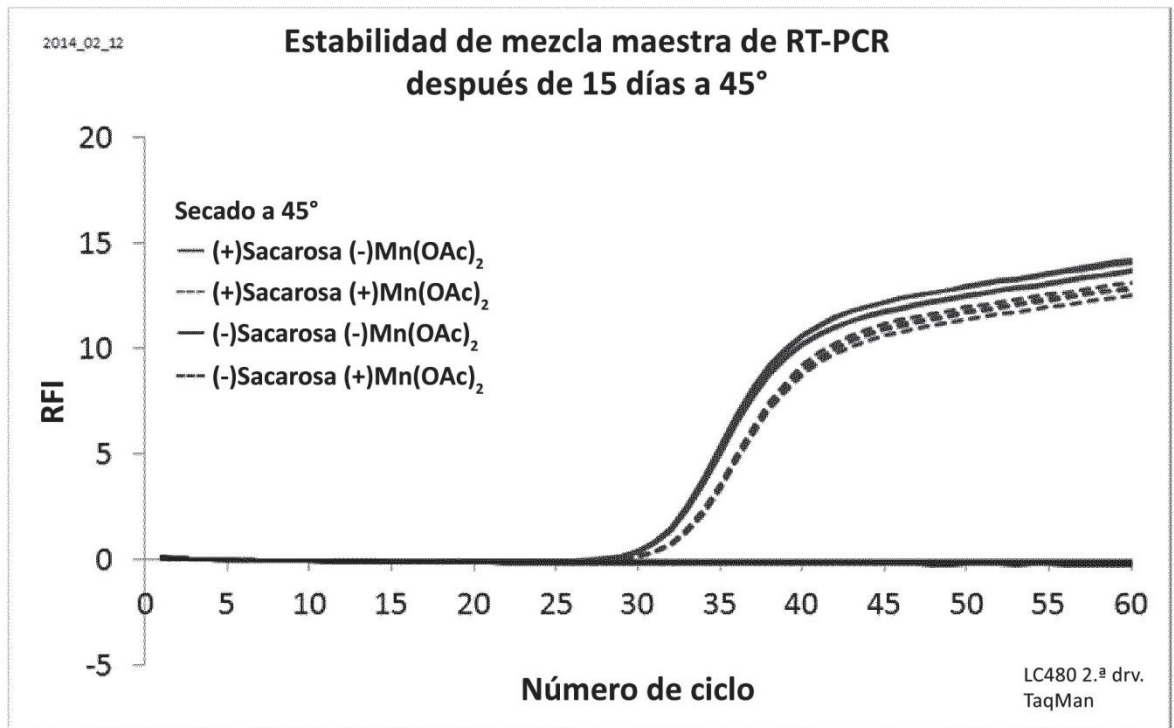
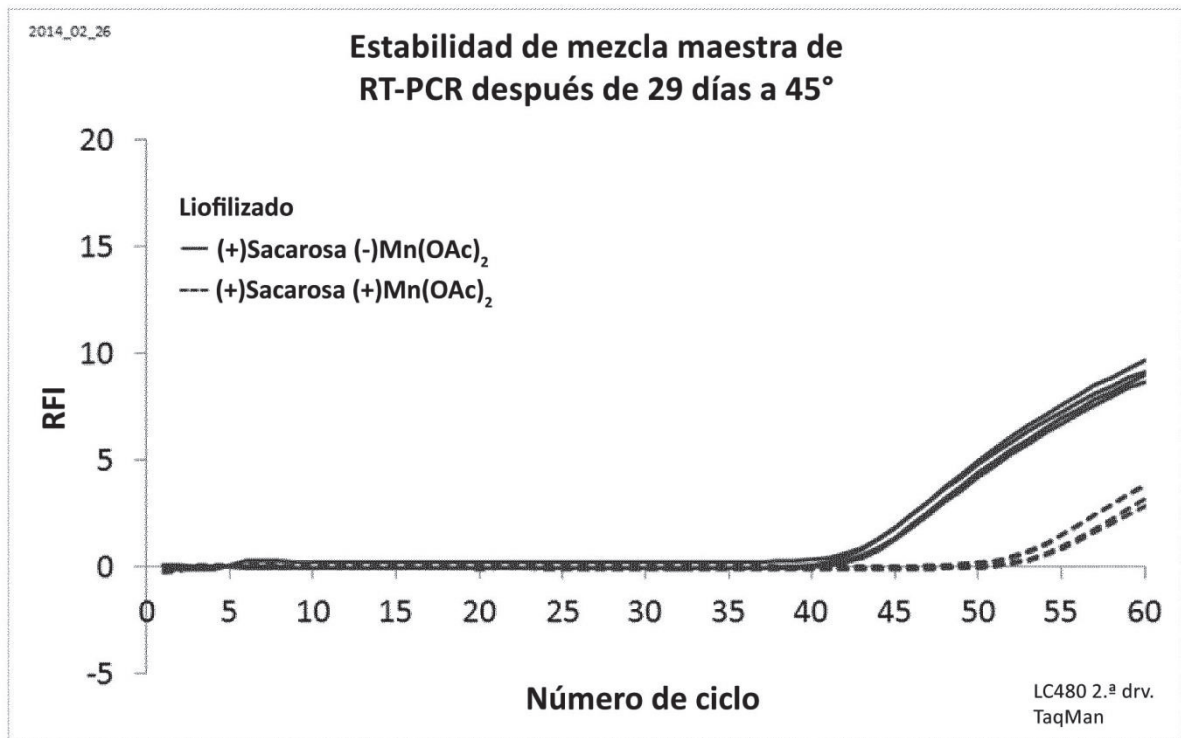


FIG. 2

A



B

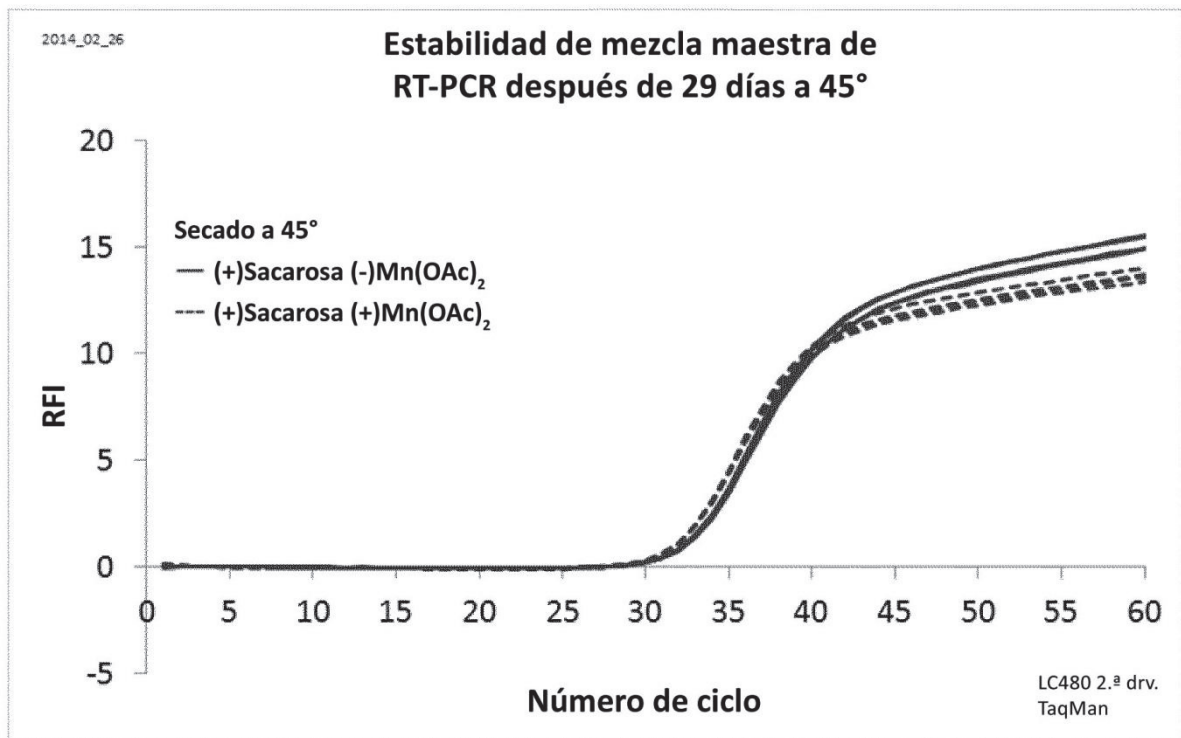
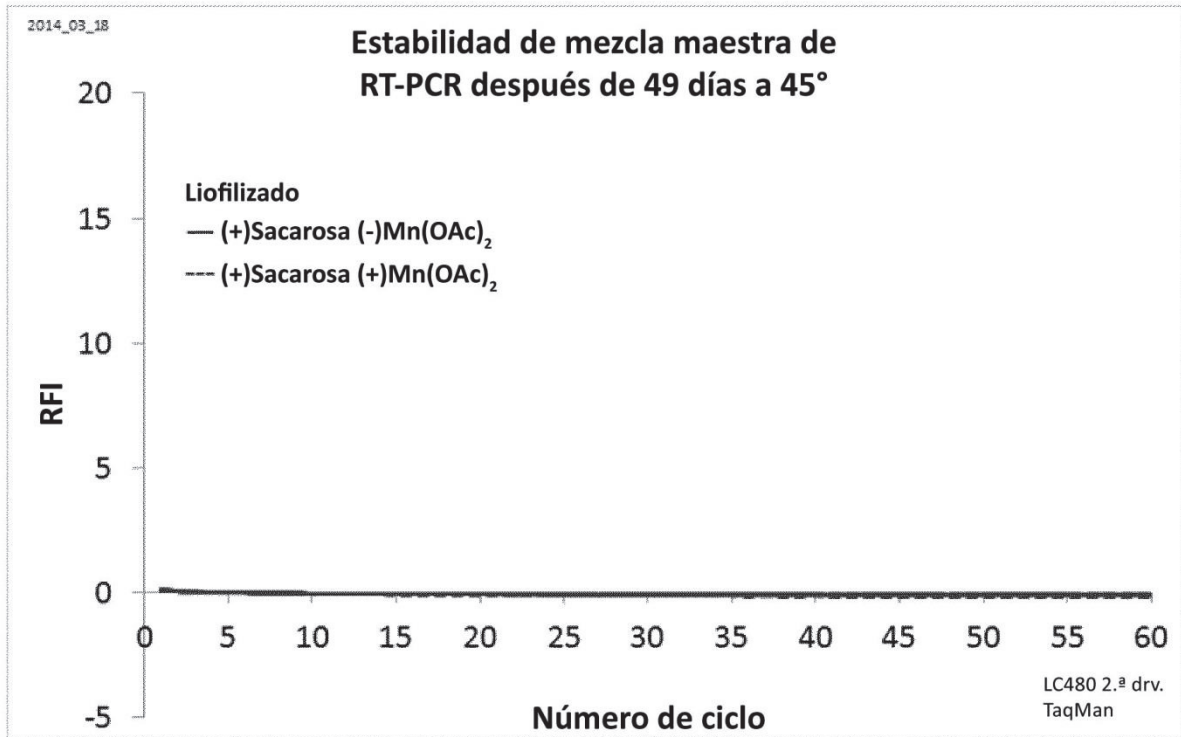


FIG. 3

A



B

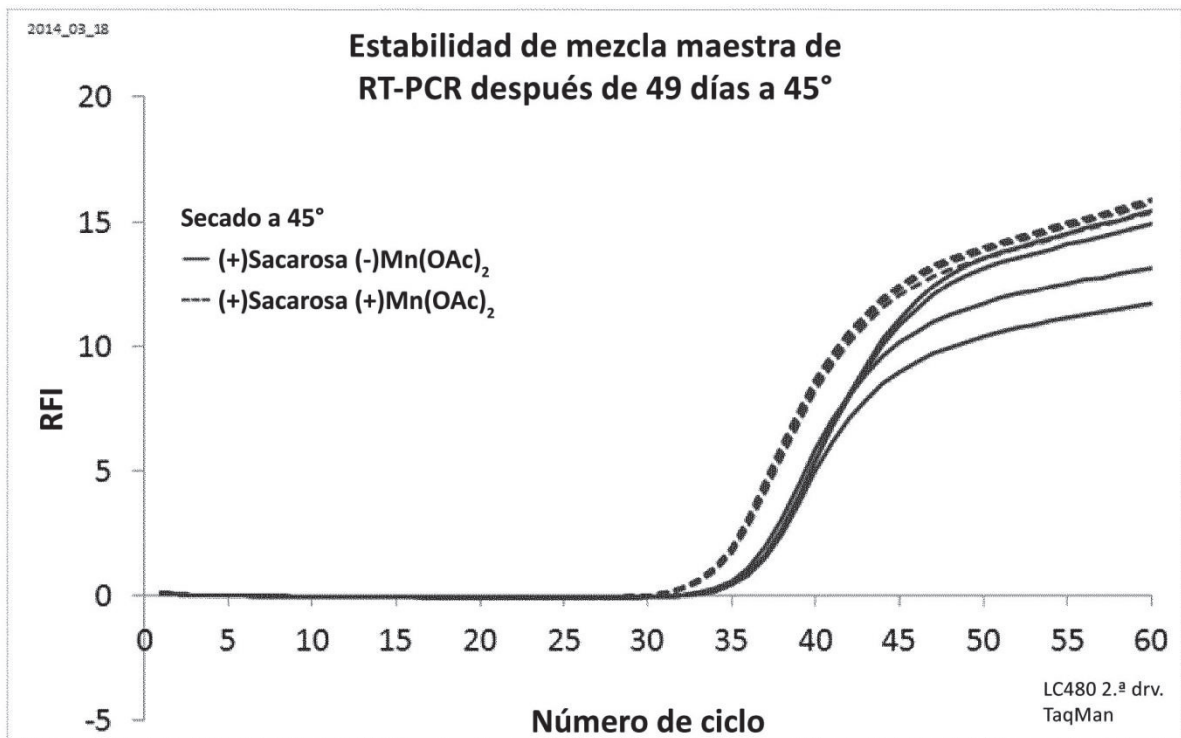


FIG. 4

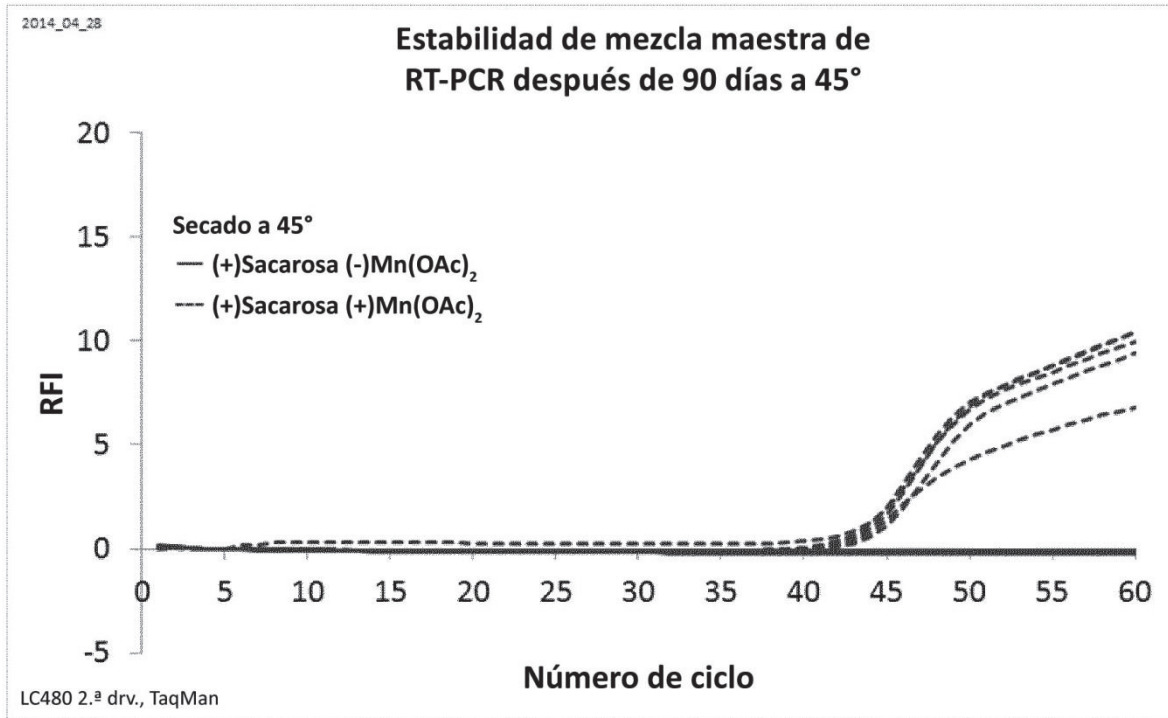


FIG. 5

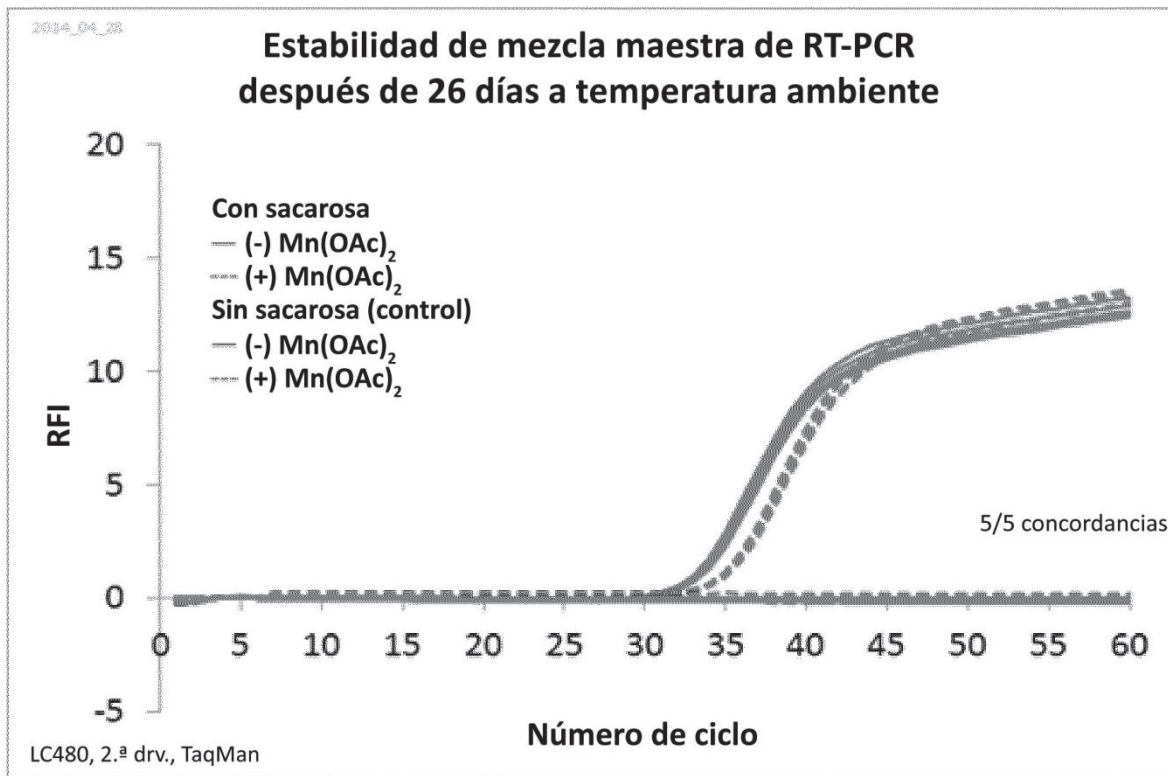


FIG. 6

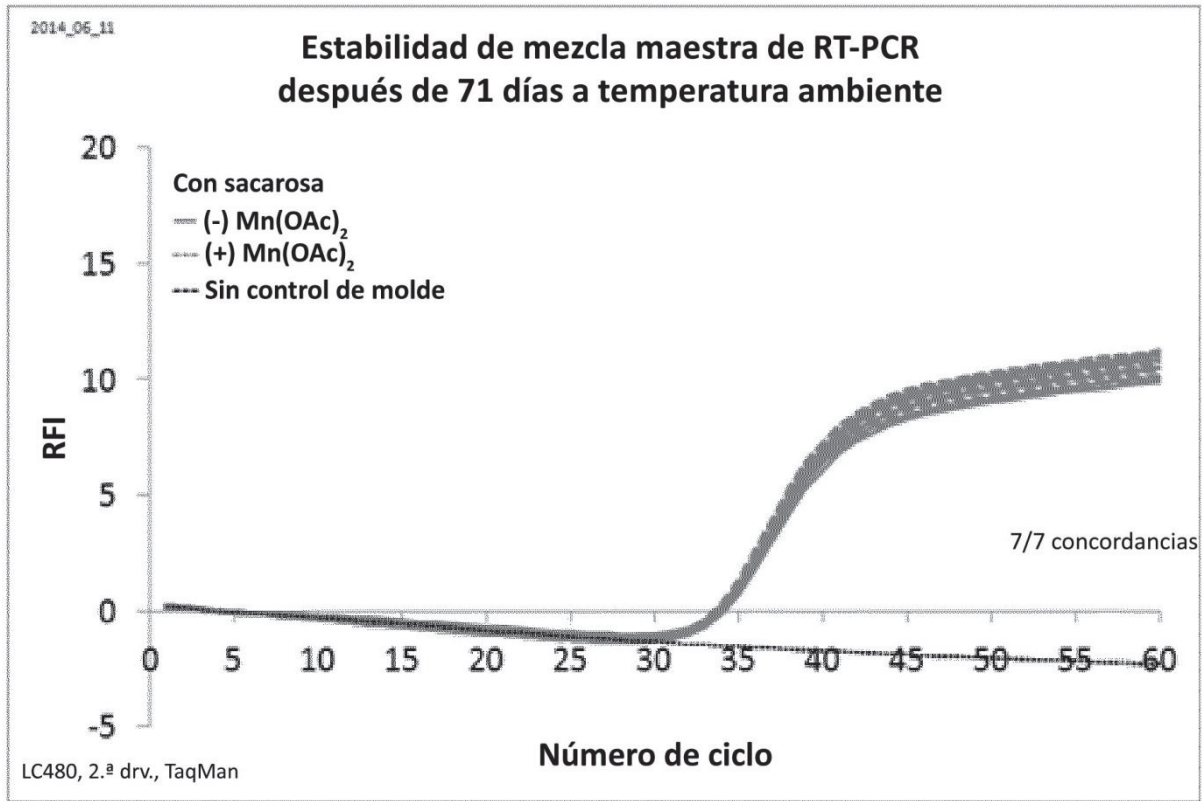


FIG. 7

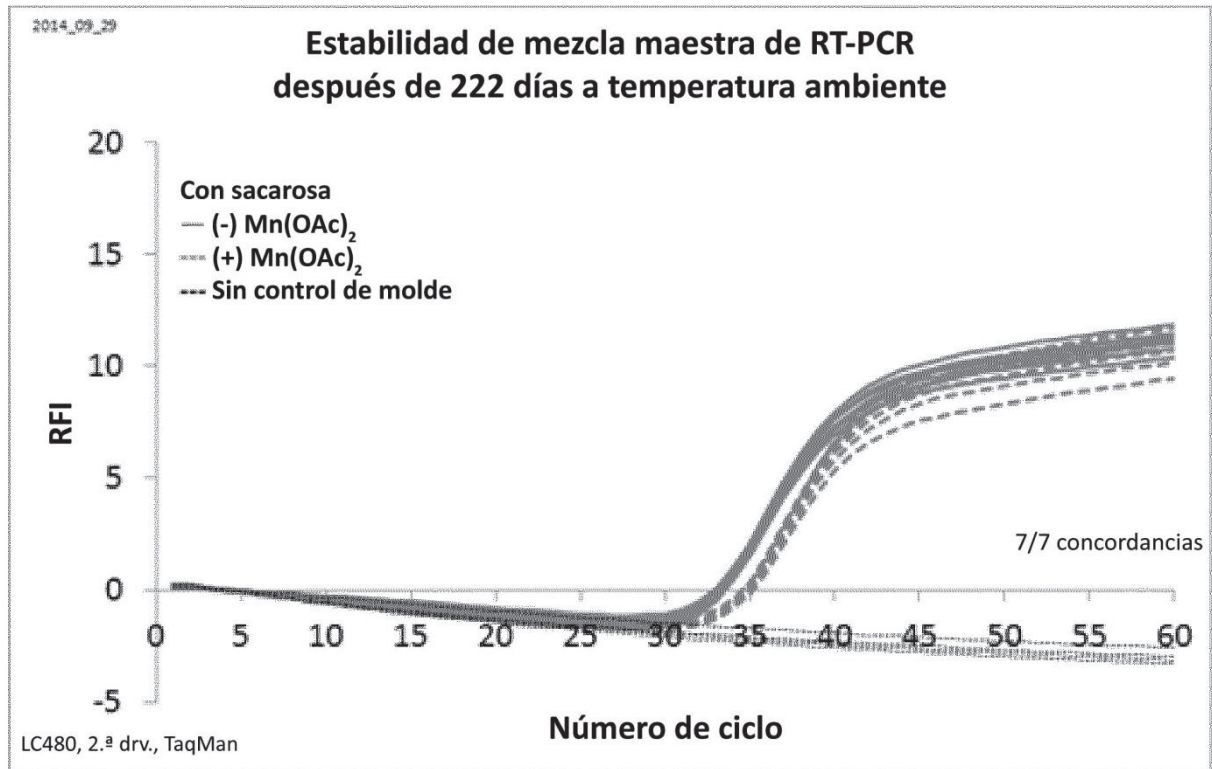


FIG. 8

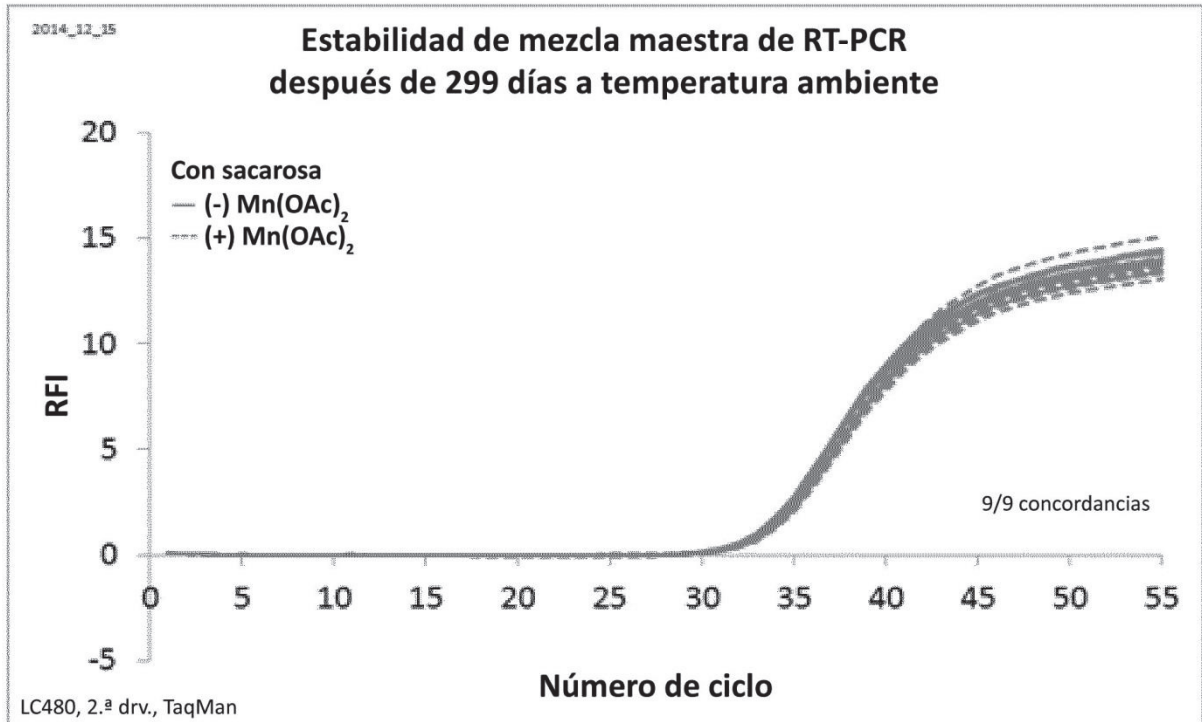


FIG. 9

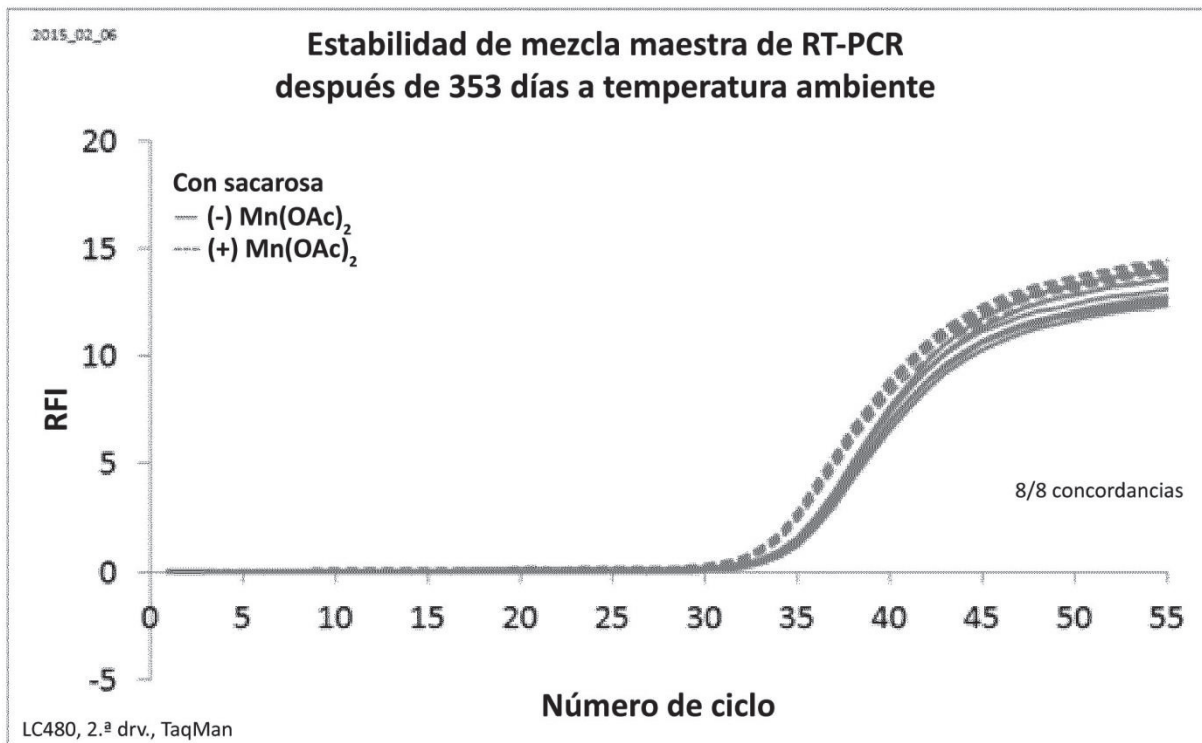


FIG. 10

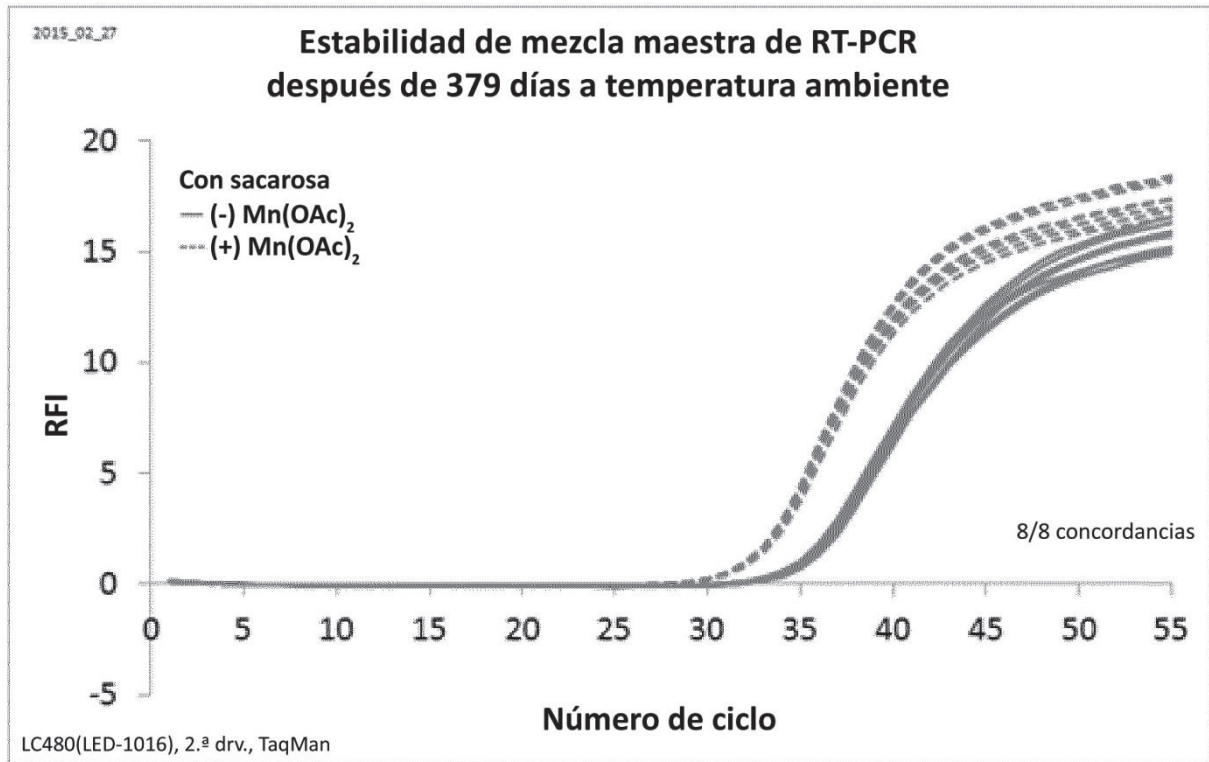


FIG. 11