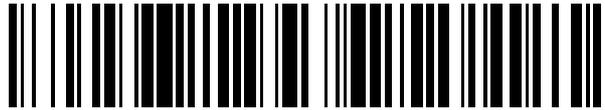


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 754**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09015595 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **30.06.2010 EP 2202302**

54 Título: **Composición seca de compuestos de reacción con una polimerasa estabilizada**

30 Prioridad:

**19.12.2008 EP 08022082**

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

**05.02.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HASLINGER, TOBIAS;  
METZLER, THOMAS;  
PECENY, ANNETTE y  
SOBEK, HARALD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 394 754 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición seca de compuestos de reacción con una polimerasa estabilizada

## 5 Antecedentes de la invención

Existen pocos compuestos de reacción que sean estables en forma soluble durante cualquier periodo de tiempo, y esto es especialmente cierto en relación al almacenamiento a temperatura ambiental. Por consiguiente, en el pasado se ha realizado una enorme cantidad de estudios para evaluar la posibilidad de potenciar las capacidades de almacenamiento de los compuestos de reacción biológicos en su forma seca.

En base a la gran cantidad de documentos del estado de la técnica en el campo de los compuestos de reacción secos, un experto en la materia estará seguro de que será esencial la utilización de, al menos, un aditivo estabilizante para asegurar la actividad biológica de, por ejemplo, una polimerasa tras la resolubilización.

La patente WO 2008/36544 describe la utilización de los denominados materiales de relleno para proporcionar composiciones secas, y tales materiales de relleno son, por ejemplo, carbohidratos tales como el FICOLL™, la sacarosa, la glucosa, la trehalosa, la melezitosa, el DEXTRAN™ o el manitol, proteínas tales como la BSA, la gelatina o el colágeno, y polímeros tales como el PEG o la polivinilpirrolidona (PVP). Los materiales de relleno formadores de cristales para la estabilización de reactivos biológicos se describen en las patentes US 5.098.893, US 5.200.399 y US 5.240.843. El material de relleno FICOLL™ es un copolímero descrito en la patente US 3.300.474.

Además, la mayoría de las veces, los métodos de secado de las mezclas de reacción líquidas son muy complejos en su naturaleza, por lo que los procedimientos de secado son caros y exigentes. En la literatura, la liofilización (US 5.593.824) o el secado al vacío (US 5.565.318) se utilizan en el secado de materiales biológicos en un matriz de polímeros de carbohidratos. La liofilización o el secado por congelación es una técnica bien establecida en relación al almacenamiento de proteínas, y se ha descrito 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).

En la patente US 7.407.747 se describe una selección de condiciones de secado para las diferentes mezclas de reacción para las aplicaciones de secuenciación que incluyen modificaciones genéticas de la Taq polimerasa. Los procedimientos de secado que se utilizan son la liofilización, el *speedvac* sin calentamiento adicional y el secado con aire a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción de esta patente se evaluaron en relación a varios crioprotectores, tales como la trehalosa, la sacarosa, la glucosa y el N-óxido de trimetilamina (TMANO). Además, se realizaron experimentos sin ningún crioprotector, pero no se describió ningún dato concerniente a la estabilidad de esas mezclas de reacción con el tiempo. Solamente se describió una buena estabilidad de hasta 8 semanas en las mezclas de reacción que incluían trehalosa y albúmina sérica bovina (BSA).

Además, la patente US 7.407.747 describe experimentos con la polimerasa en diferentes mezclas de secuenciación, y tales mezclas de secuenciación incluyen diferentes composiciones de la solución tampón, nucleótidos, nucleósidos con marcadores fluorescentes y cebadores. No se describe si la polimerasa, en mezclas para amplificaciones PCR a tiempo real, es decir, mezclas que incluyen la solución tampón, nucleótidos, cebadores y sondas de detección, puede secarse y almacenarse sin afectar la actividad PCR de la polimerasa.

La presente invención proporciona un método para el secado de una Taq DNA polimerasa en una mezcla de PCR a tiempo real, considerando que la composición seca obtenida puede almacenarse sin afectar la actividad PCR de la Taq DNA polimerasa.

## 50 Resumen de la invención

Proporcionar una composición seca de compuestos de reacción que incluyen una polimerasa es un problema complejo, especialmente si se necesita almacenar dicha composición seca durante cierta cantidad de tiempo y si debe ser posible la subsiguiente resolubilización de dicha composición seca sin afectar la actividad polimerasa para las aplicaciones en la PCR.

Durante el secado de una solución líquida que incluye diferentes componentes, la concentración de dichos componentes aumentará continuamente, con el fin de cambiar drásticamente las propiedades, mientras el comportamiento exacto de la solución líquida dependerá de los componentes y del procedimiento de secado. El experto en la técnica apreciará que, por ejemplo, las concentraciones salinas elevadas desestabilizarán las proteínas y que los tampones alterarán su comportamiento a concentraciones elevadas para que aparezcan valores de pH extremos.

Tal y como se menciona con anterioridad, los expertos en la técnica conocerán ciertos compuestos que pueden añadirse a las soluciones que incluyen una polimerasa para potenciar la estabilidad de la polimerasa tras el secado.

Además, los expertos en la técnica no esperarán obtener los mismo resultados de secado para una polimerasa determinada si varían los componentes de la mezcla de la polimerasa.

5 Por ejemplo, la patente US 7.407.747 describe la posibilidad de secar una Taq polimerasa en una mezcla que incluye una solución tampón, nucleótidos, BSA y trehalosa, y la polimerasa se mantuvo activa hasta 8 semanas.

10 A lo largo de la presente invención se desarrollaron métodos para proporcionar una composición seca de una polimerasa para su aplicación en una PCR, y dicha composición no sólo contiene tampones y nucleótidos, sino que también incluye componentes adicionales para formar una mezcla de detección completa, es decir, cebadores e incluso cebadores y sondas.

15 Se descubrió que se puede secar y almacenar una mezcla líquida que contiene una polimerasa, nucleótidos y una molécula estabilizante sin afectar a la actividad polimerasa, mientras que la actividad polimerasa se pierde si se añaden cebadores adicionales a la mezcla líquida. Más detalladamente, la actividad PCR se pierde debido a la adición de los cebadores si la resolubilización se da directamente tras el procedimiento de secado.

20 La presente invención resolvió este problema en relación al aumento de la estabilidad de la Taq polimerasa para que la mezcla de la reacción que debe secarse pueda contener cebadores adicionales.

Sorprendentemente, se descubrió que la adición de un aptámero a la solución líquida potenció la estabilidad de la Taq polimerasa, y dicha estabilización fue buena tanto para el secado como para el almacenamiento de la mezcla seca.

25 En consecuencia, un aspecto de la presente invención es un método para producir una composición seca almacenable de compuestos de reacción, y dicho método incluye los pasos de

a) proporcionar una mezcla líquida de compuestos de reacción, y dicha mezcla líquida incluye cebadores, nucleótidos, una Taq DNA polimerasa y una primera molécula estabilizante, y

30 b) secar dicha mezcla líquida mediante la reducción de la presión que envuelve a dicha mezcla líquida,

35 en el que dicha composición seca de compuestos de reacción es soluble en una solución acuosa, y se caracteriza porque dicha mezcla líquida de compuestos de reacción del paso a) también incluye un aptámero como segunda molécula estabilizante.

A lo largo de la presente invención, la oración "composición seca" se utiliza para enfatizar que la cantidad de disolvente, preferiblemente disolventes acuosos está reducida por debajo del 5% del peso.

40 A lo largo de la presente invención, la oración "composición seca almacenable" implica que la composición seca debe almacenarse durante al menos una semana, preferiblemente durante al menos 4 semanas, más preferiblemente durante más de 8 semanas, sin afectar a la actividad polimerasa.

45 Una "molécula estabilizante" en la presente invención es una molécula que mejora la resistencia de la polimerasa frente a la pérdida de su actividad PCR tras el secado de una solución acuosa que incluye dicha polimerasa.

Otro aspecto de la presente invención es una composición seca de compuestos de reacción que incluye cebadores, nucleótidos, una Taq DNA polimerasa, una primera molécula estabilizante y un aptámero como segunda molécula estabilizante, y dicha composición seca proporciona actividad PCR tras la resolubilización posterior al almacenamiento a temperatura ambiente durante, al menos, una semana.

50 Otro aspecto adicional de la presente invención es un método para la realización de la amplificación PCR, y dicho método incluye los pasos de

55 a) resolubilizar una composición seca de compuestos de reacción de acuerdo con la presente invención mediante la adición de una solución acuosa, y

b) realizar un protocolo de termociclado con la solución acuosa que incluye los compuestos de reacción resolubilizados.

60 Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención es un método para proporcionar una composición seca de compuestos de reacción almacenable, y dicho método incluye los pasos de

65 a) proporcionar una mezcla líquida de compuestos de reacción, y dicha mezcla líquida incluye cebadores, nucleótidos, una Taq DNA polimerasa y una primera molécula estabilizante, y

b) secar dicha mezcla líquida mediante la reducción de la presión que envuelve a dicha mezcla líquida,

5 en el que dicha composición seca de compuestos de reacción es soluble en una solución acuosa, y se caracteriza porque dicha mezcla líquida de compuestos de reacción del paso a) también incluye un aptámero como segunda molécula estabilizante.

10 Es posible escoger varios grupos de moléculas como primera molécula estabilizante para la forma de la Taq DNA polimerasa.

De acuerdo con la presente invención, un método preferible es un método en el que dicha molécula estabilizante es una proteína, preferiblemente dicha molécula estabilizante es caseína o BSA.

15 Otro método preferible, de acuerdo con la presente invención es un método en el que dicha primera molécula estabilizante es un carbohidrato, preferiblemente dicha molécula estabilizante es trehalosa o manitol.

20 Aún otro método preferible, de acuerdo con la presente invención es un método en el que dicha primera molécula estabilizante es un polímero sintético, preferiblemente dicha molécula estabilizante es PEG o polivinilpirrolidona (PVP).

25 Un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que otro grupo de moléculas puede proporcionar un efecto estabilizante a la polimerasa, y éste es el grupo de los aptámeros. Se sabe que los aptámeros se unen a una polimerasa en solución, mientras que el característico "inicio caliente" se añade a la polimerasa (por ejemplo, las patentes US 5.475.096 y US 5.270.163). En resumen, los oligonucleótidos cortos (aptámeros) se unen a la polimerasa de manera que la actividad polimerasa se bloquea. Si la temperatura aumenta por encima de cierto límite durante el protocolo de termociclado de la amplificación PCR, el aptámero liberará la polimerasa y la actividad polimerasa se iniciará. Consecuentemente, en la PCR "hot start", la utilización de una polimerasa que se une a aptámeros dificulta la actividad indeseable de la polimerasa a temperaturas bajas hasta que la temperatura de la reacción es suficiente para ejercer una alta astringencia de hibridación del cebador.

30 Tal y como se menciona con anterioridad, la Taq DNA polimerasa en una mezcla que incluye un tampón, nucleótidos y una primera molécula estabilizante, puede secarse, almacenarse y resolubilizarse sin afectar la actividad polimerasa, pero esta actividad polimerasa se pierde tras la adición de cebadores a la mezcla directamente después del secado. Sólo tras la adición de un aptámero a la solución se puede mantener de nuevo la actividad polimerasa.

35 Sin estar limitado por la teoría, se espera que el grupo hidroxilo del extremo 3' de los cebadores influya, al menos, a esos aminoácidos de la polimerasa que son responsables de la actividad PCR. Esta teoría se probó mediante experimentos adicionales (de los que no se muestran los datos) en los que los cebadores se remplazaron mediante cebadores fosforilados y la actividad PCR se analizó tras el secado. Resultó que los cebadores fosforilados no influyen a la polimerasa y la mezcla líquida de los compuestos de reacción pudo secarse sin la necesidad de un aptámero adicional.

40 En el caso de la Taq DNA polimerasa, se pudo secar, almacenar y resolubilizar una mezcla que incluye un tampón, nucleótidos y, por ejemplo, caseína como molécula estabilizante, sin afectar a la estabilidad de la polimerasa (ver ejemplos). Tras la adición de los cebadores a la mezcla, la actividad PCR se perdió directamente después del secado (no se muestran los datos, los ejemplos muestran sólo los resultados tras el almacenamiento). Consecuentemente, los requerimientos para estabilizar la Taq polimerasa para el secado aumentan a causa de la adición de los cebadores a la mezcla líquida.

45 Otros experimentos mostraron que el aptámero sin la primera molécula estabilizante no pudo proporcionar suficiente estabilidad para mantener la actividad polimerasa (no se muestran los datos). Consecuentemente, la combinación de una primera molécula estabilizante con un aptámero permite el secado y almacenamiento de la Taq DNA polimerasa en una mezcla que incluye un tampón, nucleótidos y cebadores.

50 En un método preferible, de acuerdo con la presente invención, dicho aptámero es un aptámero que tiene la secuencia Id. de Sec. N° 9 o Id. de Sec. N° 10.

55 Sin estar limitado por la teoría, se espera que los aptámeros, debido a su habilidad para unirse a la Taq DNA polimerasa, potencian la resistencia de la polimerasa en relación a concentraciones salinas elevadas, valores extremos de pH y los grupos hidroxilo de los cebadores.

60 En otro método preferible, de acuerdo con la presente invención, dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción es una solución acuosa tamponada que incluye una sal de magnesio.

65 En un método más preferible, y de acuerdo con la presente invención, dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción se tampona con Tris o Hepes.

En otro método más preferible, de acuerdo con la presente invención, dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción también incluye cloruro potásico.

5 Con respecto al procedimiento de secado del paso b) del método de acuerdo con la presente invención, varios modos de trabajo son adecuados. En general, los expertos en la técnica apreciarán que el tiempo necesario para secar la mezcla líquida se correlaciona con la presión que envuelve a dicha mezcla líquida. En la presente invención, se aprobó que la presión no debía descenderse a valores de presión muy bajos, al menos, no en un sólo paso. Si la diferencia de presión es demasiado grande, la mezcla líquida perderá el contacto con el recipiente que contiene la mezcla, de modo que no se podrá realizar una resolubilización completa.

10 En un método preferible de acuerdo con la presente invención, la presión que envuelve a dicha mezcla líquida se reduce en el paso b) por debajo de los 600 mbar, preferiblemente por debajo de los 400 mbar; lo más preferible a 200 mbar.

15 En un método más preferible de acuerdo con la presente invención, dicha presión reducida se mantiene durante al menos 6 horas, preferiblemente durante, al menos, 10 horas; lo más preferible, durante 16 horas.

20 En relación a la idoneidad de la práctica de laboratorio, se prefiere almacenar la mezcla líquida a 200 mbar durante la noche.

25 Para reducir el tiempo requerido de producción de la composición seca se puede llevar a cabo el paso de secado b) del método de acuerdo con la presente invención en dos pasos, es decir, un primer paso con una presión relativamente alta seguido de un segundo paso con una presión menor.

En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, la presión se reduce posteriormente en la segunda parte del paso b), y dicha presión reducida es menor a 200 mbar, preferiblemente menor a 100 mbar; lo más preferible, de 50 mbar.

30 En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, dicha presión reducida posteriormente se mantiene durante al menos 1 hora, preferiblemente durante, al menos, 3 horas; lo más preferible, durante 4 horas.

35 Un procedimiento de secado en 2 pasos preferible incluye un primer paso a 200 mbar durante 10 horas seguido de un segundo paso a 50 mbar durante 4 horas.

En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, dicho secado en el paso b) se lleva a cabo a temperatura ambiente.

40 En la presente invención, resultó que el ajuste de la temperatura a ciertos valores altos o bajos no influenciaba la actividad PCR tras la resolubilización. Consecuentemente, se prefiere llevar a cabo el secado a temperatura ambiente.

45 Para proporcionar una composición seca completa para la PCR a tiempo real es necesario añadir también sondas de detección a la mezcla líquida de los compuestos de reacción. En la presente invención se aprobó que la adición de sondas de detección a la mezcla líquida de los compuestos de reacción no influencia a la actividad PCR tras la resolubilización. Debe notarse que la Taq DNA polimerasa mantiene su actividad PCR tras la resolubilización, incluso sin el aptámero, si la mezcla líquida incluye sondas de detección pero no cebadores (los datos no se muestran).

50 En un método preferible de acuerdo con la presente invención, dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción también incluye sondas de detección.

55 En un método más preferible, de acuerdo con la presente invención, dichas sondas de detección son sondas marcadas con fluorescencia, preferiblemente sondas de hibridación o sondas de hidrólisis.

Dado que, generalmente, la PCR a tiempo real se realiza en base a la detección de fluorescencia, se prefiere utilizar sondas marcadas con fluorescencia. Los tres formatos de sonda principales se introducen brevemente a continuación:

60 a) Formato de sonda de hidrólisis (formato TaqMan®):

Una sonda de hibridación monocatenaria se marca con dos componentes. Cuando el primer componente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía adsorbida se transfiere al segundo componente, llamado bloqueador, de acuerdo con el principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Durante el paso de hibridación de la reacción PCR, la sonda de hibridación se une al DNA diana y, durante la subsiguiente fase de elongación, se degrada mediante la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa. Como resultado, el

componente fluorescente excitado y el bloqueador se separan espacialmente el uno del otro y, por consiguiente, se puede medir una emisión de fluorescencia del primer componente (patentes US 5.210.015, US 5.538.848, US 5.487.972, US 5.804.375).

5 b) Balizas moleculares:

10 Estas sondas de hibridación también están marcadas con un primer componente y con un bloqueador, y las marcas se localizan preferiblemente en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran cercanos, espacialmente en solución. Tras la hibridación con el ácido nucleico diana, ambos componentes se separan el uno del otro, de modo que se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, (patente US 5.118.801).

15 c) Sondas de hibridación FRET

Este formato se caracteriza por dos sondas de hibridación monocatenarias que se utilizan simultáneamente y que son complementarias a sitios adyacentes de la misma hebra del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas están macadas con diferentes componentes fluorescentes. Cuando se excita con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía adsorbida al segundo componente, de acuerdo con el principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, de modo que se puede medir una emisión de fluorescencia del segundo componente cuando ambas sondas de hibridación se unen a las posiciones adyacentes de la molécula diana a detectar. De manera alternativa a la monitorización del aumento de la fluorescencia en el componente aceptor FRET, también se puede monitorizar el descenso de la fluorescencia en el componente donador FRET como medición cuantitativa del acontecimiento de la hibridación (patentes WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714).

En la mayoría de las aplicaciones de PCR es deseable incorporar un mecanismo de control para evaluar si la amplificación con PCR ha funcionado. En general, esto se lleva a cabo con un molde de DNA añadido a la muestra (control interno) o con un molde de DNA en un recipiente separado (control externo). A lo largo de la presente invención se resumen ambas alternativas bajo la expresión de control positivo.

En un método preferible de acuerdo con la presente invención, dicha mezcla líquida de compuestos de reacción también incluye una plantilla de DNA.

35 En un método más preferible, de acuerdo con la presente invención, dicho molde de DNA se utiliza como control positivo.

Tal y como se menciona con anterioridad, los experimentos de la presente invención sugieren que los grupos hidroxilo en el extremo 3' de los ácidos nucleicos influyen a la Taq DNA polimerasa. Consecuentemente, el molde de DNA añadido a la mezcla líquida también puede tener un impacto negativo en la actividad PCR tras la resolubilización. Pero, probablemente en base a la concentración mucho menor del molde de DNA en comparación con las concentraciones de cebador normales, se identificó que la adición del molde de DNA a la mezcla líquida no influye a la actividad PCR tras la resolubilización.

45 En un método más preferible, de acuerdo con la presente invención, dicho molde de DNA es un plásmido circular.

Tales plásmidos circulares no contienen ningún grupo hidroxilo 3' y, consecuentemente, se puede reducir aún más el impacto negativo de los grupos hidroxilo.

50 Otro aspecto de la presente invención es una composición seca de los compuestos de reacción que incluye cebadores, nucleótidos, una Taq DNA polimerasa, una primera molécula estabilizante y un aptámero como segunda molécula estabilizante, y dicha composición seca proporciona actividad PCR tras la resolubilización posterior al almacenamiento a temperatura ambiente durante, al menos, una semana.

55 En una composición seca mas preferible de los compuestos de reacción, de acuerdo con la presente invención, dicha actividad PCR se proporciona tras la resolubilización posterior al almacenamiento a temperatura ambiente durante, al menos, cuatro semanas, más preferiblemente durante al menos ocho semanas.

60 Se llevaron a cabo varios experimentos para evaluar la estabilidad a largo plazo y, por ejemplo, una composición seca de los compuestos de reacción, que incluye una Taq DNA polimerasa con el aptámero NTQ12-46A (Id. de Sec. N° 9), así como cebadores y sondas, proporcionó actividad PCR tras la resolubilización posterior al almacenamiento a temperatura ambiente durante ocho semanas (no se muestran los datos).

65 Una composición seca de los compuestos de reacción preferible, de acuerdo con la presente invención, es una composición seca que también incluye sondas de detección.

En una composición seca de los compuestos de reacción más preferible, de acuerdo con la presente invención, dichas sondas de detección son sondas marcadas con fluorescencia, preferiblemente sondas de hibridación o sondas de hibridación.

5 Otra composición seca de los compuestos de reacción preferible, de acuerdo con la presente invención, es una composición seca en la que dicha primera molécula estabilizante es una proteína, preferiblemente dicha molécula estabilizante es caseína o BSA.

10 Aún otra composición seca de los compuestos de reacción preferible, de acuerdo con la presente invención, es una composición seca en la que dicha primera molécula estabilizante es un carbohidrato, preferiblemente dicha molécula estabilizante es trehalosa o manitol.

15 Aún otra composición seca de los compuestos de reacción preferible, de acuerdo con la presente invención, es una composición seca en la que dicha primera molécula estabilizante es un polímero sintético, preferiblemente dicha molécula estabilizante es PEG o polivinilpirrolidona (PVP).

En otra composición seca de los compuestos de reacción preferible, de acuerdo con la presente invención, dicho aptámero es un aptámero que tiene la secuencia Id. de Sec. N° 9 o Id. de Sec. N° 10.

20 En aún otra composición seca de los compuestos de reacción preferible, de acuerdo con la presente invención, dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción también incluye moldes de DNA.

25 En una composición seca de los compuestos de reacción más preferible, de acuerdo con la presente invención, dicho molde de DNA es un control positivo.

En otra composición seca de los compuestos de reacción más preferible, de acuerdo con la presente invención, dicho molde de DNA es un plásmido circular.

30 Aún otro aspecto de la presente invención es un método de realización de la amplificación PCR, y dicho método incluye los pasos de

a) resolubilizar una composición seca de los compuestos de reacción de acuerdo con la presente invención mediante la adición de una solución acuosa, y

35 b) realizar un protocolo de termociclado con la solución acuosa que incluye los compuestos de reacción resolubilizados.

40 La composición seca de los compuestos de reacción de la presente invención puede resolubilizarse sin medios auxiliares especiales mediante la simple adición de una solución acuosa. Pero puede ser preferible la aplicación de estimulación mecánica para ayudar a la solubilización y reducir el tiempo de solubilización.

En un método preferible para la realización de una amplificación PCR, de acuerdo con la presente invención, dicha resolubilización del paso b) se facilita mediante la agitación de la mezcla.

45 En otro método preferible de realización de la amplificación PCR, de acuerdo con la presente invención, dicha resolubilización del paso b) se facilita mediante la centrifugación de la mezcla.

50 Dado que sólo se debe añadir agua a dicha composición seca de los compuestos de reacción, en el ámbito de la presente invención se incluyen dos alternativas de realización de una amplificación PCR. En la primera alternativa, la composición seca se resolubiliza con una solución acuosa y la muestra que contiene el ácido nucleico diana a analizar se añade posteriormente. En la segunda, la alternativa preferible, la composición seca se resolubiliza directamente con una solución acuosa que incluye el ácido nucleico que se ha de amplificar.

55 En un método preferible de acuerdo con la presente invención, dicha solución acuosa incluye un ácido nucleico diana que se ha de amplificar mediante el protocolo de termociclado.

Los siguientes ejemplos, listados de secuencias y figuras se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de la cual se describe en las reivindicaciones anejadas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos descritos sin alejarse del espíritu de la invención.

60 Descripción de las figuras

Figura 1 Amplificación del plásmido Eamst con Taq polimerasa y caseína

65 Figura 2 Amplificación del plásmido Wsebi con Taq polimerasa y caseína

Figura 3 Amplificación del plásmido Eamst con la Taq polimerasa y BSA

Figura 4 Amplificación del plásmido Wsebi con la Taq polimerasa y BSA

5 Figura 5 Amplificación del plásmido Eamst con la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y caseína

Figura 6 Amplificación del plásmido Wsebi con la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y caseína

10 Figura 7 Amplificación del plásmido Eamst con la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y BSA

Figura 8 Amplificación del plásmido Wsebi con la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y BSA

Figura 9 Amplificación del plásmido Wsebi con la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y caseína

15 Figura 10 Amplificación del plásmido Wsebi con la Taq polimerasa, el aptámero 21-41-P y caseína

Figura 11 Amplificación del plásmido Eamst con la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y caseína

20 Figura 12 Amplificación del plásmido Eamst con la Taq polimerasa, el aptámero 21-41-P y caseína

Figura 13 Amplificación del plásmido Eamst con un plásmido de DNA seco, la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y caseína

25 Figura 14 Amplificación del plásmido Wsebi con un plásmido de DNA seco, la Taq polimerasa, el aptámero NTQ12-46A y caseína

Ejemplo 1

30 Estabilidad de la Taq DNA polimerasa

Este ejemplo resume los resultados de mezclas líquidas de la Taq DNA polimerasa sin aptámeros. La actividad PCR de la polimerasa tras el almacenamiento y la resolubilización se analizó con y sin la mezcla de detección (con o sin cebadores y sondas) utilizando dos parámetros diferentes. Las mezclas líquidas se secaron durante 16 h a 200 mbar y se almacenaron durante 1 semana a 37 °C con anterioridad a la resolubilización. Como control también se utilizó una mezcla líquida, sin secado (denominada referencia líquida en adelante).

40 Todas las mezclas se proporcionaron en los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos (Roche Diagnostic GmbH) y, tras la resolubilización, se llevó a cabo una fase de PCR en el LightCycler®480 (Roche Diagnostic GmbH) utilizando el siguiente protocolo:

- 5 minutos a 95 °C
- 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 1 segundo a 72 °C (45x)
- 10 segundos a 40 °C

45 Mezcla madre con caseína:

60 mM de Tris/HCl pH 8,3, 60 mM de KCl, 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dATP, 0,4 mM de dCTP, 0,4 mM de dGTP, 1,2 mM de dUTP, 1 mg/ml de caseína y 0,3 U/μl de Taq DNA polimerasa (sin glicerol).

50 Mezcla madre con BSA:

60 mM de Tris/HCl pH 8,3, 60 mM de KCl, 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dATP, 0,4 mM de dCTP, 0,4 mM de dGTP, 1,2 mM de dUTP, 1 mg/ml de BSA y 0,3 U/μl de Taq DNA polimerasa (sin glicerol).

55 Mezcla de detección qPCR Eamst:

10 mM de Tris pH 8,3, Brij al 0,05 %, 7,1 M del cebador directo (Id. de Sec. N° 1), 7,1 μM del cebador indirecto (Id. de Sec. N° 2) y 0,6 μM de la sonda Fam-Tamra (Id. de Sec. N° 3).

60 Mezcla de detección qPCR Wsebi:

10 mM de Tris pH 8,3, Brij al 0,05 %, 7,1 M del cebador directo (Id. de Sec. N° 4), 7,1 μM del cebador indirecto (Id. de Sec. N° 5) y 0,6 μM de la sonda Fam-Tamra (Id. de Sec. N° 6)

65 La siguientes mezclas se prepararon y se secaron en una placa de microtitulación, y cada mezcla se colocó en dicha placa de microtitulación tres veces:

## ES 2 394 754 T3

	Taq DNA polimerasa			
	Eamst		Wsebi	
	Caseína	BSA	Caseína	BSA
Sin la mezcla de detección	5 µl de la mezcla madre		5 µl de la mezcla madre	
Con la mezcla de detección	5 µl de la mezcla madre + 1,4 µl de la mezcla de detección Eamst		5 µl de la mezcla madre + 1,4 µl de la mezcla de detección Wsebi	

5 Para la subsiguiente amplificación PCR, las composiciones secas se resolubilizaron mediante la adición de soluciones de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteado. El líquido de referencia se pipeteó antes de la realización de la PCR en pocillos vacíos de la placa de microtitulación. Los plásmidos se pipetearon con una concentración de 4x10<sup>4</sup> copias/µl.

	Eamst			Wsebi		
	Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia	Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia
Agua	6,1 µl	7,5 µl	1,1 µl	6,1 µl	7,5 µl	1,1 µl
Mezcla madre	-	-	5 µl	-	-	5 µl
Mezcla de detección Eamst	1,4 µl	-	1,4 µl	-	-	-
Mezcla de detección Wsebi	-	-	-	1,4 µl	-	1,4 µl
Plásmido Eamst (Id. de Sec. N° 7)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	-	-	-
Plásmido Wsebi (Id. de Sec. N° 8)	-	-	-	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Volumen final	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Resultados:

10 Las curvas de la amplificación PCR de este ejemplo se resumen en las figuras 1-4, donde las curvas sin la mezcla de detección se marcan con el dígito "1", las curvas con la mezcla de detección se marcan con el dígito "2" y las curvas del líquido de referencia se marcan con el dígito "3". Además, la siguiente tabla resume los valores de PCR obtenidos a partir de las curvas de las figuras 1-4.

15

		Taq DNA polimerasa					
		Eamst			Wsebi		
		Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia	Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia
Caseína	Punto de cruce	24,7	21,1	24,8	26,2	-	26,6
	Fluorescencia	7,2	2,0	7,2	5,7	-	5,8
BSA	Punto de cruce	24,5	21,7	24,8	25,9	-	26,6
	Fluorescencia	7,5	1,8	8,0	5,5	-	7,0

A partir de este ejemplo queda claro que la actividad de la Taq DNA polimerasa secada sin la mezcla de detección es idéntica a la de la Taq DNA polimerasa en el líquido de referencia. Por otro lado, si la Taq DNA polimerasa se seca con la mezcla de detección, la actividad de la PCR tras la resolubilización no es aceptable.

20 Con respecto al parámetro Wsebi, no se detecta ninguna amplificación en absoluto en el caso del secado con la mezcla de detección. Con respecto al parámetro Eamst, aún se puede detectar un punto de cruce similar, pero el valor de fluorescencia no es aceptable.

25 Ejemplo 2

Estabilidad de la Taq DNA polimerasa con el aptámero NTQ12-46A

5 Este ejemplo resume los resultados de mezclas líquidas de la Taq DNA polimerasa con el aptámero NTQ12-46A (Id. de Sec. N° 9). Una Taq DNA polimerasa con un aptámero adherido se denomina AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A a lo largo de este ejemplo.

10 La actividad PCR de la polimerasa tras el almacenamiento y la resolubilización se analizó con y sin la mezcla de detección (con o sin cebadores y sondas) utilizando dos parámetros diferentes. Las mezclas líquidas se secaron durante 16 h a 200 mbar y se almacenaron durante 1 semana a 37 °C con anterioridad a la resolubilización. Como control también se utilizó una mezcla líquida, sin secado (denominada referencia líquida en adelante).

15 Todas las mezclas se proporcionaron en los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos (Roche Diagnostic GmbH) y, tras la resolubilización, se llevó a cabo una amplificación PCR en el LightCycler®480 (Roche Diagnostic GmbH) utilizando el siguiente protocolo:

- 5 minutos a 95 °C
- 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 1 segundo a 72 °C (45x)
- 10 segundos a 40 °C

20 Mezcla madre con caseína:

25 60 mM de Tris/HCl pH 8,3, 60 mM de KCl, 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dATP, 0,4 mM de dCTP, 0,4 mM de dGTP, 1,2 mM de dUTP, 1 g/l de caseína y 0,3 U/μl de AptaTaq DNA polimerasa (sin glicerol; 0,65 pmol del aptámero (NTQ12-46A; Id. de Sec. N° 9) / 1U Taq DNA polimerasa).

Mezcla madre con BSA:

30 60 mM de Tris/HCl pH 8,3, 60 mM de KCl, 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dATP, 0,4 mM de dCTP, 0,4 mM de dGTP, 1,2 mM de dUTP, 1 mg/ml de BSA y 0,3 U/μl de AptaTaq DNA polimerasa (sin glicerol; 0,65 pmol del aptámero (NTQ12-46A; Id. de Sec. N° 9) / 1U Taq DNA polimerasa).

Mezcla de detección qPCR Eamst y mezcla de detección qPCR Wsebi

35 Estas mezclas de detección son iguales que en el ejemplo 1.

La siguientes mezclas se prepararon y se secaron en una placa de microtitulación, y cada mezcla se colocó en dicha placa de microtitulación tres veces:

	AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-64A			
	Eamst		Wsebi	
	Caseína	BSA	Caseína	BSA
Sin la mezcla de detección	5 μl de la mezcla madre		5 μl de la mezcla madre	
Con la mezcla de detección	5 μl de la mezcla madre + 1,4 μl de la mezcla de detección Eamst		5 μl de la mezcla madre + 1,4 μl de la mezcla de detección Wsebi	

40 Para la subsiguiente amplificación PCR, las composiciones secas se resolubilizaron mediante la adición de soluciones de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteado. El líquido de referencia se pipeteó antes de la realización de la PCR en pocillos vacíos de la placa de microtitulación. Los plásmidos se pipetearon con una concentración de 4x10<sup>4</sup> copias/μl.

45

	Eamst			Wsebi		
	Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia	Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia
Agua	6,1 μl	7,5 μl	1,1 μl	6,1 μl	7,5 μl	1,1 μl
Mezcla madre	-	-	5 μl	-	-	5 μl
Mezcla de detección Eamst	1,4 μl	-	1,4 μl	-	-	-
Mezcla de detección	-	-	-	1,4 μl	-	1,4 μl

Wsebi						
Plásmido Eamst (Id. de Sec. N° 7)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	-	-	-
Plásmido Wsebi (Id. de Sec. N° 8)	-	-	-	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Volumen final	10 µl					

Resultados:

5 Las curvas de la amplificación PCR de este ejemplo se resumen en las figuras 5-8, donde las curvas tras el secado sin la mezcla de detección se marcan con el dígito "1", las curvas con la mezcla de detección se marcan con el dígito "2" y las curvas del líquido de referencia se marcan con el dígito "3". Además, la siguiente tabla resume los valores de PCR obtenidos a partir de las curvas de las figuras 5-8.

		Taq DNA polimerasa					
		Eamst			Wsebi		
		Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia	Sin la mezcla de detección	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia
Caseína	Punto de cruce	24,3	23,9	24,9	24,1	24,0	25,1
	Fluorescencia	6,7	5,7	7,3	4,3	4,1	5,4
BSA	Punto de cruce	24,6	24,2	25,0	24,4	24,2	25,0
	Fluorescencia	6,5	5,3	7,6	4,3	4,0	6,0

10 Para verificar las propiedades estabilizantes del aptámero se deben comparar las curvas de amplificación de las figuras 5-8 con las figuras 1-4, más precisamente la figura 5 con la figura 1, la figura 6 con la figura 2, la figura 7 con la figura 3, la figura 8 con la figura 4. Queda claro que las figuras 1-4 muestran curvas de amplificación drásticamente reducidas tras el secado, mientras que las figuras 5-8 sólo muestran curvas ligeramente alteradas tras el secado.

15 A partir de este ejemplo queda claro que la actividad de la AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A secada con o sin la mezcla de detección aún es aceptable tras la resolubilización de la composición seca.

### 20 Ejemplo 3

Comparación de la Taq DNA polimerasa con el aptámero NTQ12-46A y con el aptámero 21-42-P

25 En este ejemplo se compara la actividad PCR de mezclas líquidas de la Taq DNA polimerasa con el aptámero NTQ12-46A (Id. de Sec. N° 9) frente al aptámero 21-42-P (Id. de Sec. N° 10). Una Taq DNA polimerasa con un aptámero adherido se denomina AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A y AptaTaq DNA polimerasa 21-42-P, respectivamente, a lo largo de este ejemplo.

30 La actividad PCR de la polimerasa con ambos aptámeros se analizó con la mezcla de detección (con cebadores y sondas) tras el almacenamiento y la resolubilización utilizando dos parámetros diferentes. Las mezclas líquidas se secaron durante 16 h a 200 mbar y se almacenaron durante 1 semana a 37 °C con anterioridad a la resolubilización. Como control también se utilizó una mezcla líquida, sin secado (denominada referencia líquida en adelante).

35 Todas las mezclas se proporcionaron en los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos (Roche Diagnostic GmbH) y, tras la resolubilización, se llevó a cabo una amplificación PCR en el LightCycler®480 (Roche Diagnostic GmbH) utilizando el siguiente protocolo:

- 5 minutos a 95 °C
- 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 1 segundo a 72 °C (45x)
- 10 segundos a 40 °C

Mezcla madre con caseína + aptámero NTQ12-46A:

## ES 2 394 754 T3

60 mM de Tris/HCl pH 8,3, 60 mM de KCl, 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dATP, 0,4 mM de dCTP, 0,4 mM de dGTP, 1,2 mM de dUTP, 1 g/l de caseína y 0,3 U/μl de AptaTaq DNA polimerasa (sin glicerol; 0,65 pmol del aptámero NTQ12-46A (Id. de Sec. N° 9) / 1U Taq DNA polimerasa).

5 Mezcla madre con caseína + aptámero 21-42-P

60 mM de Tris/HCl pH 8,3, 60 mM de KCl, 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dATP, 0,4 mM de dCTP, 0,4 mM de dGTP, 1,2 mM de dUTP, 1 g/l de caseína y 0,8 U/μl de AptaTaq DNA polimerasa (sin glicerol; 0,65 pmol del aptámero 21-42-P (Id. de Sec. N° 10)).

10 Mezcla de detección qPCR Eamst y mezcla de detección qPCR Wsebi

Estas mezclas de detección son iguales que en el ejemplo 1.

15 Las siguientes mezclas se prepararon y se secaron en una placa de microtitulación, y cada mezcla se colocó en dicha placa de microtitulación tres veces:

	Taq DNA polimerasa con diferentes aptámeros			
	Eamst		Wsebi	
	NTQ21-46A	21-42-P	NTQ21-46A	21-42-P
Con la mezcla de detección	5 μl de la mezcla madre + 1,4 μl de la mezcla de detección Eamst		5 μl de la mezcla madre + 1,4 μl de la mezcla de detección Wsebi	

20 Para la subsiguiente amplificación PCR, las composiciones secas se resolubilizaron mediante la adición de soluciones de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteado. El líquido de referencia se pipeteó antes de la realización de la PCR en pocillos vacíos de la placa de microtitulación. Los plásmidos se pipetearon con una concentración de 4x10<sup>4</sup> copias/μl.

	Eamst		Wsebi	
	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia	Con la mezcla de detección	Líquido de referencia
Agua	7,5 μl	1,1 μl	7,5 μl	1,1 μl
Mezcla madre	-	5 μl	-	5 μl
Mezcla de detección Eamst	-	1,4 μl	-	-
Mezcla de detección Wsebi	-	-	-	1,4 μl
Plásmido Eamst (Id. de Sec. N° 7)	2,5 μl	2,5 μl	-	-
Plásmido Wsebi (Id. de Sec. N° 8)	-	-	2,5 μl	2,5 μl
Volumen final	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

25 Resultados:

Las curvas de la amplificación PCR de este ejemplo se resumen en las figuras 9-12, donde las curvas tras el secado con la mezcla de detección se marcan con el dígito "1" y las curvas del líquido de referencia (sin secado) se marcan con el dígito "2". Además, la siguiente tabla resume los valores de PCR obtenidos a partir de las curvas de las figuras 9-12.

30

		Aptámero NTQ21-46A		Aptámero 21-42-P	
		Eamst	Wsebi	Eamst	Wsebi
Mezcla madre secada con la mezcla de detección	Punto de cruce	25,5	24,1	25,5	24,8
	Fluorescencia	6,4	5,0	7,3	6,4
Líquido de referencia	Punto de cruce	25,6	24,2	25,6	24,7
	Fluorescencia	6,3	5,3	7,8	6,6

De nuevo, para verificar las propiedades estabilizantes del aptámero se deben comparar las curvas de amplificación de las figuras 9-12 con las figuras 1-4 y queda claro que las figuras 1-4 muestran curvas de amplificación drásticamente reducidas tras el secado, mientras que las figuras 9-12 sólo muestran curvas ligeramente alteradas tras el secado.

5 A partir de este ejemplo queda claro que la actividad de la AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A y de la AptaTaq DNA polimerasa 21-41-P secadas con la mezcla de detección es comparable tras la resolubilización de la composición seca.

10 Ejemplo 4

Apta Taq DNA polimerasa NTQ12-46A secada con un plásmido de DNA

15 En este ejemplo se secaron una mezcla líquida con AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A, un plásmido de DNA de dos parámetros diferentes, y sus mezclas de detección respectivas. La actividad PCR tras el almacenamiento y la resolubilización se comparó con mezclas líquidas sin dichos plásmidos. Las mezclas líquidas se secaron durante 16 h a 200 mbar y se almacenaron durante 1 semana a 37 °C con anterioridad a la resolubilización. Como control también se utilizó una mezcla líquida, sin secado (denominada referencia líquida en adelante). Todas las mezclas se proporcionaron en los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos (Roche Diagnostic GmbH) y, tras la resolubilización, se llevó a cabo una amplificación PCR en el LightCycler®480 (Roche Diagnostic GmbH) utilizando el siguiente protocolo:

- 25 - 5 minutos a 95 °C
- 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 1 segundo a 72 °C (45x)
- 10 segundos a 40 °C

La mezcla madre y las dos mezclas de detección son iguales a las del ejemplo 2.

30 La siguientes mezclas se prepararon y se secaron en una placa de microtitulación, y cada mezcla se colocó en dicha placa de microtitulación tres veces. Los plásmidos se pipetearon con una concentración de 4x10e4 copias/µl.

	AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A	
	Eamst	Wsebi
Mezcla madre con la mezcla de detección	5 µl de la mezcla madre + 1,4 µl de la mezcla de detección Eamst	5 µl de la mezcla madre + 1,4 µl de la mezcla de detección Wsebi
Mezcla madre con la mezcla de detección y con el plásmido de DNA	5 µl de la mezcla madre + 1,4 µl de la mezcla de detección Eamst + 2,5 µl del plásmido de DNA Eamst	5 µl de la mezcla madre + 1,4 µl de la mezcla de detección Wsebi + 2,5 µl del plásmido de DNA Wsebi

35 Para la subsiguiente amplificación PCR, las composiciones secas para cada mezcla se resolubilizaron mediante la adición de soluciones de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteado. El líquido de referencia se pipeteó antes de la realización de la PCR en pocillos vacíos de la placa de microtitulación.

	Eamst			Wsebi		
	Mezcla madre con la mezcla de detección	Mezcla madre con la mezcla de detección y el plásmido	Líquido de referencia	Mezcla madre con la mezcla de detección	Mezcla madre con la mezcla de detección y el plásmido	Líquido de referencia
Agua	7,5 µl	10 µl	1,1 µl	7,5 µl	10 µl	1,1 µl
Mezcla madre	-	-	5 µl	-	-	5 µl
Mezcla de detección Eamst	-	-	1,4 µl	-	-	-
Mezcla de detección Wsebi	-	-	-	-	-	1,4 µl
Plásmido Eamst	2,5 µl	-	2,5 µl	-	-	-
Plásmido Wsebi	-	-	-	2,5 µl	-	2,5 µl
Volumen final	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Resultados:

5 Las curvas de la amplificación PCR de este ejemplo se resumen en las figuras 13-14, donde las curvas tras el secado sin el plásmido se marcan con el dígito "1", las curvas tras el secado con el plásmido se marcan con el dígito "2" y las curvas del líquido de referencia (sin secado) se marcan con el dígito "3". Además, la siguiente tabla resume los valores de PCR obtenidos a partir de las curvas de las figuras 13-14.

		Eamst	Wsebi
Mezcla madre con la mezcla de detección	Punto de cruce	24,5	24,8
	Fluorescencia	6,6	5,2
Mezcla madre con la mezcla de detección y el plásmido	Punto de cruce	24,5	24,5
	Fluorescencia	6,5	5,0
Líquido de referencia	Punto de cruce	24,9	24,9
	Fluorescencia	7,3	5,0

10 A partir de este ejemplo queda claro que la actividad de la AptaTaq DNA polimerasa NTQ12-46A tras el almacenamiento y la resolubilización de la composición seca no se influencia por la adición del plásmido a la mezcla líquida con anterioridad al secado.

LISTADO DE SECUENCIAS

15

<110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG

20

<120> Composición seca de los compuestos de reacción con una polimerasa estabilizada

25

<130> 25614 EP1

<150> PE08022082

<151> 19-12-2008

30

<160> 10

<170> Patent In versión 3.5

35

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> cebador directo Eamst

<400> 1

gtggcggcac catgtct 17

45

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

50

<220>

<223> cebador indirecto Eamst

<400> 2

ctggttaaaa agattggttg cga 23

55

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>  
 <223> Sonda Fam-Tamra Eamst  
 5 <400> 3  
 cagctggacc tacgggagcg gg 22  
 <210> 4  
 <211> 21  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo Wsebi  
 15 <400> 4  
 ggcttagtga atccttcgga g 21  
 <210> 5  
 <211> 22  
 20 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador indirecto Wsebi  
 25 <400> 5  
 gttacccaa cttgcagtc ca 22  
 <210> 6  
 <211> 23  
 30 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda Fam-Tamra Wsebi  
 35 <400> 6  
 tgtgccgttg ccggctcaaa tag 23  
 <210> 7  
 <211> 3227  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Plásmido Eamst  
 <400> 7  
 50

ES 2 394 754 T3

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatagatc ctgaggatcg gggtgataaa tcagtctgcg ccacatcggg ggaaacaaaa	240
tggcgcgaga tctaaaaaaaa aaggctccaa aaggagcctt tcgcgctacc aggtaacgcg	300
ccactccgac gggattaacg agtgccgtaa acgacgatgg ttttaccgtg tgcggagatc	360
aggttctgat cctcgagcat cttagaatt cgtcccacgg tttgtctaga gcagccgaca	420
atctgggtgg cggcaccatg tctggctctc gagcgtatgg ggctttgtca cccgctcccg	480
taggtccagc tggcagctag cctcgcaacc aatcttttta accagccaat ttctgacgg	540
gtaatthtga tttgatgcc gtccgggtga gtcatacgt ctggttgttt tgccagattc	600
agcagagtct gtgcaatgcg gccgctgacg tcgaggaacg ccaggttgcc cactttctca	660
ctagtacct gcagccggcg cgccatctgt gcagaca	
acctgaatca attggcgaaa tttttgtac gaaattt	
gcacgtacce atgcgctacg ttctggccc tcttcaa	
tcaccctgat tcagatagga gaggatcatt tctttac	
gccacagagc cttaacgat gtagtacagc gtttccg	
gtgctcttgg atgggtactt atgaatgtgg caatgag	
tccgtttgag gtttaccaag taccataaga tccttaa	
taatattata tcaagaattg tacctgaaag caaataa	
cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatat	
gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgc	
gctcggctgt tcggctgcgg cgagcggat cagctca	

cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctaga  
gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag gcatcgta  
tggcttcatt cagctccggc tccaacgat caaggcga  
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgta  
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattcl  
gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcg  
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataat  
taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcga  
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaccc  
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaagc  
taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttc

<211> 3200  
<212> DNA  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Plásmido Wasabi

<400> 8

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacac  
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcc  
ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatca  
accatagatc ctgaggatcg gggtgataaa tcagtctc  
tggcgcgaga tctaaaaaaaa aaggctccaa aaggagcc  
ccactccgac gggattaacg agtgccgtaa acgacgat  
aggttctgat cctcgagcat cttagaatt cgtccca  
atctgggttt acccaacttt gcagtccaaa tgtgccgt  
cgaaggattc actaagcccc aatttcctga cgggtaat  
tgagtcatag cgtctggttg ttttgccaga ttcagcac  
acgtcgagga acgccaggtt gcccacttcc tcactagt

10

tgtgcagaca aacgcatcag gatatccgga tttacctg  
tacgaaattt cagccacttc acaggcggtt ttgcacac  
ccctcttcaa acaggcccag ttcgccaata aaatcacg  
atctctttac cctcttcgtc tttgatcagc actgccac  
agcgtttccg ctttttcacc ctggtgaata agcggtgc  
tggcaatgag acaagaacca ttcgagagta ggatccgl  
agatccttaa atttttatta tctagctaga tgataata  
aagcaaataa attttttate tggcttaact atgcggca  
tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgta  
gctcttccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcc  
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccaca

gggaaagctag agtaagtagt tccagctta atagttt  
 caggcatcgt ggtgtcacgc tgcgtcttg gtatggc  
 gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaai  
 ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgtt  
 tgcataattc tcttactgtc atgcatccg taagatg  
 caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgacc  
 tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaa  
 cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgtt  
 ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttacttt  
 aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataag  
 tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttal

5 <210> 9  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> aptámero NTQ12-46A  
 10  
  
 <400> 9  
 cgatcatctc agaacattct taqcgtttg ttctgtgta tgatcg 46  
  
 15 <210> 10  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> aptámero 21-42-P  
  
 <400> 10  
 gatcatctca gaacattctt agcgtttgt tctgtgat ga 42

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para producir una composición seca de los compuestos de reacción almacenable, y dicho método incluye los pasos de
- 10 a) proporcionar una mezcla líquida de compuestos de reacción, y dicha mezcla líquida incluye cebadores, nucleótidos, una Taq DNA polimerasa y una primera molécula estabilizante, donde dicha primera molécula estabilizante es una proteína, y
- 10 b) secar dicha mezcla líquida mediante la reducción de la presión que envuelve a dicha mezcla líquida,
- 15 en el que dicha composición seca de los compuestos de reacción es soluble en solución acuosa, caracterizada de manera que dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción del paso a) también incluye un aptámero como segunda molécula estabilizante, donde dicho aptámero tiene la capacidad de adherirse a una Taq DNA polimerasa.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha primera molécula estabilizante es la caseína o la BSA.
- 20 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho aptámero es un aptámero que tiene la secuencia Id. de Sec. N° 9 o Id. de Sec. N° 10.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción es una solución acuosa tamponada que incluye una sal de magnesio.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 4, en el que la presión que envuelve a la mezcla líquida se reduce en el paso b) hasta por debajo de los 600 mbar, preferiblemente por debajo de los 400 mbar; lo más preferible, a 200 mbar.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, en el que dicho secado del paso b) se lleva a cabo a temperatura ambiente.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 a 6, en el que dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción también incluye sondas de detección, y preferiblemente dichas sondas de detección son sondas marcadas con fluorescencia.
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, en el que dicha mezcla líquida de los compuestos de reacción también incluye moldes de DNA.
- 45 9. Una composición seca de los compuestos de reacción que incluye cebadores, nucleótidos, una Taq DNA polimerasa, una primera molécula estabilizante y un aptámero como segunda molécula estabilizante, donde dicha primera molécula estabilizante es una proteína, dicho aptámero tiene la habilidad de adherirse a la Taq DNA polimerasa, y dicha composición seca proporciona actividad PCR tras la resolubilización posterior al almacenamiento a temperatura ambiente durante, al menos, una semana.
- 50 10. La composición seca de los compuestos de reacción de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha composición seca de los compuestos de reacción también incluye sondas de detección.
- 50 11. La composición seca de los compuestos de reacción de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 10, donde dicha primera molécula estabilizante es la caseína o la BSA.
- 55 12. La composición seca de los compuestos de reacción de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 11, donde dicho aptámero es un aptámero que tiene la secuencia Id. de Sec. N° 9 o Id. de Sec. N° 10.
- 60 13. Método para la realización de la amplificación PCR, y dicho método incluye los pasos de
- 60 a) resolubilizar una composición seca de compuestos de reacción de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 12 mediante la adición de una solución acuosa, y
- 60 b) realizar un protocolo de termociclado con la solución acuosa que incluye los compuestos de reacción resolubilizados.
- 65 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha solución acuosa incluye un ácido nucleico diana que se ha de amplificar mediante el protocolo de termociclado.

Figura 1

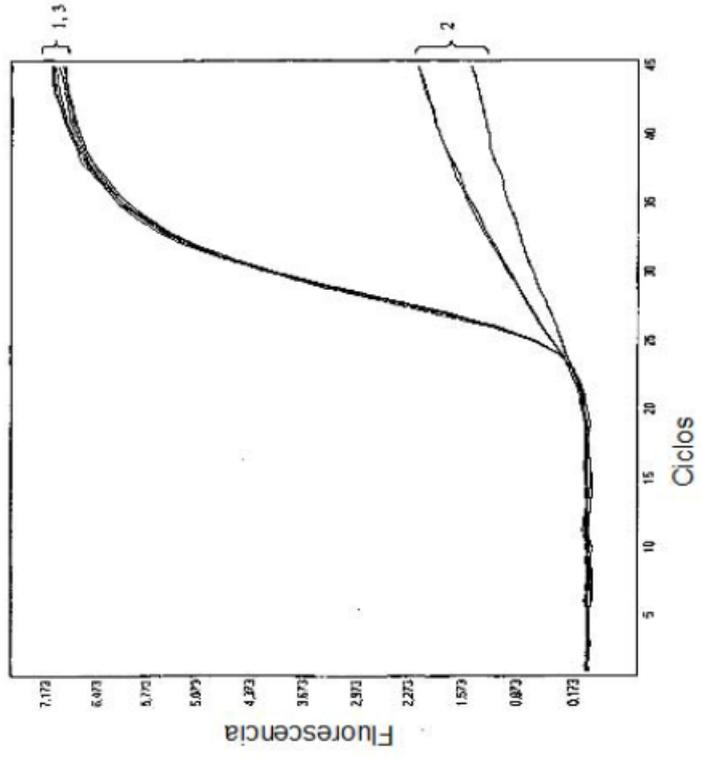


Figura 2

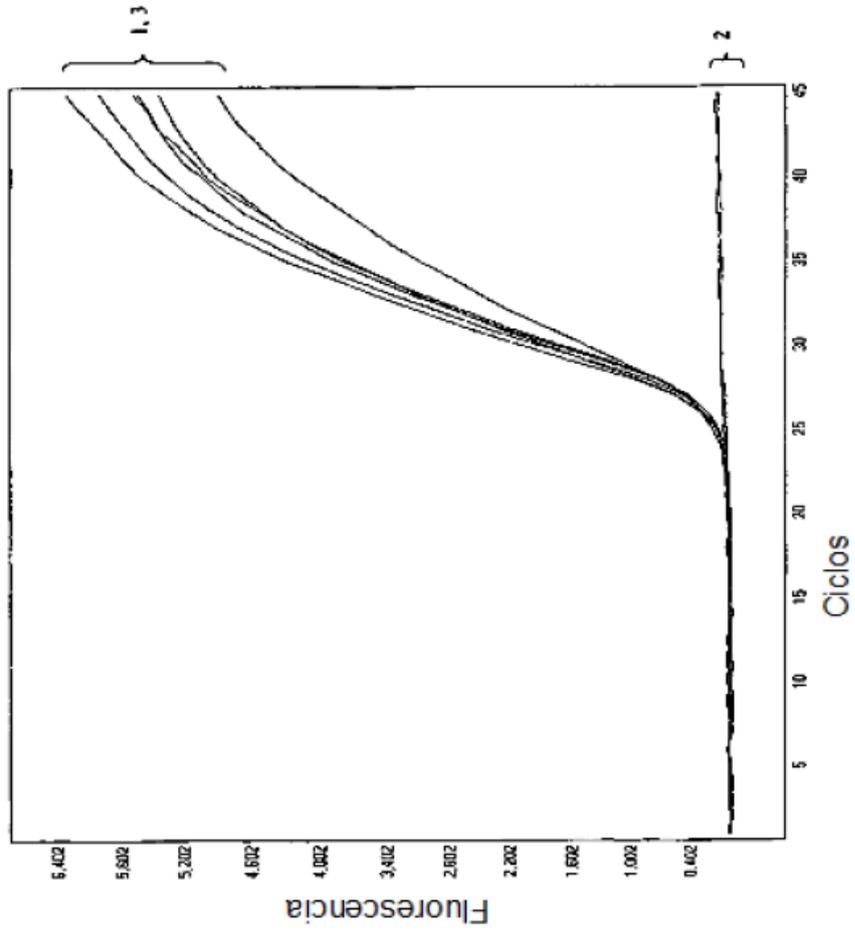


Figura 3

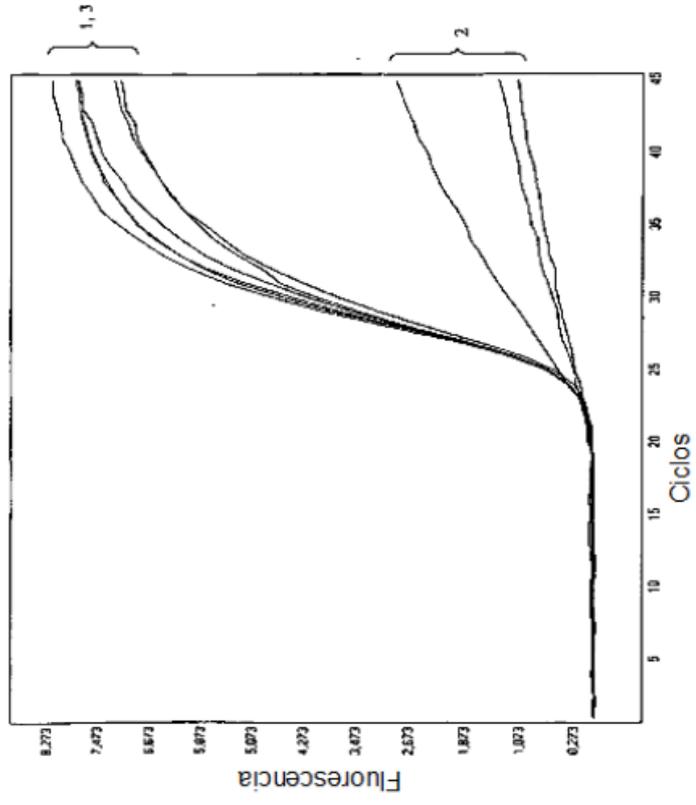


Figura 4

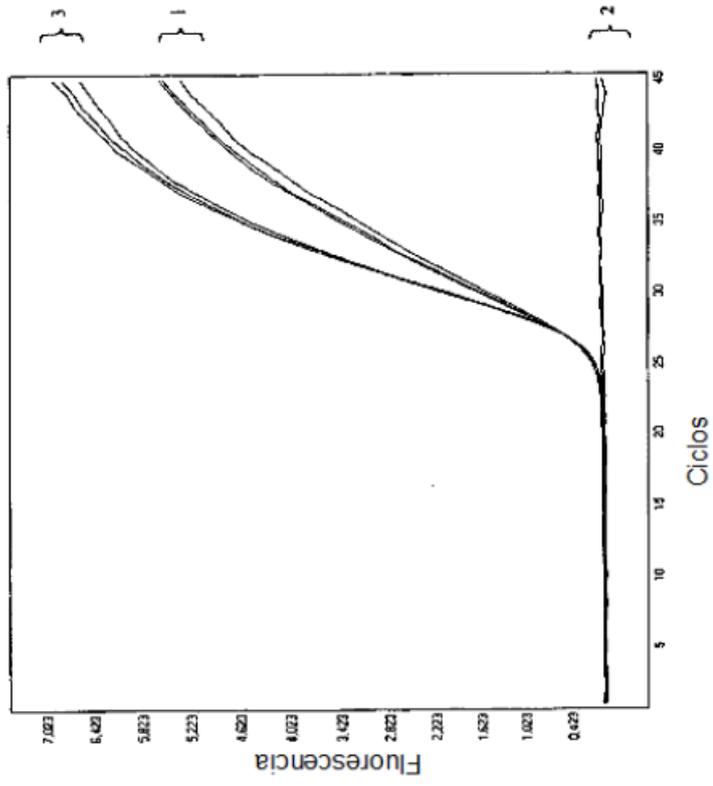


Figura 5

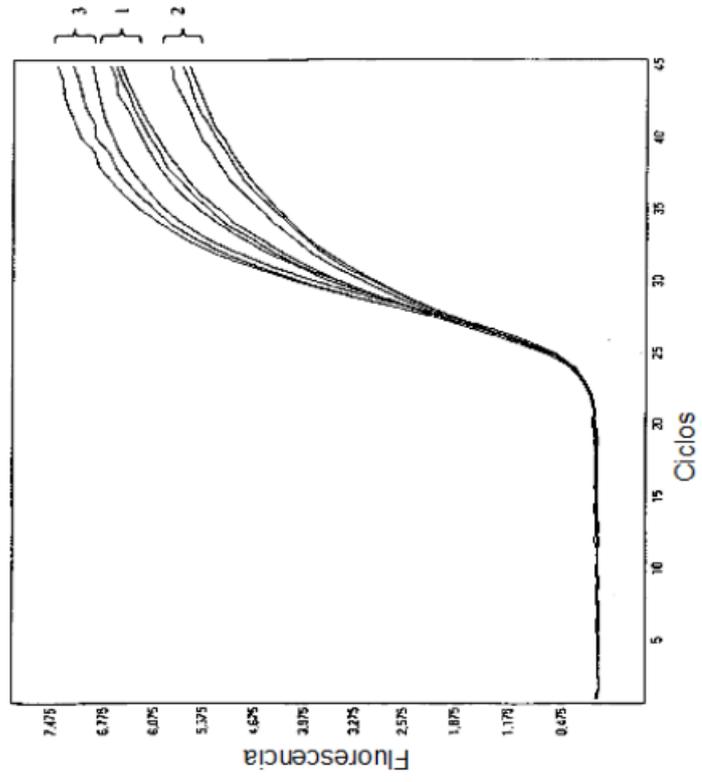


Figura 6

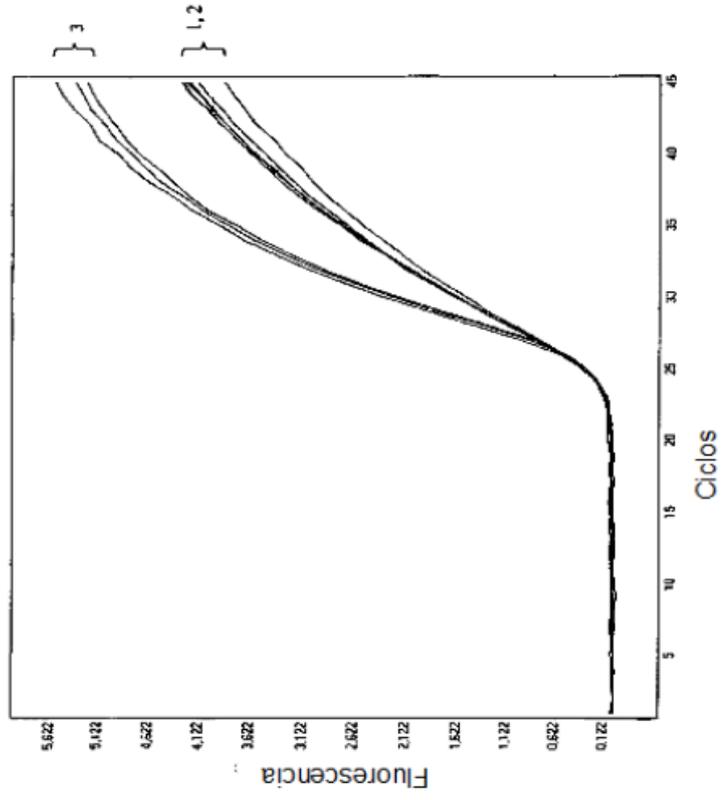


Figura 7

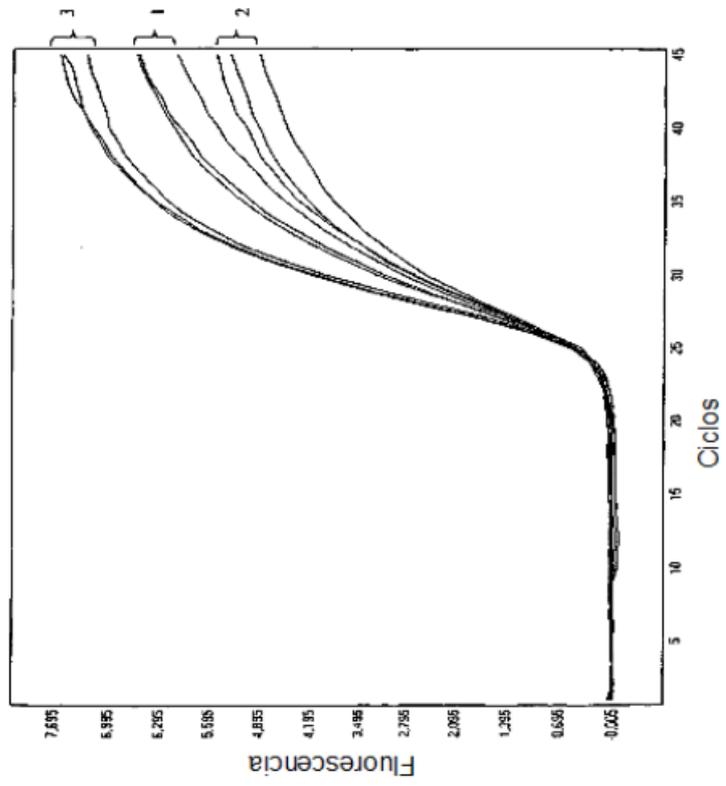


Figura 8

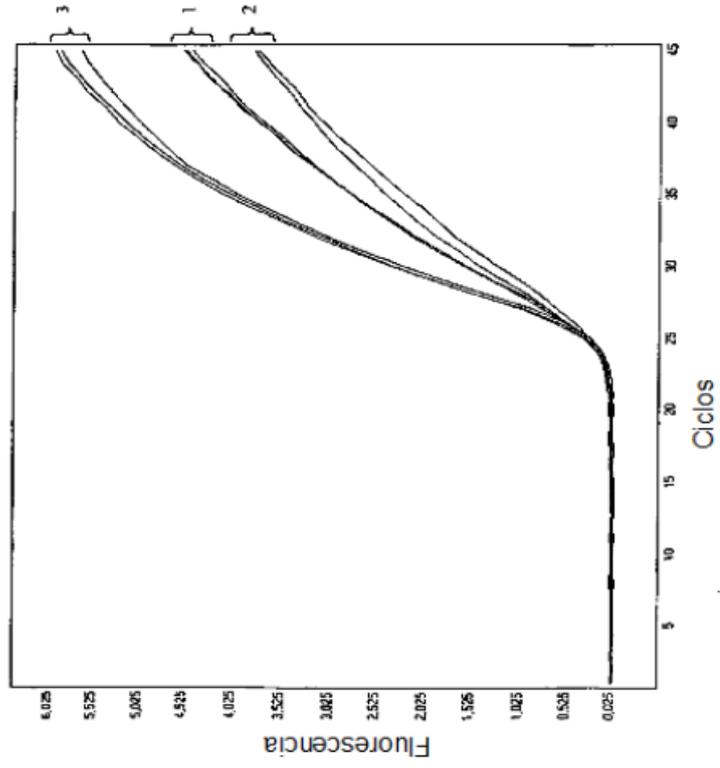


Figura 9

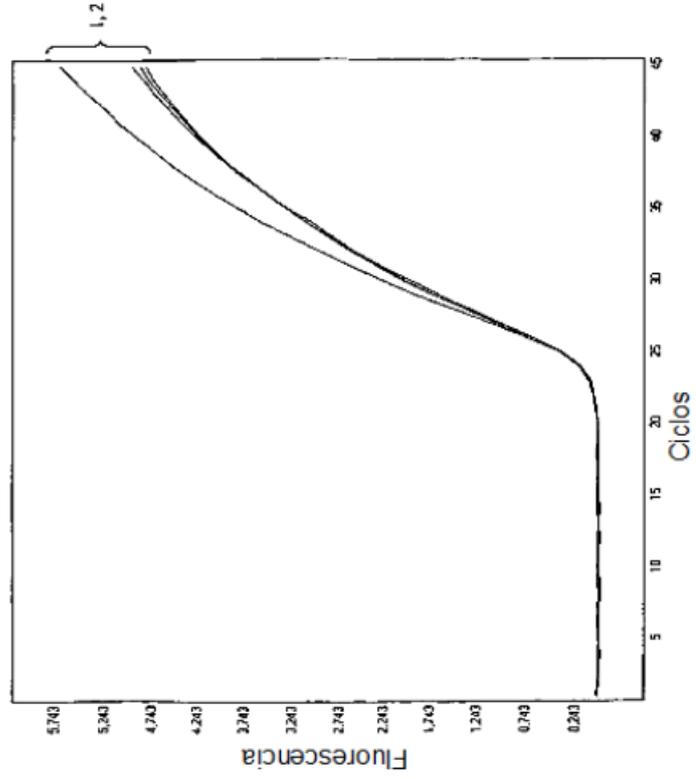


Figura 10

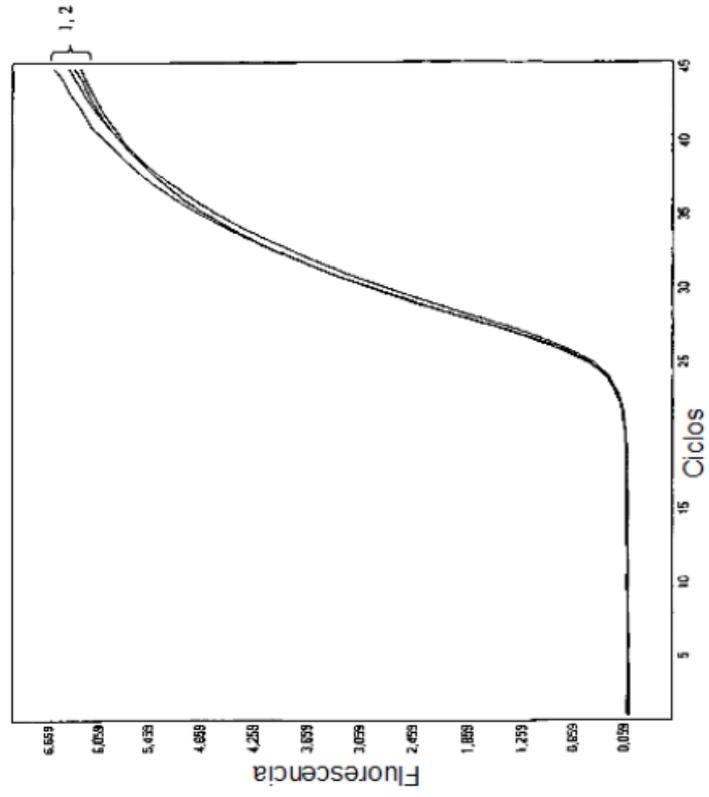


Figura 11

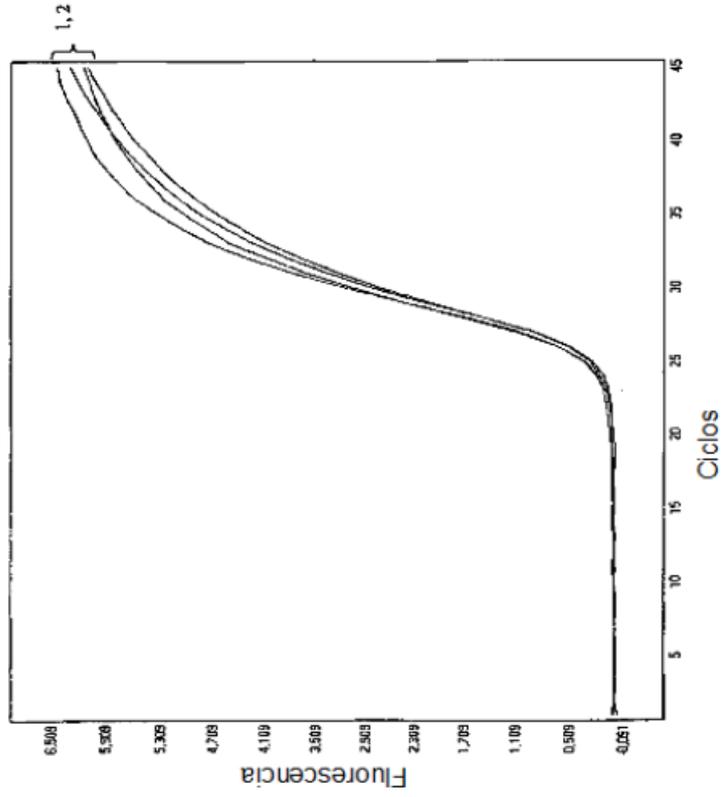


Figura 12

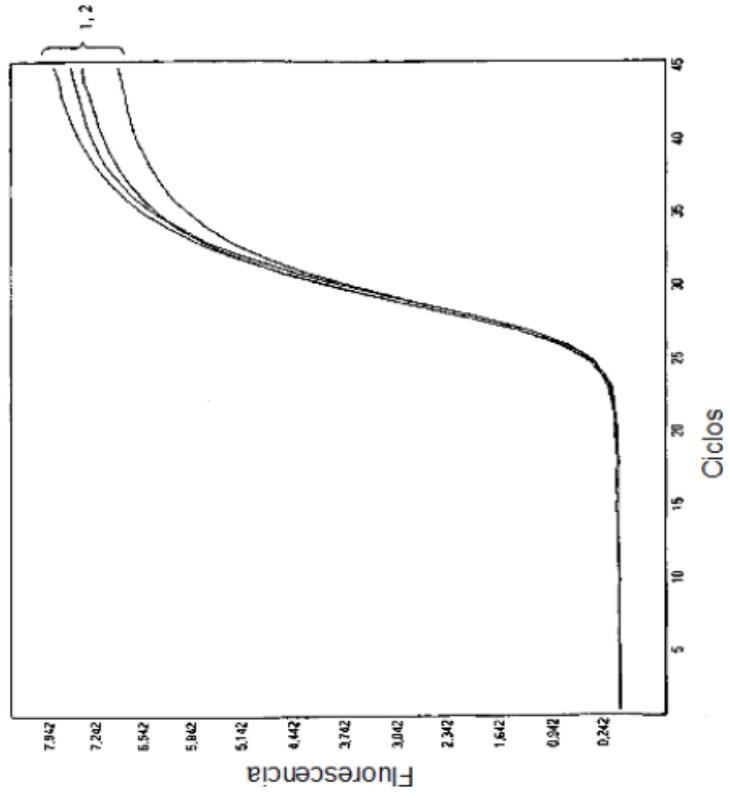


Figura 13

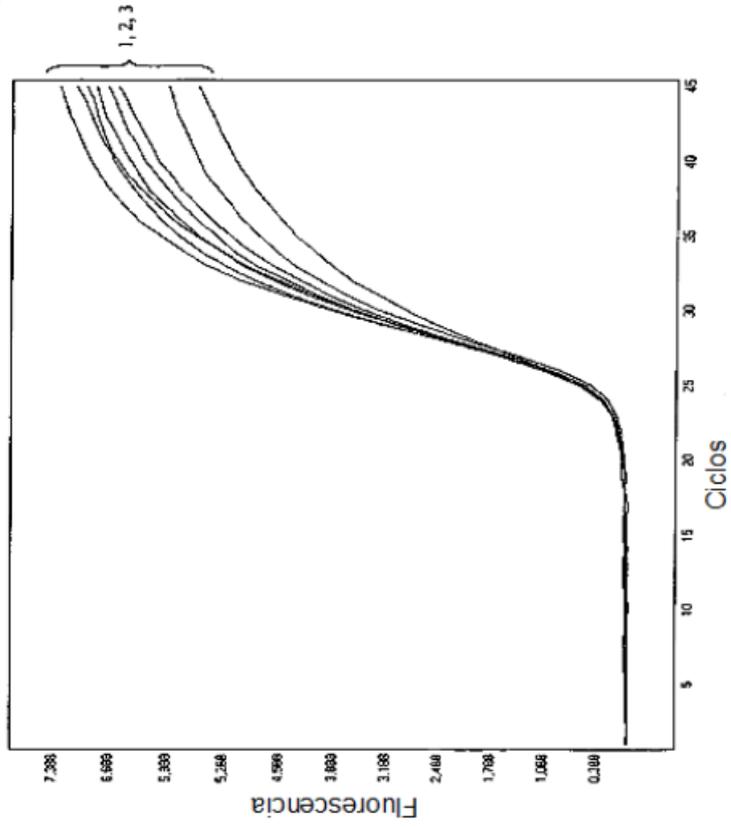


Figura 14

