

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 669**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6865 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2008 PCT/GB2008/000235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2008 WO08090340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2008 E 08701909 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 2115166**

54 Título: **Amplificación y pruebas de ácido nucleico**

30 Prioridad:

23.01.2007 GB 0701253

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

24.06.2022

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools, Trinity Lane
Cambridge, Cambridgeshire CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**LEE, HELEN, HWAI-AN;
DINEVA, MAGDA, ANASTASSOVA y
FLETCHER-BROWN, FIONA, FRANCES, SARAH**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 915 669 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

Amplificación y pruebas de ácido nucleico

5 Esta invención se refiere a métodos para amplificar un ácido nucleico diana y a métodos para probar ácidos nucleicos, particularmente métodos que pueden llevarse a cabo sin instalaciones o instrumentos de laboratorio especializados. También se proporcionan formulaciones y kits para la amplificación de ácidos nucleicos.

10 Las pruebas de ácido nucleico se usan para muchos fines tales como la detección y el diagnóstico de enfermedades infecciosas y trastornos genéticos, pruebas de susceptibilidad a enfermedades, monitorización de la progresión del tratamiento y mejora de la seguridad de los suministros de sangre. Las pruebas de ácido nucleico combinan las ventajas de la detección directa y altamente específica de secuencia del ácido nucleico de un agente infeccioso con una sensibilidad analítica que es varios órdenes de magnitud más alta que la de las pruebas inmunológicas o los métodos de aislamiento de virus y cultivo celular. Las pruebas de ácido nucleico también reducen el riesgo de transmisión de agentes infecciosos entre la infección y la seroconversión, de infección con virus inmunovariantes y de portador inmunosilencioso u oculto.

20 Los métodos bien conocidos de análisis de ácidos nucleicos implican el uso de transcripción inversa de ARN seguida de PCR (RT-PCR) para amplificar especies de ARN. Sin embargo, la RT-PCR tiene la desventaja de que implica amplios cambios repetidos en la temperatura de la muestra, para lo cual se requieren instrumentos de ciclos térmicos especializados. Una desventaja adicional es que el molde de ARN amplificado puede ser difícil de diferenciar del ADN bicatenario contaminante amplificado.

25 Una estrategia de amplificación de ARN alternativa a la RT-PCR se denomina amplificación basada en la transcripción. Dichos métodos implican la amplificación de una plantilla de ARN utilizando transcriptasa inversa (RT), actividades de RNasa H y ARN polimerasa, e incluyen amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Chan y Fox, Rev. Med. Microbiol. 10: 185-196 (1999); Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1874-1878 (1990); Compton, Nature 350:91-92 (1991)). NASBA y 3SR usan RT del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (que también tiene actividad RNasaH), RNasa H de *E. coli* y ARN polimerasa T7. TMA usa RT del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) (que también tiene actividad de RNasa H) y la ARN polimerasa T7.

35 Los métodos de amplificación basados en la transcripción tienen varias ventajas sobre la RT-PCR. Las reacciones se producen de forma simultánea en un solo tubo y se llevan a cabo en condiciones isotérmicas, por lo que no se requiere un termociclador. La reacción de amplificación es más rápida que la RT-PCR (puede verse una amplificación de 1×10^9 veces después de cinco ciclos, comparado con 1×10^6 veces de amplificación después de 20 ciclos para RT-PCR). El fondo de ADN no interfiere con la amplificación basada en la transcripción, por lo que estos métodos no se ven afectados por la contaminación del ADN bicatenario. El producto de amplificación es monocatenario y puede detectarse sin ningún requisito de separación de cadenas.

40 Los métodos de amplificación convencionales basados en la transcripción, sin embargo, tienen la desventaja de que tienen menor especificidad que la RT-PCR. También es necesario desnaturar la plantilla de ácido nucleico calentando la muestra y después enfriándola antes de añadir las enzimas necesarias para la amplificación de la plantilla, aumentando de esta manera la complejidad del método. Los métodos de amplificación basados en la transcripción tampoco son tan sólidos como la RT-PCR. El NASBA convencional es sensible a las fluctuaciones de temperatura que exceden +/- 0,5 °C.

50 El documento US 5.981.183 describe un método de amplificación basado en la transcripción que usa enzimas termoestables. La reacción de amplificación se lleva a cabo a 50-70 °C, mejorando de esta manera la especificidad. Sin embargo, una desventaja de este método es que todavía es susceptible a falsos positivos provocados por cebado falso de ADN bicatenario desnaturizado. Dichos métodos tampoco son adecuados para su uso en el campo debido a la necesidad de calentar la reacción a 50-70 °C.

55 Otra desventaja de las pruebas de ácido nucleico convencionales es que la detección del producto de reacción amplificado requiere mucho tiempo, separación electroforética de los productos de reacción que requiere mucha mano de obra, o equipo costoso para detectar señales fluorescentes o quimioluminiscentes. Los reactivos necesarios son caros y deben transportarse y almacenarse por debajo de la temperatura ambiente. Se requieren áreas designadas separadas para las etapas de preparación de la muestra, de amplificación y de detección de los métodos. Los métodos solo pueden llevarse a cabo en centros especializados, laboratorios bien equipados, por técnicos altamente capacitados. En consecuencia, los métodos convencionales no son adecuados para pruebas de campo o de cerca del paciente, y no son asequibles en las regiones más pobres con una alta prevalencia de enfermedades infecciosas (tales como África, Asia y América Latina) donde más se necesitan.

65 Existe, por lo tanto, una necesidad de proporcionar métodos de análisis de ácidos nucleicos que puedan llevarse a cabo sin el uso de instalaciones o instrumentos de laboratorio especializados y que tengan una alta especificidad por el ácido nucleico diana.

La liofilización se ha usado para almacenar enzimas para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. El documento US 5.556.771 describe formulaciones liofilizadas que comprenden MMLV RT y polimerasa T7 con trehalosa y polivinilpirrolidona como agentes estabilizadores crioprotectores. Sin embargo, los resultados descritos en el documento US 5.556.771 muestran cierta pérdida de actividad (medida como la capacidad de provocar la amplificación de ácidos nucleicos) después del almacenamiento a 35 °C durante 61 días. Las instrucciones proporcionadas con los kits disponibles en el mercado que contienen reactivos liofilizados para llevar a cabo la amplificación mediada por transcripción (Kit GEN-PROBE® APTIMA® General Purpose Reagents (GPR) 250) o la amplificación por PCR (SmartMix™ HM de Cepheid) requieren que los reactivos liofilizados se almacenen a 2-8 °C. Las instrucciones proporcionadas con un kit disponible en el mercado que contiene reactivos liofilizados para la amplificación de ácidos nucleicos basados en NASBA (Nuclisens® Basic Kit Amplification Reagents of Biomérieux) especifica que los reactivos de amplificación deben almacenarse a ≤ -20 °C. También se ha descubierto que las formulaciones liofilizadas descritas en el documento US 5.556.771 y en los kits disponibles en el mercado anteriores no se reconstituyen rápidamente, sino que requieren una mezcla extensa en tampones de reconstitución especialmente formulados.

Existe, por lo tanto, una necesidad de proporcionar formulaciones liofilizadas que puedan conservar los reactivos lábiles en condiciones estables durante largos periodos a temperatura ambiente y que puedan rehidratarse fácil y rápidamente.

El documento WO 93/00807 se refiere a un método para estabilizar biomateriales durante la liofilización usando un aditivo de dos componentes. Un componente sirve como crioprotector tales como polietilenglicol, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, dextrano o ficoll que protege la proteína durante la congelación. El segundo componente tales como azúcares, polihidroxi alcoholes, aminoácidos o metilamina protege el biomaterial durante el secado. Guatelli *et al.* (1990, PNAS 87(19); 7797) se refiere a la amplificación isotérmica *in vitro* de ácidos nucleicos por una reacción multienzimática modelada después de la replicación retroviral. Fahy *et al.* (1991, PCR methods and applications 1(1); 25-33) se refiere a la replicación de secuencias autosostenida (3SR): Un sistema de amplificación isotérmico basado en la transcripción alternativo a la PCR. El documento WO 02/04667 se refiere a una señal de detección y captura mejoradas en ensayos con varilla. El documento EP 0 726 310 se refiere a composiciones de enzimas estabilizadas para usar en la amplificación de ácidos nucleicos. Se proporcionan composiciones para la estabilización de una o más enzimas en una sola formulación estabilizada. Las composiciones adicionales incorporan una mezcla enzimática seca estabilizada junto con los cofactores y sustratos enzimáticos necesarios en un solo recipiente para su uso tras la rehidratación. El documento WO 2005/103277 describe una mezcla seca de amplificación para PCR que contiene ADN polimerasa, trifosfatos de desoxinucleósido, componentes tamponantes, colorante hidrosoluble de electroforesis y estabilizantes presentados por la composición de carbohidratos de D-glucosa, disacárido (seleccionado del grupo de inulina, sacarosa, trehalosa maltosa) y polisacárido (seleccionado del grupo de D-manitol, dextranos, ficoll, polivinilpirrolidona). El documento US 2006/068398 se refiere a métodos y composiciones que proporcionan condiciones de reacción optimizadas para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y para métodos y composiciones que reducen la contaminación de las reacciones de amplificación durante la configuración. El documento US 2002/173016 describe dispositivos de polimerasa liofilizada de alto rendimiento y métodos para su uso en la producción de ácidos nucleicos usando reacciones de polimerasa dependientes de molde. El documento WO 2006/119280 describe gránulos liofilizados, adecuados para su uso en un dispositivo microfluídico, y un método para preparar los mismos. Los gránulos liofilizados contienen diversos reactivos biológicos, o micropartículas, y un crioprotector.

De acuerdo con la invención, se proporciona una formulación liofilizada que comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana, en donde las actividades enzimáticas comprenden una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN, y en donde la formulación no incluye cofactor o cofactores enzimáticos, cebadores, rNTP y dNTP necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende amplificar un ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación autosostenida que se lleva a cabo a una temperatura entre 42 °C y 50 °C, o a una temperatura más baja, preferentemente 35-41 °C, en donde se usa una formulación liofilizada de la invención para la reacción de amplificación.

La expresión "reacción de amplificación autosostenida" se usa en el presente documento para incluir reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en las cuales se producen copias de un ácido nucleico diana, que después funcionan como moldes para la producción de copias adicionales del ácido nucleico diana (ya sea copias con sentido o antisentido). Las reacciones son reacciones autosostenidas que pueden producirse en condiciones isotérmicas, por lo que no se requieren ciclos térmicos durante la reacción de amplificación (a diferencia de, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Los expertos conocen ejemplos de reacciones de amplificación autosostenidas e incluyen amplificaciones basadas en la transcripción, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación de Q beta replicasa y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

Se ha descubierto que el tiempo necesario para obtener el número de copias deseado del producto de amplificación usando un método descrito en este documento es sorprendentemente mucho menor que el tiempo necesario para lograr el mismo número de copias con métodos de amplificación autosostenidos convencionales. En la experiencia de los presentes inventores, los métodos descritos en el presente documento son aproximadamente el doble de rápidos que los métodos convencionales. Un tiempo de incubación adecuado entre 42 °C y 50 °C es de al menos 30 minutos o al menos 40 minutos. 45-55 minutos pueden ser óptimos.

Si bien la temperatura puede variar entre 42 °C y 50 °C cuando se lleva a cabo la reacción de amplificación, se espera que la reacción de amplificación se lleve a cabo generalmente en condiciones sustancialmente isotérmicas, es decir, dentro de un intervalo de temperatura de 1-3 °C. Una forma adecuada de lograr esto es incubar la reacción de amplificación usando un baño de agua.

La expresión "a una temperatura entre 42 °C y 50 °C" significa por encima 42 °C y menos de 50 °C. La reacción de amplificación autosostenida puede llevarse a cabo a una temperatura por encima de 43 °C y menos de 50 °C. La reacción de amplificación autosostenida puede llevarse a cabo a una temperatura de 43-49 °C. La reacción puede llevarse a cabo a una temperatura de 43-49 °C, 44-49 °C, 45-49 °C o 45-48 °C.

El ácido nucleico diana puede ser ADN (monocatenario o bicatenario) o ARN. El ácido nucleico diana puede ser cualquier ácido nucleico diana que se desee amplificar o detectar, incluyendo ARN ribosómico, ARN o ADN vírico o bacteriano. El ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico de (o derivado de) un microorganismo que provoca una enfermedad (por ejemplo, VHC). El ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico de un organismo asociado a una enfermedad de transmisión sexual, tales como *Chlamydia trachomatis* o VIH. En otras realizaciones, el ácido nucleico diana puede ser el ácido nucleico de un sujeto (por ejemplo, para determinar un genotipo particular del sujeto).

Los métodos de la invención pueden usarse para determinar si un ácido nucleico diana está presente o no en una solución de muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. En consecuencia, también se proporciona de acuerdo con la invención un método para probar la presencia de un ácido nucleico diana en una solución de muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana, comprendiendo el método incubar la solución de muestra en condiciones para la amplificación del ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación autosostenida a una temperatura entre 42 °C y 50 °C, o a una temperatura más baja, preferentemente 35-41 °C, en donde se usa una formulación liofilizada de la invención para la reacción de amplificación.

La solución de muestra puede ser cualquier solución sospechosa de contener un ácido nucleico diana que se desea detectar. La solución de muestra puede ser, o derivar de, una muestra biológica obtenida de un sujeto. Algunos ejemplos de muestras biológicas son sangre, suero, orina, un frotis cervical, una muestra de hisopo u homogeneizado de tejido.

Se apreciará que puede ser necesario extraer ácido nucleico de la muestra biológica para proporcionar una solución de muestra que pueda probarse de acuerdo con la invención para determinar si está presente o no un ácido nucleico diana. La extracción de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo usando cualquier método de extracción de ácidos nucleicos adecuado. Los métodos adecuados incluyen la extracción en fase sólida de ácido nucleico sobre partículas de sílice (Boom *et al.*, J. Clin. Microbiol; 28:495-503, 1990) o filtros de gel de sílice/fibra de vidrio (Vogelstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 615-619, 1979) en presencia de sales caotrópicas, usando kits disponibles en el mercado (por ejemplo, de Qiagen, Roche o Invitrogen). Los métodos alternativos incluyen: tecnología de extracción en fase líquida basada en la extracción con ácido guanidinio tiocianato-fenol-cloroformo (Chomczynski *et al.*, Anal Biochemistry; 162: 156-159, 1987); protocolo del kit FTA® de Whatmann usando matrices de filtro de papel FTA® impregnadas con una fórmula química que lisa las membranas celulares e inmoviliza los ácidos nucleicos; tecnología Charge Switch™ (Baker *et al.*, documento EP1036082). Alternativamente, los procedimientos más sencillos implican la lisis de la muestra mediante tratamiento térmico o químico y la dilución de la muestra antes de la amplificación.

Los métodos de la invención para determinar si un ácido nucleico diana está presente o no en una solución de muestra pueden usarse para analizar una muestra biológica obtenida de un sujeto para ver si el sujeto está infectado con un agente infeccioso o para controlar la progresión de una enfermedad, del sujeto o para la respuesta al tratamiento.

Algunos ejemplos de agentes infecciosos incluyen agentes infecciosos bacterianos o víricos, tales como VIH, VHC, VPH, CMV, HTLV, VEB, rinovirus, virus del sarampión. Los agentes infecciosos pueden ser aquellos asociados a enfermedades de transmisión sexual, tales como *Chlamydia trachomatis* o VIH.

Pueden llevarse a cabo reacciones adecuadas de amplificación de ácidos nucleicos autosostenidas usando las siguientes actividades enzimáticas: una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN.

Las actividades de ADN polimerasa dependiente de ARN, ADN polimerasa dependiente de ADN y de ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN pueden proporcionarse por una sola enzima (por ejemplo, AMV-RT o MMLV-RT).

Una enzima separada (por ejemplo, una RNasaH) puede proporcionar actividad adicional de ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN. En algunas realizaciones, pueden usarse AMV-RT y RNasaH (como en NASBA).

5 Como se ha explicado anteriormente, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos autosostenidas son conocidas por los expertos en la materia. Los tipos adecuados de reacción que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen métodos de amplificación basados en la transcripción, tales como métodos correspondientes a NASBA, TMA o 3SR (es decir, métodos que son los mismos que los de NASBA, TMA o 3SR convencionales, pero llevados a cabo a una temperatura entre 42 °C y 50 °C).

10 A continuación se describe una reacción de amplificación autosostenida basada en la transcripción adecuada para su uso en los métodos de la invención, con referencia a la Figura 1.

15 Un Cebador 1 antisentido comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción de un ARN diana para que el cebador pueda hibridar específicamente con el ARN diana, y una versión monocatenaria de una secuencia promotora para una ARN polimerasa dependiente de ADN en su extremo 5'. El cebador 1 se hibrida con la diana de ARN. Una ADN polimerasa dependiente de ARN extiende el Cebador 1 para sintetizar una copia de ADN complementaria (ADNc) de la diana de ARN. Una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN digiere el ARN del híbrido ARN-ADNc. Un Cebador 2 sentido comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción del ADNc. El Cebador 2 se hibrida con el ADNc en dirección 3' de la parte del ADNc formada por el Cebador 1. El cebador 2 se extiende mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN para producir una segunda hebra de ADN que se extiende a través de la secuencia promotora de la ARN polimerasa dependiente de ADN en un extremo (formando así un promotor bicatenario). Este promotor se usa por una ARN polimerasa dependiente de ADN para sintetizar una gran cantidad de ARN complementarios a la secuencia diana original. Estos productos de ARN funcionan después como moldes para una fase cíclica de la reacción, pero con las etapas de hibridación de cebador invertidas, es decir, Cebador 2 seguido de Cebador 1.

25 En una variación de este método, el Cebador 2 también puede incluir una versión monocatenaria de una secuencia promotora para la ARN polimerasa dependiente de ADN. Esto da como resultado la producción de ARN con el mismo sentido que la secuencia diana original (así como ARN complementarios a la secuencia diana original).

30 En algunas reacciones convencionales de amplificación basadas en la transcripción autosostenida, se sabe que escinde el ARN diana en el extremo 5' antes de que sirva como molde para la síntesis de ADNc. Se usa una enzima con actividad de RNasa H para escindir la porción de ARN de un híbrido de ARN-ADN formado mediante la adición de un oligonucleótido (un oligonucleótido de escisión) que tiene una secuencia complementaria a la región superpuesta y adyacente al extremo 5' del ARN diana. El oligonucleótido de escisión puede tener su OH 3'-terminal apropiadamente modificado para evitar la reacción de extensión. Mientras que en algunas realizaciones de la invención podría usarse un oligonucleótido de escisión, se prefiere que un método de la invención se lleve a cabo en ausencia de un oligonucleótido de escisión, simplificando de esta manera la reacción de amplificación y los componentes necesarios.

40 Se apreciará que además de las actividades enzimáticas requeridas, también será necesario proporcionar trifosfatos de nucleótidos apropiados (para amplificaciones basadas en transcripción, trifosfatos de ribonucleótidos (rNTP, es decir, rATP, rGTP, rCTP y rUTP) y trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTP, es decir, dATP, dGTP, dCTP y dTTP) son necesarios), cebadores apropiados para la amplificación específica del ácido nucleico diana, un tampón adecuado para llevar a cabo la reacción de amplificación, y cualquier cofactor necesario (por ejemplo, iones de magnesio) requerido por las actividades enzimáticas. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen Tris-HCl, HEPES o tampón de acetato.

50 En consecuencia, las condiciones para la amplificación del ácido nucleico diana usadas en los métodos de la invención para probar la presencia de un ácido nucleico diana en una solución de muestra pueden comprender actividades enzimáticas requeridas para la reacción de amplificación autosostenida (por ejemplo, actividades enzimáticas de ADN polimerasa dependiente de ARN, ADN polimerasa dependiente de ADN, ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y ARN polimerasa dependiente de ADN), cofactores requeridos por las actividades enzimáticas (por ejemplo, iones de magnesio), cebadores para la amplificación específica del ácido nucleico diana, trifosfatos de nucleótidos apropiados (se requieren trifosfatos de ribonucleótidos y trifosfatos de desoxirribonucleótidos para las amplificaciones basadas en la transcripción). Las condiciones para la amplificación del ácido nucleico diana también deben incluir un tampón adecuado (tal como Tris-HCl, HEPES o tampón de acetato). Se puede proporcionar una sal adecuada, tales como cloruro de potasio o cloruro de sodio.

60 El experto en la materia puede determinar fácilmente las concentraciones adecuadas de estos componentes. Los presentes inventores han descubierto que las concentraciones adecuadas de rNTP están típicamente en el intervalo de 0,25-5 mM, preferentemente 0,5-2,5 mM. Las concentraciones de dNTP adecuadas suelen estar en el intervalo de 0,25-5 mM de dNTP, preferentemente 0,5-2,5 mM. Las concentraciones adecuadas de iones de magnesio están normalmente en el intervalo de 5-15 mM.

65 Aunque es posible que la reacción de amplificación autosostenida se lleve a cabo en el intervalo de temperatura de

entre 42 °C y 50 °C usando enzimas termoestables, el Solicitante ha apreciado que pueden usarse enzimas no termoestables en este intervalo de temperatura (siempre que la enzima no termoestable retenga la actividad entre 42 y 50 °C). La expresión "enzima termoestable" se usa en el presente documento para referirse a una enzima con actividad enzimática óptima a 50 °C o más. Normalmente una enzima termoestable mantiene su actividad a temperaturas al menos en exceso de 55 °C y hasta aproximadamente 72 °C o más. Una "enzima no termoestable" tiene una actividad enzimática óptima por debajo de 50 °C, adecuadamente en el intervalo de temperatura de 37-41 °C (aunque la enzima no termoestable aún puede retener la actividad a 50 °C o más). En consecuencia, en determinadas realizaciones de la invención, al menos una de las actividades enzimáticas (por ejemplo, la actividad de ARN polimerasa dependiente de ADN) se proporciona por una enzima no termoestable. En algunas realizaciones, todas las actividades enzimáticas usadas para la reacción de amplificación pueden proporcionarse por enzimas no termoestables. Se prefiere el uso de enzimas no termoestables porque esto permite que la reacción de amplificación se desarrolle de manera eficiente a una temperatura entre 42 °C y 50 °C. Las enzimas termoestables generalmente tienen una actividad óptima a temperaturas por encima de este intervalo.

Algunos métodos convencionales de amplificación basados en la transcripción usan cantidades muy altas de ARN polimerasa T7 (por ejemplo, 142 o más unidades, donde una unidad incorpora 1 nmol de nucleótido marcado en material insoluble en ácido en 1 hora a 37 °C en condiciones de ensayo convencionales, tales como: Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), NaCl 50 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 5 mM, rNTP 400 µM, [³H]-UTP 400 µM (30 cpm/pmoles), ADN T7 20 µg/ml, BSA 50 µg/ml, volumen de reacción de 100 µl, 37 °C, 10 min). Los presentes inventores han descubierto que los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo usando significativamente menos ARN polimerasa T7 que los métodos convencionales, reduciendo de esta manera el coste. Por lo tanto, los métodos descritos en el presente documento se llevan a cabo preferentemente usando menos de 142 unidades de una ARN polimerasa dependiente de ADN (por ejemplo, ARN polimerasa T7), adecuadamente menos de 100 unidades o menos de 50 unidades, tal como 30-40 unidades.

Puede ser deseable incluir uno o más agentes que puedan facilitar o mejorar la reacción de amplificación autosostenida a temperaturas entre 42 °C y 50 °C. Un agente puede facilitar o potenciar la reacción por cualquier mecanismo, pero normalmente el agente no es esencial para que tenga lugar la reacción, y puede que no participe directamente en la reacción. Algunos de estos agentes puede actuar ayudando a estabilizar la actividad de una enzima requerida para la reacción de amplificación autosostenida entre 42 °C y 50 °C, o reduciendo el efecto de cualquier inhibidor de la reacción de amplificación autosostenida que pueda estar presente.

Los ejemplos de agentes adecuados incluyen los siguientes:

- i) una proteína inerte. La expresión "proteína inerte" se usa en el presente documento para referirse a una proteína que no toma parte en la reacción de amplificación. Los ejemplos adecuados incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína, gelatina o lisozima. Un intervalo de concentración adecuado de la proteína inerte es 0,01-1 µg/µl. La proteína debe estar libre de RNasa;
- ii) un agente reductor, tales como ditioneitol (DTT) (por ejemplo, a una concentración de 1-5 mM) o n-acetilcisteína (NAC) (por ejemplo, a una concentración de 0,1-1 M);
- iii) un polímero anfífilo inerte (que no es una proteína). La expresión "polímero anfífilo inerte" se usa en el presente documento para referirse a un polímero anfífilo que no toma parte en la reacción de amplificación. El polímero anfífilo inerte puede no estar cargado. Algunos ejemplos de polímeros anfífilos inertes son la polivinilpirrolidona (PVP) y el polietilenglicol (PEG) u otros políoles similares. Un intervalo de concentración adecuado del polímero anfífilo inerte es 0,1-2 %;
- iv) un alcohol de azúcar, por ejemplo sorbitol, manitol o glicerol (por ejemplo, hasta el 5 % de glicerol). Un intervalo de concentración adecuado es 0,1-2 M;
- v) un sacárido de bajo peso molecular, adecuadamente un monosacárido, disacárido o trisacárido. Algunos ejemplos de disacáridos son trehalosa, sacarosa y maltosa. Un intervalo de concentración adecuado es el 2,5 %-15 %;
- vi) ácido nucleico homopolimérico (200-2000 bases). Los ejemplos incluyen: ácido nucleico Poli A, Poli C o Poli U (por ejemplo, a 100-600 ng/amplificación); poli dA, poli dC o poli dI (por ejemplo a 100-600 ng/amplificación); ARNt; ARNr;
- vii) sales de acetato, por ejemplo acetato de magnesio o potasio;
- viii) espermidina, por ejemplo a 0,5-3 mM;
- ix) poli-lisina, por ejemplo a 0,2-3 mM;
- x) detergente, por ejemplo, NP40 o Tween20 (adecuadamente al 0,01-0,5 %).

La concentración de cada uno de los agentes anteriores puede optimizarse para cada ácido nucleico diana y conjunto de cebadores diferentes usados para la amplificación.

Otros agentes pueden actuar facilitando la hibridación del cebador o facilitando la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario. En consecuencia, puede desearse alternativa o adicionalmente incluir en la reacción de amplificación uno o más agentes que faciliten la hibridación del cebador y/o uno o más agentes que faciliten la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario.

Algunos ejemplos de agentes que facilitan la hibridación de los cebadores son los iones cargados positivamente, tales como los iones de potasio o sodio. El ion potasio puede proporcionarse por cloruro o acetato potásico (adecuadamente a una concentración de 30-200 mM o 30-90 mM). El ion sodio puede proporcionarse por cloruro o acetato sódico (adecuadamente a una concentración de 50-400 mM).

5

Algunos ejemplos de agentes que facilitan la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario son:

- 10 i) disolventes apróticos polares, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo, a una concentración del 3-20 % (v/v), o menos del 10 % (v/v). Se ha descubierto que cuando la amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo en el intervalo de temperatura de entre 42 y 50 °C, la cantidad de disolvente aprótico polar requerida para tener un efecto es menor que la cantidad requerida a temperaturas más bajas. Los disolventes apróticos polares alternativos que pueden usarse incluyen tetrametilen sulfona o tetrametilen sulfóxido;
- 15 ii) un compuesto zwitteriónico, tales como betaína (N, N, N-trimetilglicina), por ejemplo, a una concentración de 0,2-3 M. Puede usarse betaína en lugar de DMSO. Una ventaja de la betaína es que es más estable que el DMSO y no parece inhibir la liofilización. En consecuencia, el uso de betaína en lugar de DMSO puede ser adecuado cuando se usan reactivos liofilizados para la reacción de amplificación. En algunas circunstancias, sin embargo, puede ser deseable el uso de betaína y DMSO ya que se han observado efectos sinérgicos de estos reactivos en la desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios. Los compuestos zwitteriónicos alternativos que pueden usarse incluyen monometilglicina, dimetilglicina, D-carnitina, homoectoína, L-ectoína o derivados;
- 20 iii) un nucleótido trifosfato modificado (NTP) que comprende una base que puede aparearse con guanina o citosina de tal manera que la temperatura de fusión del par de bases sea menor que la temperatura de fusión de un par de bases guanina-citosina. Un ejemplo de un NTP modificado es el trifosfato de inosina (rITP). Un par de bases de inosina-citosina (I-C) comprende dos enlaces de hidrógeno entre las bases, en comparación con un par de bases guanina-citosina (G-C) que comprende tres enlaces de hidrógeno, por lo que la temperatura de fusión del par de bases I-C es menor que la de un par de bases G-C. Por ejemplo, rITP puede estar presente en la reacción de amplificación a una concentración de 0,5-4 mM o de 0,5-3,5 mM. Cuando rITP está presente, la cantidad de rGTP en la reacción de amplificación puede reducirse en comparación con las cantidades de los otros trifosfatos de ribonucleótidos (rATP, rCTP, rUTP) para compensar la cantidad de rITP. La proporción de rITP:rGTP dependerá del ácido nucleico diana y de los cebadores que se usan. Una proporción típica es de 1:3 a 1:1,5 rITP:rGTP; iv) una proteína de unión a ácido nucleico monocatenario, tal como la proteína de unión monocatenaria (SSB, por sus siglas en inglés) o la proteína del gen 32 del Fago T4. SSB y la proteína del gen 32 del fago T4 se unen a regiones de ADN monocatenario y, por lo tanto, inhiben la formación de ADN bicatenario o híbridos ADN/ARN.

35 Otros agentes pueden mejorar la especificidad de la reacción de amplificación. En consecuencia, puede desearse alternativa o adicionalmente incluir uno o más de dichos agentes en la reacción de amplificación.

Ejemplos de agentes que pueden mejorar la especificidad de la reacción de amplificación son:

- 40 i) iones amonio, tales como cloruro de tetrametilamonio (TMAC). Se cree que los iones amonio interfieren con la formación de enlaces de hidrógeno débiles y crean condiciones de hibridación más estrictas y específicas;
- 45 ii) EDTA, EGTA, ácido nitrioacético (NTA), ácido uramil diacético (UDA), ácido trans-1,2-ciclohexanodiaminotetraacético (CyDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA), ácido etilenglicolbis(2-aminoetil)éter diaminotetraacético (GEDTA), ácido trietilentetraminohexaacético (TTHA) o una sal de los mismos. Se cree que estos compuestos mejoran la relación señal/ruido de las reacciones de amplificación al inhibir significativamente la aparición de reacciones de amplificación no específicas;
- 50 iii) ácido nucleico vehiculo con una o más sales de magnesio. Se cree que esto reduce la extensión de polimerasa de ácidos nucleicos no diana durante la amplificación a través de una reducción en la cantidad de formación de dímero de cebador.

En los métodos de amplificación convencionales basados en la transcripción, generalmente es necesario llevar a cabo una incubación inicial de la muestra que contiene el ácido nucleico diana a una temperatura elevada antes de enfriar la muestra. Esto reduce la estructura secundaria en el ácido nucleico diana y permite que los cebadores para su uso en la reacción de amplificación se hibriden con el ácido nucleico diana. A menos que se usen enzimas que retengan la actividad después de la incubación a temperatura elevada, esta etapa de incubación inicial se lleva a cabo antes de la adición de las enzimas requeridas para la reacción de amplificación.

60 Se ha descubierto, sin embargo, que llevar a cabo la reacción de amplificación autosostenida a una temperatura entre 42 °C y 50 °C no requiere llevar a cabo una etapa preliminar de incubación a temperatura elevada. En consecuencia, los métodos descritos en el presente documento se simplifican en comparación con los métodos de amplificación basados en la transcripción convencionales y pueden llevarse a cabo más rápidamente que dichos métodos. Estas son ventajas particularmente importantes para las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que se llevan a cabo en el campo.

65 Por supuesto, en algunas circunstancias, puede no obstante ser deseable llevar a cabo una etapa de preincubación a temperatura elevada. Si el ácido nucleico diana es ADN bicatenario, normalmente será necesario desnaturalizar la

diana antes de llevar a cabo la reacción de amplificación. El ADN bicatenario puede desnaturalizarse mediante métodos químicos bien conocidos por los expertos en la materia o, alternativamente, mediante desnaturalización a temperatura elevada.

5 Una vez realizada la reacción de amplificación, normalmente se deseará detectar el producto de la reacción de amplificación (denominado "producto de amplificación" a continuación). Puede detectarse un producto de amplificación monocatenario o bicatenario. Por ejemplo, puede detectarse el producto de amplificación bicatenario producido durante la fase cíclica de la reacción de amplificación autosostenida ilustrada en la Figura 1 y descrita anteriormente. Si se detecta un producto de amplificación monocatenario, se elimina cualquier requisito de separación de los bicatenarios y, por lo tanto, se simplifica la detección.

10 La detección del producto de amplificación puede llevarse a cabo usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede usarse un método de detección independiente del instrumento, por ejemplo permitiendo la detección visual del producto de amplificación.

15 De acuerdo con realizaciones particulares de la invención el producto de amplificación puede detectarse usando una tira reactiva. En métodos adecuados de detección con tira reactiva, el producto de amplificación se transporta a lo largo de una tira reactiva por acción capilar a una zona de captura de la tira reactiva y se detecta en la zona de captura. El producto de amplificación puede capturarse y detectarse usando un ensayo de detección de tira reactiva de ácido nucleico tipo sándwich en el que el producto de amplificación se inmoviliza en la zona de captura de la tira reactiva mediante hibridación con una sonda de captura, y se detecta en la zona de captura mediante hibridación con una sonda de detección.

20 Los métodos de detección de ácido nucleico mediante ensayo con tira reactiva son conocidos por el experto en la materia. El Solicitante ha desarrollado métodos particularmente sensibles de detección con tiras reactivas, que se describen en el documento WO 02/004667, el documento WO 02/04668, el documento WO 02/004669, el documento WO 02/04671 y en Dineva et al (Journal of Clinical Microbiology, 2005, Vol. 43 (8): 4015-4021).

25 Es bien sabido que una desventaja de las reacciones convencionales de amplificación de ácidos nucleicos es el riesgo de contaminación del ácido nucleico diana con ácido nucleico no diana que puede dar lugar a falsos positivos. Convencionalmente, el riesgo de contaminación en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se minimiza realizando las reacciones en laboratorios que usan s dedicadas separadas para la preparación de muestras, amplificación de ácidos nucleicos y detección de ácidos nucleicos amplificados. Se apreciará, sin embargo, que esto no es posible cuando las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se llevan a cabo fuera de dichas instalaciones (por ejemplo, en el campo, en el consultorio de un médico, en casa, en áreas remotas o en países en desarrollo donde las instalaciones especializadas pueden no estar disponibles).

30 El Solicitante ha apreciado que cuando una reacción de amplificación de ácido nucleico se lleva a cabo fuera de las instalaciones de un laboratorio especializado, el riesgo de contaminación puede reducirse realizando la reacción de amplificación en una cámara de procesamiento que esté sellada del ambiente externo. La reacción de amplificación de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo de acuerdo con un método de la invención. A continuación, la detección del producto de amplificación puede llevarse a cabo en una cámara de análisis que también está sellada del entorno externo.

35 La cámara de procesamiento y la cámara de análisis pueden proporcionarse por un dispositivo. El dispositivo puede precargarse con los reactivos (preferentemente en forma liofilizada) necesarios para la amplificación del ácido nucleico diana (incluidas las actividades enzimáticas) y/o la detección del producto de amplificación.

40 El riesgo de contaminación de otras muestras con el producto de amplificación puede reducirse mediante el tratamiento del producto de amplificación con agentes modificadores o hidrolizantes de ácidos nucleicos que impidan su posterior amplificación. Un tratamiento adecuado es el tratamiento químico que modifica y degrada el ácido nucleico, por ejemplo, la degradación no enzimática de ácido nucleico por nucleasas químicas. Algunos ejemplos de nucleasas químicas son complejos de quelatos de metales divalentes, tales como la escisión de cobre fenantrolina-Cu (II) o ascorbato-Cu (II), como se describe por Sigman et al (J. Biol. Chem (1979) 254, 12269-12272) y Chiou (J. Biochem (1984) 96, 1307-1310). Como alternativa, una base que no está naturalmente presente en el ácido nucleico diana puede incorporarse al producto de amplificación. Por ejemplo, El dUTP puede usarse para incorporar uracilo en un producto de amplificación de ADN (como se describe en el documento US 5.035.996). Si, antes de la amplificación, se añade uracilo ADN glicosilasa (UDG) después a una muestra que puede haber sido contaminada con dicho producto de amplificación de ADN esto provocará la hidrólisis enzimática de cualquier producto de amplificación contaminante (que contenga uracilo) sin afectar el ADN natural de la muestra.

45 Los reactivos necesarios para la amplificación del ácido nucleico diana y/o la detección del producto de amplificación pueden proporcionarse en forma liofilizada. La liofilización mejora la estabilidad de los reactivos, permitiéndoles de esta manera ser almacenados durante períodos más largos a temperaturas más altas. La liofilización también reduce el peso y el volumen de los reactivos para que sean más fáciles de transportar. El uso de reactivos liofilizados es, por lo tanto, ventajoso para llevar a cabo métodos de la invención en el campo.

El solicitante ha desarrollado formulaciones de liofilización (es decir, formulaciones adecuadas para la liofilización) que (una vez liofilizadas) pueden mantener los reactivos en condiciones estables a temperaturas de hasta 37 °C durante al menos un año. Esto elimina cualquier requisito de almacenamiento en frío o transporte en cadena de frío de los reactivos. Las formulaciones también tienen la ventaja de que pueden rehidratarse rápidamente después de la liofilización. Esta es una propiedad particularmente deseable de las formulaciones liofilizadas usadas para las pruebas de ácido nucleico en el campo, ya que la velocidad o la precisión de una prueba pueden verse afectadas negativamente si un reactivo necesario para la amplificación de un diana de ácido nucleico o la detección de un producto de amplificación no se rehidrata fácilmente durante el método de amplificación o detección.

10 En el presente documento se describe una formulación de liofilización que comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y, opcionalmente, un reactivo lábil que se desea conservar en un estado estable.

15 El término "reactivo lábil" se usa aquí para incluir cualquier reactivo que sea susceptible de alteración o degradación cuando se almacena en solución acuosa a temperatura ambiente. Los ejemplos de reactivos lábiles incluyen: biomoléculas, tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o derivados de los mismos, o productos químicos como cofactores enzimáticos, sustratos de enzimas, trifosfatos de nucleótidos (trifosfatos de ribo- o desoxirribonucleótidos) o sales. Los ejemplos de proteínas incluyen enzimas (por ejemplo, polimerasas, como ADN o ARN polimerasas) y anticuerpos (nativos o recombinantes y fragmentos o derivados de los mismos que conservan la actividad de unión a antígeno). Un anticuerpo (o fragmento o derivado) puede estar presente en la formulación en ausencia de un antígeno unido por el anticuerpo. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN, cebadores de ácido nucleico y ácido nucleico vehículo.

20 El reactivo lábil puede ser un reactivo de amplificación para amplificar un ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante una reacción de amplificación autosostenida) o un reactivo de detección para detectar el producto resultante de la amplificación del ácido nucleico diana.

25 El reactivo de amplificación puede ser cualquier reactivo necesario para la amplificación de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, el reactivo de amplificación puede comprender una actividad enzimática o un cebador. La actividad enzimática puede, por ejemplo, ser una ADN o ARN polimerasa, tal como una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica doble de ADN/ARN o una polimerasa de ARN dependiente de ADN.

30 En una realización de la invención, una formulación de liofilización de la invención comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana (por ejemplo, usando un método de la invención) en ausencia de cofactor o cofactores enzimáticos (por ejemplo, iones de magnesio), cebadores, rNTP y dNTP necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana.

35 Las actividades enzimáticas comprenden actividades enzimáticas ADN polimerasa dependiente de ARN, ADN polimerasa dependiente de ADN, ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y ARN polimerasa dependiente de ADN.

40 Se apreciará que los métodos descritos en este documento pueden llevarse a cabo en presencia de un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular (por ejemplo, como resultado de la provisión de reactivos necesarios para la amplificación del ácido nucleico diana con una formulación liofilizada de la invención).

45 Algunos ejemplos de polisacáridos adecuados son almidón, un dextrano o un derivado de un dextrano (por ejemplo, sulfato de dextrano). El peso molecular del polisacárido está normalmente en el intervalo de aproximadamente 10-200 kDa, habitualmente 50-100 kDa. El polisacárido puede ser lineal o ramificado.

50 El sacárido de bajo peso molecular puede ser un monosacárido, disacárido o trisacárido. Los ejemplos de disacáridos adecuados incluyen trehalosa, sacarosa y maltosa. Se ha descubierto que las velocidades de rehidratación de las formulaciones de la invención que incluyen trehalosa son particularmente rápidas. Se ha descubierto que la inclusión de trehalosa en formulaciones liofilizadas de la invención que comprenden una enzima mantiene la actividad de la enzima durante períodos prolongados cuando se almacena a temperaturas de hasta 37 °C.

El sacárido de bajo peso molecular puede estar presente en una cantidad del 2,5-15 % (p/v) de la formulación.

60 El polisacárido y el sacárido de bajo peso molecular pueden estar presentes en una cantidad del 4-12 % (p/v) de la formulación.

Una formulación de liofilización descrita en el presente documento puede comprender además una proteína inerte tales como BSA o caseína. BSA se puede obtener fácilmente como una preparación libre de RNasa.

65 Una formulación de liofilización descrita en el presente documento puede comprender además un alcohol de azúcar.

También se proporciona de acuerdo con la invención una formulación de liofilización descrita en el presente documento que se ha liofilizado (denominada formulación liofilizada de la invención). Los métodos de liofilización son conocidos para aquellos expertos en la materia. Un método adecuado se describe en el Ejemplo 3 a continuación.

Las formulaciones liofilizadas de la invención pueden mantener los reactivos lábiles en condiciones estables a temperaturas de 37 °C durante al menos un año (las Figuras 5 y 6 muestran que se obtiene una intensidad de señal del 100 % después del almacenamiento a 37 °C durante un año). Por el contrario, las formulaciones liofilizadas descritas en el documento US 5.556.771 muestran una pérdida de actividad después del almacenamiento a 35 °C durante 61 días (la Tabla 4 del documento US 5.556.771 muestra que las unidades relativas de luz (URL) promedio para los "Reactivos con diana de ADN" a los 61 días es el 90,9 % de las URL promedio a 0 días). Las instrucciones proporcionadas con el SmartMix™ HM de Cepheid (un kit que comprende reactivos liofilizados para amplificaciones por PCR) especifica que los reactivos liofilizados deben almacenarse a 2-8 °C. Las instrucciones proporcionadas con los reactivos de amplificación del kit Nuclisens® Basic Kit Amplification Reagents disponibles en el mercado de Biomérieux (un kit que contiene reactivos liofilizados para la amplificación de ácidos nucleicos basados en NASBA) especifican que los reactivos de amplificación deben almacenarse a ≤-20 °C. Las instrucciones proporcionadas con el kit GEN-PROBE® APTIMA® General Purpose Reagents (GPR) 250 disponible en el mercado (que comprende reactivos liofilizados para llevar a cabo la amplificación mediada por transcripción) especifica que los reactivos liofilizados deben almacenarse a 2-8 °C. Las formulaciones liofilizadas de la invención no necesitan refrigeración.

El Solicitante ha descubierto sorprendentemente que las formulaciones liofilizadas de la invención que comprenden una enzima (por ejemplo, una enzima o una combinación de enzimas necesarias para llevar a cabo un método de la invención) son capaces de mantener la enzima o enzimas en una condición estable incluso en la ausencia de (o con poco, por ejemplo, <1 mM) agente tamponante para la enzima o enzimas. Esto tiene la ventaja de que se simplifican las formulaciones de enzimas liofilizadas. También puede ser ventajoso que otras formulaciones liofilizadas que comprendan reactivos lábiles además de enzimas incluyan poco o ningún agente tamponante.

Por lo tanto, se describe en el presente documento una formulación liofilizada (o liofilización) que comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y un reactivo lábil que se desea conservar en un estado estable, en donde la formulación no incluye un agente tamponante, o el agente tamponante está presente en una concentración de menos de 1 mM.

La expresión "agente tamponante" se usa para referirse a un agente que tiende a mantener una solución dentro de un intervalo de pH deseado (por ejemplo, un intervalo de pH en donde una enzima retiene la actividad). Normalmente, se usa un ácido débil o una base débil. Los ejemplos de agentes tamponantes usados para las reacciones de amplificación basadas en la transcripción incluyen tampones basados en Tris (por ejemplo, Tris-HCl), HEPES y tampones basados en acetato. Los agentes tamponantes de fosfato no se usan para las reacciones de amplificación basadas en la transcripción porque inhiben la reacción de amplificación.

También se describe en el presente documento una formulación liofilizada para su uso en un método de la invención, que comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y un reactivo lábil requerido para llevar a cabo un método de la invención que se desea conservar en una condición estable, en donde la formulación no incluye uno o más agentes tamponantes requeridos para el método o el agente tamponante está presente en una concentración menor que la requerida por el método. Si el agente tamponante está presente, es preferible que sea a una concentración de menos del 25 %, preferentemente de menos del 10 %, de la requerida para el método, o menos de 1 mM.

El reactivo lábil puede ser un reactivo de amplificación para amplificar el ácido nucleico diana o un reactivo de detección para detectar el producto resultante de la amplificación del ácido nucleico diana.

En determinadas realizaciones, el reactivo lábil comprende una enzima o enzimas (por ejemplo, una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN). Dado que la cantidad de sustrato enzimático y cualquier cofactor requerido para la actividad de la enzima o enzimas puede variar con diferentes combinaciones de cebador/plantilla, se prefiere que dichas formulaciones no incluyan sustratos o cofactores para la enzima o enzimas. También se prefiere que tales formulaciones no incluyan sal (por ejemplo, KCl, NaCl) ya que esto nuevamente puede variar con diferentes combinaciones de cebador/plantilla.

En otras realizaciones, el reactivo lábil comprende cebadores para la amplificación específica del ácido nucleico diana usando un método de la invención. Dichas formulaciones preferentemente comprenden además nucleótidos y/o un cofactor enzimático requerido para el método.

Los presentes inventores también han descubierto que las formulaciones liofilizadas de la invención pueden rehidratarse rápidamente sin necesidad de un tampón de reconstitución especializado. Se ha descubierto que las formulaciones liofilizadas conocidas, por ejemplo, aquellas descritas en el documento US 5.556.771, o reactivos liofilizados disponibles en el mercado (de BioMérieux, Gen-Probe, Cepheid), no se reconstituyen rápidamente, sino

que requieren una mezcla extensa en tampones de reconstitución especialmente formulados. Las instrucciones proporcionadas con el kit Nuclisens® Basic Kit Amplification Reagents mencionado anteriormente especifican que debe añadirse diluyente de enzima a la esfera de enzima liofilizada y dejarla durante al menos 20 minutos a temperatura ambiente. Las instrucciones proporcionadas con el kit SmartMix™ HM mencionado anteriormente especifican que las perlas liofilizadas se rehidratan después de añadir agua usando un vórtex. Por el contrario, las formulaciones liofilizadas de la invención se reconstituyen rápidamente (generalmente en menos de 10 segundos en agua u otro líquido, tal como el extracto de ácido nucleico) sin ningún requisito de agitación con vórtex.

También se proporciona de acuerdo con la invención un kit que comprende una pluralidad de formulaciones liofilizadas diferentes, separadas, en donde cada formulación liofilizada comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y un reactivo lábil que se desea conservar en un estado estable.

Un kit de la invención comprende los reactivos necesarios para la amplificación y, opcionalmente, la detección de un ácido nucleico diana. Los reactivos incluyen actividades enzimáticas necesarias para la amplificación de un ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación autosostenida. Un kit de la invención puede ser para la amplificación de un ácido nucleico diana usando un método de la invención.

En los kits de la invención que comprenden las actividades enzimáticas necesarias para la amplificación de un ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación autosostenida, las actividades enzimáticas están en una formulación liofilizada separada de los cebadores, trifosfatos de ribonucleótidos y trifosfatos de desoxirribonucleótidos (y cualquier cofactor enzimático) necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana.

Un kit de la invención comprende: i) una primera formulación liofilizada, que incluye una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN; y ii) una segunda formulación liofilizada, que incluye cebadores para la amplificación específica de un ácido nucleico diana, trifosfatos de ribonucleótidos para la síntesis de ARN por la ARN polimerasa dependiente de ADN y trifosfatos de desoxirribonucleótidos para la síntesis de ADN por la polimerasa dependiente de ARN o ADN, en donde cada formulación liofilizada comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y un reactivo lábil que se desea conservar en un estado estable y en donde la primera formulación liofilizada no incluye cofactor o cofactores enzimáticos, cebadores, rNTP y dNTP necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana.

La ADN polimerasa dependiente de ARN y la ADN polimerasa dependiente de ADN pueden proporcionarse por una transcriptasa inversa, tal como la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) o el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). La ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN puede proporcionarse por la RNasa H, tal como la RNasa H de *E. coli* o por la actividad RNasa H de la transcriptasa inversa AMV o la transcriptasa inversa MMLV. La ARN polimerasa dependiente de ADN puede proporcionarse por la ARN polimerasa T7. Cuando se usa la transcriptasa inversa AMV o MMLV, una enzima separada (por ejemplo, la RNasaH de *E. coli*) puede proporcionar actividad adicional de ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN, como en NASBA convencional, o la actividad puede proporcionarse únicamente por la AMV-RT o MMLV-RT.

Un cofactor o cofactores enzimáticos (tales como los iones de magnesio) requeridos por las actividades enzimáticas para la amplificación del ácido nucleico diana pueden proporcionarse como un componente separado del kit o en la segunda formulación liofilizada.

El Solicitante ha descubierto que una enzima almacenada en una formulación liofilizada de la invención puede permanecer estable durante largos períodos a temperaturas de 37 °C incluso si la formulación no incluye ningún reactivo (por ejemplo, cofactores o sustratos) necesarios para la amplificación de un ácido nucleico diana usando la enzima. A menudo, la combinación óptima de reactivos de amplificación variará según el ácido nucleico diana y los cebadores particulares que se usen. El solicitante ha apreciado que si los reactivos de amplificación se liofilizan por separado de las enzimas, entonces puede usarse una formulación de enzima liofilizada de la invención con cualquier ácido nucleico diana y combinaciones de cebador (es decir, como una formulación liofilizada universal). Dado que la cantidad de sal usada también puede variar con diferentes combinaciones de cebadores y ácidos nucleicos diana, también puede preferirse excluir la sal de tales formulaciones.

Por lo tanto, la primera formulación liofilizada puede no incluir ningún reactivo de amplificación (incluyendo sustratos o cofactores) requerido por las actividades enzimáticas para la amplificación del ácido nucleico diana. La primera formulación liofilizada también puede no incluir ninguna sal.

Las actividades transcriptasa inversa, ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y ARN polimerasa dependiente de ADN pueden proporcionarse cada una por enzimas separadas (aunque la transcriptasa inversa también puede incluir actividad de ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN, por ejemplo AMV-RT). Se ha descubierto que esto reduce la complejidad de la mezcla de amplificación requerida para proporcionar actividades enzimáticas óptimas en el intervalo de temperatura de entre 42 y 50 °C en comparación, por ejemplo, con el uso de enzimas (tales como transcriptasa inversa de MMLV) que comprenden actividades transcriptasa inversa y RNasa H

(sin una enzima adicional con actividad de ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN).

Un kit de la invención para llevar a cabo un método de la invención puede comprender además un agente para facilitar o mejorar la reacción de amplificación autosostenida, por ejemplo, cualquiera de los agentes listados anteriormente. El agente puede formar un componente separado del kit, o el agente puede estar en la primera o segunda formulación liofilizada.

Un kit de la invención para llevar a cabo un método de la invención puede comprender además un agente que facilita la hibridación del cebador, por ejemplo, iones potasio o sodio. El agente puede formar un componente separado del kit, o el agente puede estar en la primera o segunda formulación liofilizada.

Un kit de la invención para llevar a cabo un método de la invención puede comprender además un agente que facilita la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario durante la reacción de amplificación, por ejemplo trifosfato de inosina. El agente puede formar un componente separado del kit, o el agente puede estar en la primera o segunda formulación liofilizada.

Un kit de la invención para llevar a cabo un método de la invención puede comprender además un agente que mejora la especificidad de la reacción de amplificación. El agente puede formar un componente separado del kit, o el agente puede estar en la primera o segunda formulación liofilizada.

Puede ser deseable, sin embargo, que un disolvente aprótico polar, tal como DMSO, no se incluya como parte de una formulación de liofilización (o liofilizado) de la invención ya que esto puede afectar negativamente a la liofilización. Como se ha explicado anteriormente, un compuesto zwitteriónico, tal como betaína, puede usarse en lugar de DMSO ya que la betaína no parece inhibir la liofilización.

Se ha descubierto que altas concentraciones de azúcar-alcohol tal como manitol pueden dificultar la rehidratación de una formulación liofilizada de la invención. En consecuencia, puede desearse que si se incluye un alcohol de azúcar en una formulación de liofilización (o liofilizada) de la invención, esté presente en menos del 7,5 % (p/v), menos del 5 % (p/v), o menos del 3 % (p/v). Como alternativa, un alcohol de azúcar puede excluirse de una formulación de la invención.

La primera formulación liofilizada puede comprender además una proteína inerte.

La segunda formulación liofilizada puede comprender un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular, opcionalmente un alcohol de azúcar, y cualquiera (o todos) de los siguientes: un agente reductor; iones cargados positivamente; un cofactor enzimático (por ejemplo, iones magnesio) requerido para la actividad de las enzimas de amplificación.

Un kit de la invención puede comprender además: iii) una tercera formulación liofilizada, que incluye un reactivo de detección para detectar el producto de amplificación y, opcionalmente, iv) una cuarta formulación liofilizada, que incluye un reactivo de marcaje para marcar el reactivo de detección, en donde cada formulación liofilizada diferente comprende un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular.

Un kit puede comprender: i) una primera formulación liofilizada, que incluye un reactivo de detección para detectar el ácido nucleico diana o el producto resultante de la amplificación del ácido nucleico diana; y opcionalmente ii) una segunda formulación liofilizada, que incluye un reactivo de marcaje para marcar el reactivo de detección.

El reactivo de detección puede ser cualquier reactivo adecuado para la detección del producto de amplificación o del ácido nucleico diana. El reactivo de detección puede comprender una sonda de detección que se hibrida con el producto de amplificación o el ácido nucleico diana. El reactivo de detección puede estar en sí mismo marcado (con uno o más marcadores), permitiendo de esta manera la detección directa del producto de amplificación o del ácido nucleico diana utilizando el reactivo de detección. Como alternativa, se puede proporcionar un reactivo de marcaje (que comprende uno o más marcadores) para unir el reactivo de detección, permitiendo de esta manera la detección indirecta del producto de amplificación o del ácido nucleico diana utilizando los reactivos de detección y de marcaje.

El marcador o marcadores del reactivo de detección (cuando esté marcado) o el reactivo de marcaje puede ser un marcador detectable visualmente. Los ejemplos de marcadores detectables visualmente incluyen partículas de sol de metal coloidal, partículas de látex o partículas de tinte textil. Un ejemplo de partículas de sol de metal coloidal son las partículas de oro coloidal.

El reactivo de detección puede ser una sonda de detección que se proporciona con una pluralidad de ligandos de detección (por ejemplo, biotina), cada uno de los cuales puede unirse a un reactivo marcador. Cada reactivo marcador puede comprender una pluralidad de restos de unión a ligandos de detección, siendo capaz cada resto de unión a ligando de detección de unirse a un ligando de detección del reactivo de detección. Un ejemplo de un reactivo de marcaje de este tipo es el oro coloidal conjugado con un anticuerpo antibiotina. Un ejemplo de sonda de detección y reactivo de marcaje es la sonda detectora y el conjugado de detección anti-hapteno coloreado,

respectivamente, descrito e ilustrado en Dineva et al (Journal of Clinical Microbiology, 2005, Vol. 43 (8): 4015-4021).

La detección del producto de amplificación puede tener lugar en tampón de hibridación convencional. Los ejemplos de tampones de hibridación estándar típicos incluyen un tampón Tris o fosfato que comprende sal (adecuadamente 100-400 mM), tensioactivo (tal como PVP) y un detergente.

Se ha descubierto que el ácido nucleico extraído en el tampón de elución usado en los procedimientos convencionales de extracción de ácido nucleico (generalmente un tampón de baja molaridad, tales como Tris, Tris-EDTA, Tris-HCl, o HEPES), o incluso agua, proporciona una solución de muestra adecuada para llevar a cabo un método de amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. En consecuencia, si se desea, se puede llevar a cabo un método de amplificación de ácidos nucleicos de la invención simplemente poniendo en contacto las actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida del ácido nucleico diana, cofactor o cofactores enzimáticos requeridos por las actividades enzimáticas, cebadores necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana, NTP requeridos (rNTP y dNTP para amplificaciones basadas en la transcripción) y (si corresponde) cualquiera de los agentes enumerados anteriormente (por ejemplo, poniendo en contacto la primera y segunda formulaciones liofilizadas proporcionadas en un kit de la invención), con el ácido nucleico extraído en tampón de elución (o agua) y calentando entre 42 y 50 °C. La detección del producto de amplificación (por ejemplo, como se describe anteriormente usando una tira reactiva) puede llevarse a cabo simplemente poniendo en contacto los reactivos de detección con la solución de muestra al final de la reacción de amplificación y poniendo en contacto la mezcla resultante con un extremo de contacto de la tira reactiva.

En un aspecto alternativo, se describe en el presente documento una composición para su uso en una reacción de amplificación autosostenida (por ejemplo, usando un método de la invención), comprendiendo la composición las actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana (por ejemplo, usando un método de la invención) y:

- i) un agente para facilitar o potenciar la reacción de amplificación autosostenida;
- ii) un agente que facilita la hibridación de los cebadores;
- iii) un agente que facilita la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario; o
- iv) un agente que mejora la especificidad de la reacción de amplificación autosostenida.

Los agentes (i)-(iv) pueden ser cualquiera de los agentes listados anteriormente.

Pueden usarse combinaciones de agentes, tales como: (i) + (ii); (i) + (iii); (i) + (iv); (ii) + (iii); (ii) + (iv); (iii) + (iv); (i) + (ii) + (iii); (i) + (ii) + (iv); o (i) + (iii) + (iv).

El uso de tales agentes puede mejorar la confiabilidad, robustez (por ejemplo a las fluctuaciones de temperatura), especificidad y/o sensibilidad de la reacción de amplificación. El solicitante ha descubierto sorprendentemente que el uso de una proteína inerte y un polímero anfífilo inerte (que no es una proteína) es particularmente eficaz.

La composición puede comprender las actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana (por ejemplo, usando un método de la invención), una proteína inerte y un polímero anfífilo inerte (que no es una proteína). La composición puede comprender además un agente que facilite la hibridación del cebador y/o un agente que facilite la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario y/o un agente que mejore la especificidad de una reacción de amplificación. El agente o agentes pueden ser cualquiera de los agentes listados anteriormente.

En otro aspecto, se describe en el presente documento una composición para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana (por ejemplo, usando un método de la invención), que comprende: actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana (por ejemplo, usando un método de la invención); cebadores para la amplificación específica del ácido nucleico diana; trifosfatos de nucleótidos necesarios para la extensión de los cebadores (los trifosfatos de desoxirribonucleótidos y los trifosfatos de ribonucleótidos son necesarios para la amplificación basada en la transcripción); y cualquiera de los siguientes agentes:

- i) un agente para facilitar o potenciar la reacción de amplificación autosostenida;
- ii) un agente que facilita la hibridación de los cebadores;
- iii) un agente que facilita la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario; o
- iv) un agente que mejora la especificidad de la reacción de amplificación autosostenida.

Los agentes (i)-(iv) pueden ser cualquiera de los agentes listados anteriormente.

De nuevo, pueden usarse combinaciones de agentes, tales como: (i) + (ii); (i) + (iii); (i) + (iv); (ii) + (iii); (ii) + (iv); (iii) + (iv); (i) + (ii) + (iii); (i) + (ii) + (iv); o (i) + (iii) + (iv). El uso de una proteína inerte y un polímero anfífilo inerte (que no es una proteína) es particularmente eficaz.

5 La composición para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana puede comprender: actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida del ácido nucleico diana; cebadores para la amplificación específica del ácido nucleico diana; trifosfatos de nucleótidos necesarios para la extensión de los cebadores (los trifosfatos de desoxirribonucleótidos y los trifosfatos de ribonucleótidos son necesarios para la amplificación basada en la transcripción); una proteína inerte; y un polímero anfífilo inerte (que no es una proteína).

10 La composición puede comprender además un agente que facilite la hibridación del cebador y/o un agente que facilite la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario y/o un agente que mejore la especificidad de una reacción de amplificación. El agente o agentes pueden ser cualquiera de los agentes listados anteriormente.

15 Las actividades enzimáticas de una composición descrita en el presente documento pueden ser: una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN.

20 Una composición descrita en el presente documento puede comprender además un tampón necesario para que las actividades enzimáticas lleven a cabo la amplificación del ácido nucleico diana en presencia de los cebadores, dNTP y rNTP. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen Tris-HCl, HEPES y tampones de acetato.

25 Una composición descrita en el presente documento puede comprender además cualquier cofactor necesario requerido por las actividades enzimáticas.

30 Una composición descrita en el presente documento puede comprender además un sacárido de bajo peso molecular y/o un alcohol de azúcar. Como alternativa, Una composición descrita en el presente documento puede comprender además un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular y/o un alcohol de azúcar. Esto puede ser particularmente adecuado si la composición está liofilizada.

35 Se apreciará que los componentes de una composición descrita en el presente documento pueden proporcionarse en forma de un kit en el que uno o más componentes de la composición están separados de los restantes componentes de la composición. La mezcla de los componentes separados proporciona entonces una composición descrita en el presente documento.

40 Las actividades enzimáticas necesarias para la amplificación del ácido nucleico diana pueden estar separadas de los cebadores, NTP y cualquier cofactor requerido por las actividades enzimáticas.

45 Por lo tanto, también se describe en el presente documento un kit para la amplificación de un ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación autosostenida (por ejemplo, llevada a cabo usando un método descrito en el presente documento), que comprende:

- 40 i) una primera composición que comprende las actividades enzimáticas necesarias para la amplificación del ácido nucleico diana mediante la reacción de amplificación autosostenida; y por separado
- ii) una segunda composición que comprende cebadores para la amplificación específica de un ácido nucleico diana, NTP requeridos para la extensión de los cebadores (se requieren trifosfatos de ribonucleótidos y trifosfatos de desoxirribonucleótidos para los métodos basados en la transcripción); y

45 cualquiera de los siguientes agentes:

- 50 a) un agente para facilitar o potenciar la reacción de amplificación autosostenida;
- b) un agente que facilita la hibridación de los cebadores;
- c) un agente que facilita la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario;
- d) un agente que mejora la especificidad de la reacción de amplificación autosostenida.

El agente o agentes pueden ser un componente adicional separado del kit o el agente o agentes pueden estar en la primera o segunda composición.

55 Los agentes (a)-(d) pueden ser cualquiera de los agentes listados anteriormente. La primera composición puede comprender una proteína inerte y/o la segunda composición puede comprender un agente reductor y/o un alcohol de azúcar o un sacárido de bajo peso molecular.

60 Las actividades enzimáticas pueden ser una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN.

65 El kit puede comprender además uno o más cofactores requeridos por las actividades enzimáticas. El cofactor o cofactores pueden proporcionarse como un componente separado del kit o con la primera o la segunda composición.

5 Un kit de la invención puede comprender además un tampón enzimático necesario para que las actividades enzimáticas lleven a cabo la amplificación del ácido nucleico diana en presencia de los cebadores, dNTP y rNTP. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen Tris-HCl, HEPES y tampones de acetato. El tampón enzimático puede proporcionarse como un componente separado del kit o con la primera o la segunda formulación o composición.

10 Para aquellas realizaciones de la invención en las cuales la detección del producto de amplificación se realice mediante tira reactiva, un kit de la invención puede comprender además una tira reactiva capaz de transportar una solución por capilaridad.

Un kit de la invención puede comprender además instrucciones para llevar a cabo un método de amplificación y/o detección de ácidos nucleicos usando el kit.

15 Puede desearse incluir con uno o más componentes separados de un kit de la invención un colorante. Por ejemplo, los componentes separados pueden comprender colorantes de diferentes colores para que las diferentes formulaciones o composiciones del kit puedan distinguirse fácilmente entre sí. Esto puede ayudar a reducir el riesgo de agregar formulaciones o composiciones a la solución de muestra en el orden incorrecto, o asegurar la carga previa correcta de un dispositivo para llevar a cabo un método de la invención. Los colorantes adecuados incluyen colorantes alimentarios o colorantes textiles. Estos deben añadirse a una concentración que no inhiba la amplificación o la detección. Por ejemplo, pueden usarse concentraciones del 0,2 %.

En general, será deseable incluir con una formulación o kit de la invención un inhibidor de RNasa.

25 Los componentes de un kit de la invención pueden proporcionarse en un dispositivo para llevar a cabo un método de amplificación de ácidos nucleicos y, opcionalmente, detección de ácido nucleico producto de la reacción de amplificación, estando el dispositivo precargado con los componentes.

30 Se ha descubierto que los métodos de la invención proporcionan una especificidad mejorada de la amplificación del ácido nucleico diana y un ruido de fondo reducido, en comparación con los métodos convencionales de amplificación autosostenida.

35 Los métodos de la invención son más sencillos y rápidos que los métodos convencionales y pueden llevarse a cabo sin el uso de instalaciones o instrumentos de laboratorio especializados. Los presentes inventores también han descubierto que los métodos de la invención son más tolerantes a las fluctuaciones de temperatura que los métodos convencionales de NASBA (algunos métodos de la invención son tolerantes a las fluctuaciones de temperatura de +/- 4 °C, en comparación con solo +/- 0,5 °C para NASBA convencional). En consecuencia, los métodos de la invención son particularmente adecuados para su uso en el campo, en el consultorio de un médico, en casa, en áreas remotas o en países en desarrollo donde las instalaciones y el equipo especializados pueden no estar disponibles.

40 Las formulaciones liofilizadas de la invención son estables durante largos períodos a temperatura ambiente y pueden usarse para proporcionar los reactivos necesarios para los métodos de la invención. Debido a que no es necesario almacenar las formulaciones liofilizadas a bajas temperaturas, ni transportarlas mediante transporte en cadena de frío, pueden proporcionarse kits para llevar a cabo métodos de la invención en el campo.

45 Los reactivos requeridos para los métodos de la invención pueden proporcionarse precargados en un dispositivo que comprende cámaras de procesamiento y análisis separadas que están selladas del entorno externo. Las cámaras están preferentemente dispuestas de modo que la muestra procesada (es decir, la muestra que se ha incubado en condiciones de amplificación en la cámara de procesamiento) pueda pasar a la cámara de análisis sin exposición al entorno externo. Dichos dispositivos reducen la contaminación de la reacción de amplificación y, por lo tanto, minimizan la posibilidad de resultados falsos positivos. Esto permite llevar a cabo reacciones de amplificación de ácidos nucleicos sin necesidad de áreas separadas designadas para la preparación de muestras, amplificación y detección, y facilita el uso de métodos de la invención en el campo.

50 En determinados aspectos de la invención, puede desearse llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico autosostenida a una temperatura que sea inferior al intervalo de entre 42 °C y 50 °C (por ejemplo, en el intervalo de 35-41 °C), pero aprovecha otros aspectos preferidos de la invención. Los aspectos preferidos pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes: uso de uno o más de los agentes que facilitan o mejoran la reacción de amplificación autosostenida, o que facilitan la hibridación o desnaturalización del cebador del ADN bicatenario, o que mejoran la especificidad de la reacción de amplificación; uso de las composiciones descritas o formulaciones liofilizadas de la invención para la reacción de amplificación; llevar a cabo la reacción de amplificación en presencia de un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular; realizar la reacción de amplificación en una cámara de procesamiento que está sellada del ambiente externo (y opcionalmente detectar el producto amplificado en una cámara de análisis sellada del ambiente externo); detectar producto amplificado utilizando marcadores detectables visualmente.

65

También se describe en el presente documento un cebador o sonda que comprende o consiste en una secuencia citada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 9.

5 Los cebadores o sondas descritos en el presente documento pueden tener una longitud de hasta 50, 40 o 30 nucleótidos.

En el presente documento se describe además un conjunto de cebadores que comprende un cebador con la secuencia enumerada en SEQ ID NO: 1 y un cebador con la secuencia enumerada en SEQ ID NO: 2.

10 En el presente documento se describe además un conjunto de cebadores y sondas que comprende: un cebador con la secuencia citada en SEQ ID NO: 1; un cebador con la secuencia citada en SEQ ID NO: 2; una sonda con la secuencia indicada en SEQ ID NO: 3; una sonda con la secuencia indicada en SEQ ID NO: 4; y una sonda con la secuencia indicada en SEQ ID NO: 5.

15 El conjunto puede usarse para amplificación y/o detección de ARN de VIH-1.

En el presente documento se describe además un conjunto de cebadores que comprende un cebador con la secuencia enumerada en SEQ ID NO: 6 y un cebador con la secuencia enumerada en SEQ ID NO: 7.

20 En el presente documento se describe además un conjunto de cebadores y sondas que comprende: un cebador con la secuencia citada en SEQ ID NO: 6; un cebador con la secuencia citada en SEQ ID NO: 7; una sonda con la secuencia indicada en SEQ ID NO: 8; y una sonda con la secuencia indicada en SEQ ID NO: 9.

El conjunto puede usarse para amplificación y/o detección de ARN de *Chlamydia trachomatis*.

25 Las realizaciones de la invención se describen en los siguientes ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

30 La Figura 1 muestra esquemáticamente las etapas en la amplificación basada en la transcripción de un ARN diana;

La Figura 2 ilustra las etapas de un método de acuerdo con una realización de la invención;

La Figura 3 muestra los resultados de la amplificación y detección del ARN del VIH usando un método de acuerdo con una realización de la invención;

35 La Figura 4 muestra los resultados de la amplificación y detección del ARN de *Chlamydia trachomatis* usando un método de acuerdo con una realización de la invención

La Figura 5 muestra los resultados de la amplificación y detección del ARN del VIH usando un método de acuerdo con una realización adicional de la invención en comparación con los resultados obtenidos del uso de una prueba NASBA disponible en el mercado;

40 La Figura 6 muestra los resultados de un estudio de estabilidad llevado a cabo en formulaciones liofilizadas de acuerdo con otra realización de la invención;

La Figura 7 muestra los resultados de un estudio de estabilidad llevado a cabo en formulaciones liofilizadas para su uso en un kit de acuerdo con otra realización de la invención; y

45 La Figura 8 muestra los resultados de la amplificación y detección del ARN de *Chlamydia trachomatis* usando un método de acuerdo con una realización de la invención en comparación con los resultados obtenidos del uso de una prueba NASBA disponible en el mercado.

Ejemplo 1

a) Pruebas de ARN del VIH

50 Este ejemplo describe la amplificación y detección del ARN del VIH-1 usando una realización de la invención (denominada Prueba de ácido nucleico basado en BA de amplificación simple (SAMBA-NAT)). Las etapas del método se explican a continuación.

Formulaciones liofilizadas:

60 Perla A liofilizada: dNTP 1 mM, rATP 2 mM, rCTP 2 mM, rUTP 2 mm, rGTP 1,5 mM, rITP 0,5 mM, MgCl₂ 12 mM, KCl 70 mM, DTT 5 mM, 10 unidades de inhibidor de RNasa, sorbitol 250 mM, dextrano al 1,5 %, trehalosa al 8,75 % y cebadores 0,2 mM;

Perla B liofilizada: 6,4 unidades de AMV transcriptasa inversa, 0,16 unidades de RNasa H, 32 unidades de ARN polimerasa T7, 10 unidades de inhibidor de RNasa, dextrano al 1,5 % (p/v), trehalosa al 8,75 % (p/v), 2 µg de BSA;

65 Perla C liofilizada: partículas de oro coloidal conjugadas con anticuerpo anti-biotina mediante absorción pasiva a una velocidad de 6 µg/DO (520 nm)/ml (denominado "conjugado de oro"), dextrano al 1,5 %, trehalosa al 8,75 %, y

caseína al 1 %;

Perla D liofilizada: 5×10^{11} copias de la sonda detectora (véase a continuación), 10^{12} copias de la sonda auxiliar (véase a continuación), dextrano al 1,5 %, trehalosa al 8,75 %.

5 Tampón de detección: Tampón de hibridación basado en Tris convencional (pH 8,5) que comprende sal, detergente y BSA o leche en polvo con azida sódica al 0,05 %.

10 Cebadores y sondas:

Cebador sentido ^{5'} CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA (SEQ ID NO: 1) y cebador antisentido ^{5'} GGC GCC ACT GCT AGA GA (SEQ ID NO: 2) alargado en el extremo 5' con la secuencia del promotor de T7.

15 Sonda detectora: ^{5'} CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA (SEQ ID NO: 3)

Sonda de captura: ^{5'} CGT CTG TTG TGT GAC TCT GG (SEQ ID NO: 4)

Sonda auxiliar: ^{5'} GTG CTT CAA GTA GTG TGT GCC (SEQ ID NO: 5)

20 El detector y las sondas de captura se preparan como se describe anteriormente (Dineva et al, Journal of Clinical Microbiology, 2005, Vol. 43 (8): 4015-4021).

25 Las sondas de ADN (20-25 nucleótidos de largo) con una secuencia complementaria a la secuencia del ácido nucleico diana en una región adyacente a la región complementaria a la secuencia de la sonda de captura también podrían usarse como se describe anteriormente en el documento WO 02/04668.

30 Tira reactiva: una tira de membrana de nitrocelulosa que comprende: un extremo de contacto para poner en contacto la solución de muestra que contiene el producto de amplificación; y una zona de captura para capturar el producto de amplificación. La sonda de captura se inmoviliza en la zona de captura como describen Dineva et al (Journal of Clinical Microbiology, 2005, Vol. 43 (8): 4015-4021).

Etapas del método:

35 Etapa 1: 200 µl de muestras que contienen diferentes cantidades de ARN del VIH-1 (10^5 , 10^4 , 5×10^3 , 10^3 , 5×10^2 , 2×10^2 copias/ml) (y un control que no contenía ARN del VIH-1) se extrajeron usando un kit de ácido nucleico vírico de alta pureza de Roche o un kit de ARN viral QIAamp de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Etapa 2: se añadieron 50 µl del extracto de muestra de la etapa 1 a la microesfera A liofilizada y se mezcló;

Etapa 3: la solución de la etapa 2 se incubó a 45 °C durante 5 minutos;

Etapa 4: se añadió perla B liofilizada a la solución de la etapa 3 y se mezcló;

45 Etapa 5: la solución de la etapa 4 se incubó a 45 °C durante 45 minutos;

Etapa 6: se añadieron 200 µl de tampón de detección a la solución de la etapa 5;

50 Etapa 7: se añadieron perlas C y D liofilizadas a la solución de la etapa 6 y se mezclaron;

55 Etapa 8: 100 µl de la solución de la etapa 7 se pusieron en contacto con el extremo de contacto de la tira reactiva. La solución sube por la tira reactiva por acción capilar hasta una zona de captura de la tira reactiva. Si el producto de amplificación está presente en la solución, este se une a la sonda detectora proporcionada con la Perla D. Los restos de biotina de la sonda detectora se unen al conjugado de oro provisto con la Perla C. El producto de amplificación unido a la sonda detectora y el conjugado de oro se capturan en la zona de captura mediante la hibridación del producto de amplificación a la sonda de captura inmovilizada. El conjugado de oro unido a los restos de biotina de la sonda detectora proporciona una señal visible en la zona de captura si la sonda de captura ha capturado el producto de amplificación;

60 Etapa 9: se leyó cualquier señal que apareciera en la zona de captura de la tira reactiva.

El procedimiento desde la preparación de la muestra hasta la lectura de la señal se completó en 80 minutos. Los resultados para cada una de las diferentes muestras se muestran en la Figura 3 y demuestran que se detectaron tan solo 200 copias del ácido nucleico diana de ARN usando este procedimiento.

65

b) Pruebas para el ARN de *Chlamydia trachomatis*

El procedimiento de prueba para *Chlamydia trachomatis* es como se muestra en la Figura 2 y es similar a la de las pruebas de ARN del VIH descritas anteriormente, con la excepción de los cebadores y las sondas usados, que tienen las siguientes secuencias específicas de ARNr 16S:

5 Cebador sentido ^{5'} AGC AAT TGT TTC GAC GAT TG (SEQ ID NO: 6) y cebador antisentido ^{5'} CA CAT AGA CTC TCC CTT AAC (SEQ ID NO: 7) alargado en el extremo 5' con la secuencia del promotor de T7;

Sonda detectora: ^{5'} AAC TTG GGA ATA ACG GTT GGA A (SEQ ID NO: 8)

10 Sonda de captura: ^{5'} CGC TAA TAC CGA ATG TGG CGA (SEQ ID NO: 9)

Los resultados se muestran en la Figura 4. Se detectaron tan solo 50 copias del ácido nucleico diana.

Ejemplo 2

15 Comparación de detección de ARN de VIH usando SAMBA-NAT y NASBA-NAT

La detección de 10⁵, 10⁴, 10³, o 2 x 10² copias/ml de ARN del VIH usando un método SAMBA-NAT similar al descrito en el Ejemplo 1 se comparó con la amplificación usando un kit NASBA disponible en el mercado: NucliSens Basic Kit Amplification Reagents, Biomérieux (denominado NASBA-NAT). Para NASBA-NAT, esto requiere dos etapas de incubación adicionales antes de añadir la mezcla de enzimas y la amplificación: a) incubación a 65 °C durante 5 minutos, seguido de b) incubación a 41 °C durante 5 minutos. Los amplicones preparados por los métodos SAMBA-NAT o NASBA-NAT se detectaron usando un procedimiento de detección con tira reactiva equivalente a aquel descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 5 y demuestran que el método SAMBA-NAT detecta el ARN del VIH con una sensibilidad equivalente al método NASBA-NAT. Puede verse desde el carril cero (control) que el método NASBA-NAT proporciona una señal de fondo. Por el contrario, no hay señal de fondo presente en el carril de control SAMBA-NAT. De esto se concluye que el método SAMBA-NAT tiene una mayor especificidad y una menor interferencia de fondo en comparación con el método NASBA-NAT. El método SAMBA-NAT también fue más rápido que el método NASBA-NAT (45 minutos en comparación con 90 minutos).

30 Se ha descubierto que el método de amplificación SAMBA descrito en este ejemplo es más tolerante a las fluctuaciones de temperatura que el método de amplificación NASBA convencional.

35 El NASBA convencional no tolera fluctuaciones de temperatura que excedan +/- 0,5 °C de la temperatura de amplificación óptima de 41 °C. Por el contrario, el método SAMBA es tolerante a fluctuaciones de temperatura de +/- 4 °C.

40 La Tabla 1 a continuación resume algunas de las principales ventajas del método de amplificación SAMBA sobre el método de amplificación NASBA convencional.

Tabla 1

Desventaja de NASBA	Ventaja de SAMBA
Sensible a las fluctuaciones de temperatura superiores a +/- 0,5 °C	Tolerante a fluctuaciones de temperatura de +/- 4 °C
Tres etapas de incubación y al menos dos temperaturas de incubación diferentes	Temperatura de incubación única
Reactivos que deben almacenarse a -20 °C y transportarse mediante cadena de frío	Reactivos estables por encima de 30 °C
Se requieren más de 10 reactivos envasados individualmente	Sólo dos formulaciones liofilizadas para la amplificación
El tiempo de amplificación es de aproximadamente 90 minutos	El tiempo de amplificación es de aproximadamente 45 minutos

Ejemplo 3

45 Estabilidad a largo plazo de enzimas en formulaciones liofilizadas

Una solución acuosa que contiene dextrano al 1,5 %, trehalosa al 8,75 %, 6,4 U de AMV transcriptasa inversa, 0,16 U de RNAsa H, Se prepararon 32 U de ARN polimerasa T7 y 2 µg de BSA y después se dividieron en varias alícuotas, cada una de 25 µl. Cada alícuota se liofilizó dispensando la solución acuosa en nitrógeno líquido criogénico. La solución se congela como partículas esféricas discretas al entrar en contacto con el agente criogénico.

Las partículas congeladas se someten además a un vacío mientras aún están congeladas bajo presión (~0,01 kPa [-0,1 mbar]) y durante un tiempo (20 - 48 horas) suficiente para retirar el disolvente usando una máquina de secado por congelación (Christ Alpha 2-4, Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Alemania). Las alícuotas liofilizadas se almacenaron después a -20 °C, 4 °C, 25 °C o 37 °C. Se analizaron alícuotas liofilizadas almacenadas a cada una de las diferentes temperaturas después de intervalos de 10 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 9 meses y 12 meses para determinar la estabilidad de las enzimas en las alícuotas liofilizadas. La estabilidad se probó llevando a cabo la amplificación de un ácido nucleico diana y la detección del producto amplificado usando un método similar al descrito en el Ejemplo 1. La señal de detección obtenida de cada alícuota se comparó con la obtenida usando una muestra recién preparada. Los resultados se muestran en la Figura 6 y demuestran que las enzimas permanecieron activas después de almacenarse durante 12 meses a temperaturas de hasta 37 °C.

Ejemplo 4

Estabilidad a largo plazo de otros reactivos lábiles en formulaciones liofilizadas

Una solución acuosa que comprende dNTP 2 mM, rATP 4 mM, rCTP 4 mM, rUTP 4 mM, rGTP 3 mM, rITP 1 mM, MgCl₂ 24 mM, KCl 140 mM, DTT 10 mM, 10 unidades de inhibidor de RNasa, sorbitol 500 mM, dextrano al 1,5 %, trehalosa al 8,75 % y se prepararon cebadores y después se dividieron en varias alícuotas, cada una de 25 µl. Cada alícuota se liofilizó mediante el método descrito en el Ejemplo 3. Las alícuotas liofilizadas se almacenaron después a -20 °C, 4 °C, 25 °C o 37 °C. Se analizaron alícuotas liofilizadas almacenadas a cada una de las diferentes temperaturas después de intervalos de 10 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 9 meses y 12 meses para determinar la estabilidad de los reactivos en las alícuotas liofilizadas. La estabilidad se probó llevando a cabo la amplificación de un ácido nucleico diana y la detección del producto amplificado usando un método similar al descrito en el Ejemplo 1. La señal de detección obtenida de cada alícuota se comparó con la obtenida usando una muestra recién preparada. Los resultados se muestran en la Figura 7 y demuestran que los reactivos permanecieron estables después de almacenarse durante 12 meses a temperaturas de hasta 37 °C.

Ejemplo 5

Velocidad de rehidratación de formulaciones liofilizadas

Se prepararon soluciones acuosas (volumen final 25 µl) que contenían dextrano y sacarosa, trehalosa, manitol o trehalosa y manitol (en diversas concentraciones diferentes). A continuación, las soluciones se liofilizaron usando un método similar al descrito en el Ejemplo 3. Se añadió agua (50 µl) a cada formulación liofilizada, y el tubo que contenía la formulación se agitó con un dedo hasta que se produjo la rehidratación. Se registró el tiempo necesario para la rehidratación (número de movimientos, ~1 movimiento/segundo). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

Los resultados demuestran que los tiempos de rehidratación más rápidos se obtienen con formulaciones liofilizadas que contienen dextrano y trehalosa, aunque los tiempos de rehidratación con dextrano y sacarosa son casi tan rápidos. La presencia de concentraciones más altas de manitol (es decir, 7,5 mM o más) parece inhibir los tiempos de rehidratación.

Tabla 2

Formulación	Reactivos	Concentración final (mM)	Tiempo de rehidratación (unidades arbitrarias)
A	Dextrano Sacarosa	1,5 7,5	3-4
B	Dextrano Sacarosa	1,5 8,75	4
C	Dextrano Sacarosa	1,5 10,5	5-6
D	Dextrano Trehalosa	1,5 7,5	3
E	Dextrano Trehalosa	1,5 8,75	3
F	Dextrano Trehalosa	1,5 10,5	3-4
G	Dextrano Manitol	1,5 7,5	18-20
H	Dextrano Manitol	1,5 8,75	20

(continuación)

I	Dextrano Manitol	1,5 10,5	26-27
J	Dextrano Manitol Trehalosa	1,5 2,5 8,75	3-4
K	Dextrano Manitol Trehalosa	1,5 7,5 8,75	16-17

Ejemplo 6

5

Estudio de estabilidad acelerada de enzimas en formulaciones liofilizadas

Se almacenaron alícuotas de enzimas liofilizadas preparadas como se describe en el Ejemplo 3 a 25 °C, 37 °C o 55 °C. Las alícuotas liofilizadas almacenadas a cada una de las diferentes temperaturas se analizaron como se describe en el Ejemplo 3 después de intervalos de 3, 7, 14, 21 días y 1 mes para determinar la estabilidad de las enzimas en las alícuotas liofilizadas a temperatura elevada. Los resultados obtenidos demuestran que las enzimas se mantuvieron activas después de 1 mes de almacenamiento incluso a 55 °C.

10

Ejemplo 7

15

Comparación de detección de ARNr 16S de *Chlamydia trachomatis* usando SAMBA-NAT y NASBA convencional

La detección de 10^4 , 2×10^3 , 5×10^2 , 2×10^2 , 75 o 10 copias/prueba de ARNr 16S de *Chlamydia trachomatis* se comparó el usando el método SAMBA-NAT como se describe en el Ejemplo 1(b) con la detección usando NASBA convencional (que requiere dos pasos de incubación adicionales antes de la adición de la mezcla de enzimas y la amplificación: a) incubación a 65 °C durante 5 minutos, seguido de b) 5 minutos de enfriamiento a 41 °C). Los amplicones preparados por los métodos SAMBA-NAT o NASBA convencional se detectaron usando un procedimiento de detección con tira reactiva equivalente a aquel descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación y en la Figura 8 y demuestran que el protocolo de amplificación SAMBA detecta ARNr 16S de *Chlamydia trachomatis* con más de 7,5 veces más sensibilidad de detección que el método NASBA convencional más complejo.

20

25

Tabla 3

Copias/prueba de ARNr 16S de <i>Chlamydia trachomatis</i>	SAMBA	NASBA
10000	5	5
2000	5	5
500	5	4
200	5	3,5
75	5	1,5
10	5	0

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada que comprende un polisacárido, un sacárido de bajo peso molecular y actividades enzimáticas requeridas para la amplificación autosostenida de un ácido nucleico diana, en donde las actividades enzimáticas comprenden una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN, y en donde la formulación no incluye cofactor o cofactores enzimáticos, cebadores, rNTP y dNTP necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana.
2. Una formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1, que no incluye sal.
3. Una formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el polisacárido es un dextrano o un derivado de dextrano y/o en donde el sacárido de bajo peso molecular es trehalosa, sacarosa o maltosa.
4. Una formulación liofilizada de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además una proteína inerte, tales como BSA o caseína.
5. Una formulación liofilizada de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde un agente tamponante está presente en una concentración de menos del 25 % de la requerida para la amplificación.
6. Una formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde un agente tamponante está presente en una concentración de menos de 1 mM.
7. Una formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la formulación no incluye agente o agentes tamponantes.
8. Un kit que comprende los reactivos necesarios para la amplificación de un ácido nucleico diana, en donde el kit comprende una pluralidad de formulaciones liofilizadas diferentes, separadas en donde cada formulación liofilizada diferente comprende un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular y en donde las diferentes formulaciones del kit comprenden:
- i) una primera formulación liofilizada que comprende las actividades enzimáticas necesarias para la amplificación de un ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación autosostenida, que incluye una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ribonucleasa específica de dúplex de ADN/ARN y una ARN polimerasa dependiente de ADN; y
 - ii) una segunda formulación liofilizada, que incluye cebadores para la amplificación específica de un ácido nucleico diana, trifosfatos de ribonucleótidos para la síntesis de ARN por la ARN polimerasa dependiente de ADN y trifosfatos de desoxirribonucleótidos para la síntesis de ADN por la polimerasa dependiente de ARN o ADN;
- en donde la primera formulación liofilizada no incluye cofactor o cofactores enzimáticos, cebadores, rNTP y dNTP necesarios para la amplificación específica del ácido nucleico diana.
9. Un kit de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además:
- iii) una tercera formulación liofilizada, que incluye un reactivo de detección para detectar el producto resultante de la amplificación del ácido nucleico diana; y opcionalmente
 - iv) una cuarta formulación liofilizada, que incluye un reactivo de marcaje para marcar el reactivo de detección, en donde cada formulación liofilizada diferente comprende un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular.
10. Un kit de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde cada formulación liofilizada tiene un color diferente para que las formulaciones puedan distinguirse visualmente entre sí.
11. Un método de amplificación de ácidos nucleicos en el cual se usa una formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que se usa para la reacción de amplificación, que comprende amplificar un ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación basada en la transcripción autosostenida que se lleva a cabo a una temperatura por encima de 42 °C y menos de 50 °C o a una temperatura más baja, preferentemente en el intervalo de 35-41 °C.
12. Un método de prueba para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una solución de muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana, comprendiendo el método incubar la solución de muestra en condiciones para la amplificación del ácido nucleico diana mediante una reacción de amplificación basada en la transcripción autosostenida, en donde se usa una formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la reacción de amplificación y en donde la reacción de amplificación basada en la transcripción autosostenida se lleva a cabo a una temperatura por encima de 42 °C y menos de 50 °C o a una temperatura más baja, preferentemente en el intervalo de 35-41 °C.

Figura 1

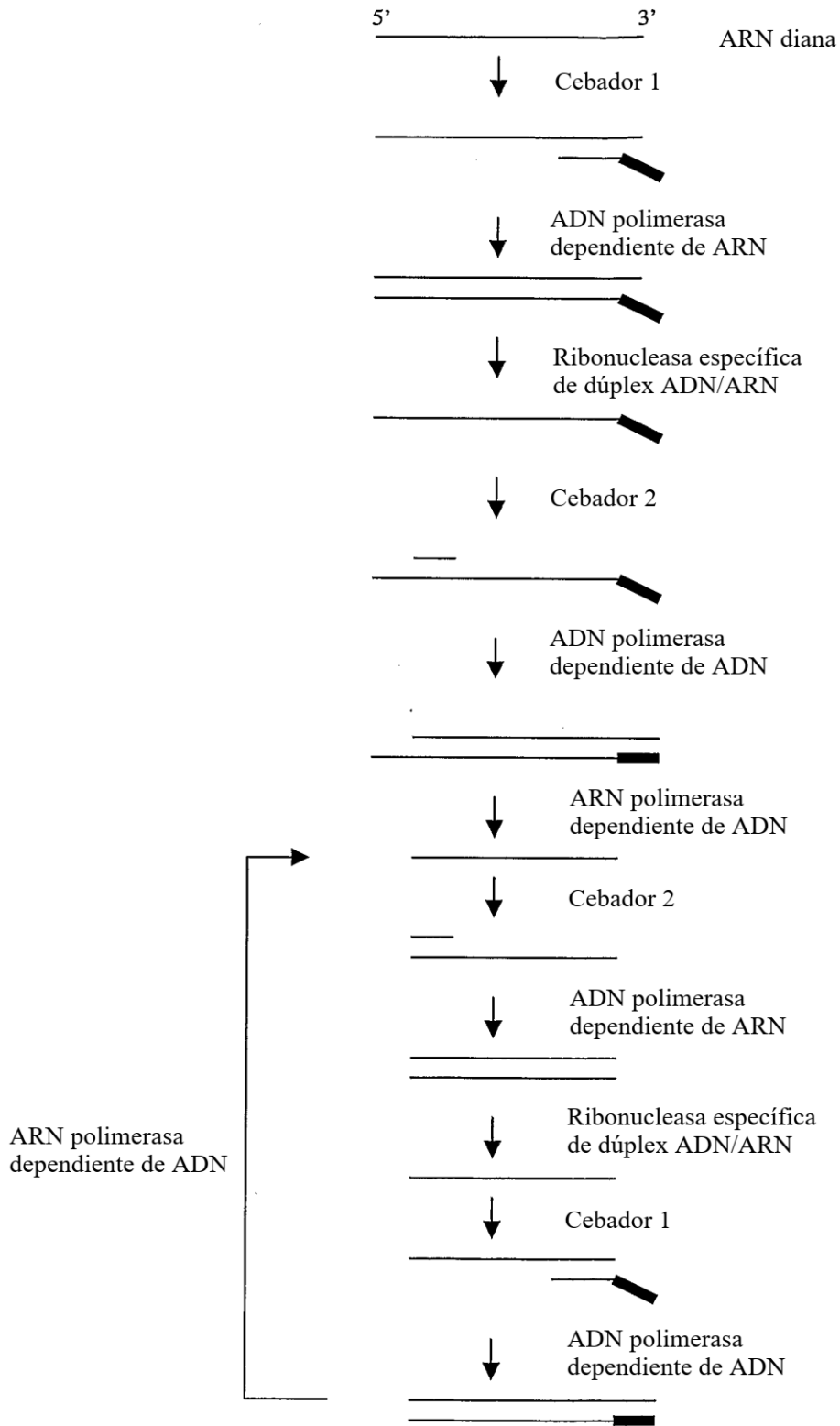
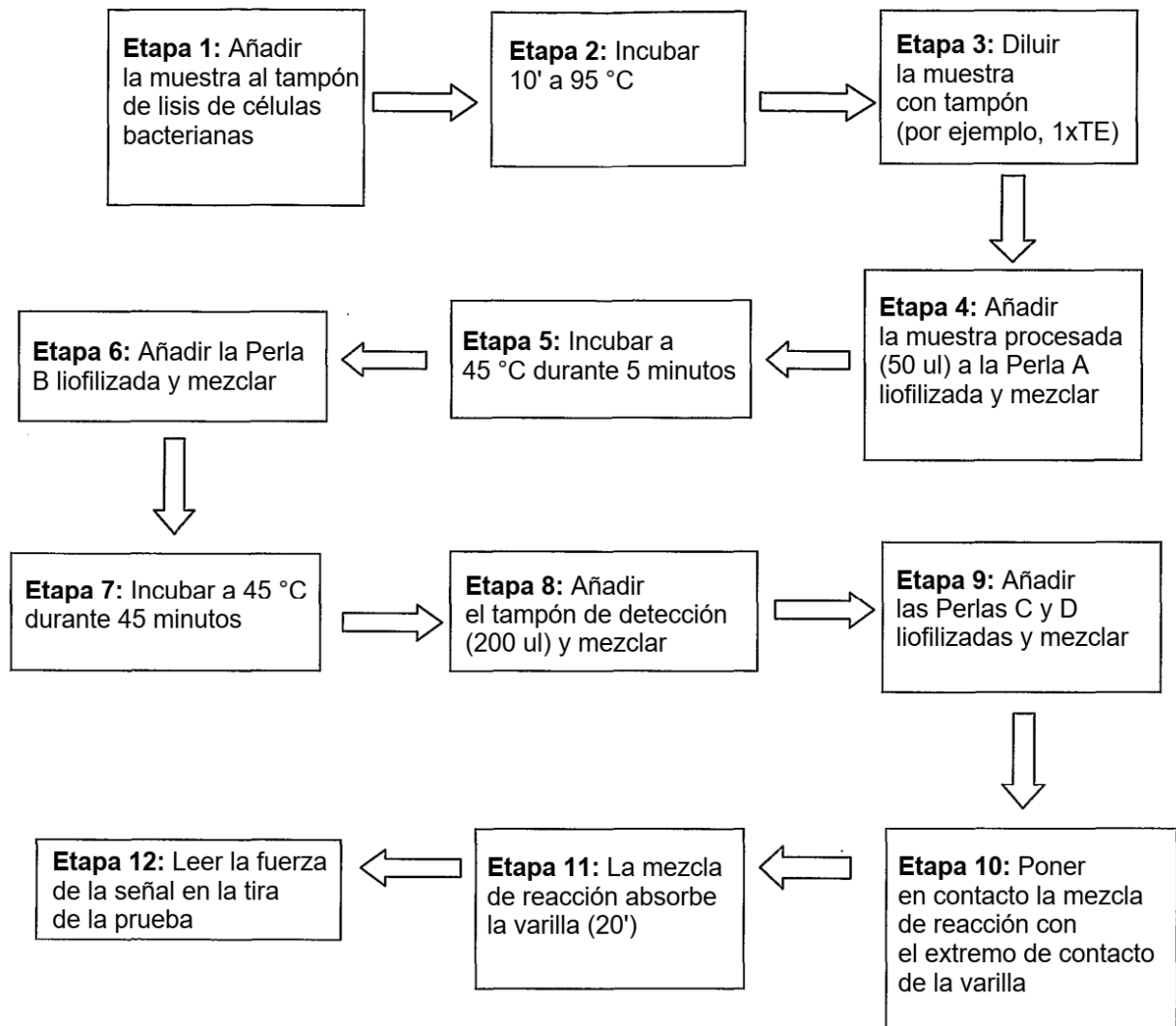


Figura 2



Tiempo de ensayo total: 80 minutos

Nota: las etapas 1-3 podrían sustituirse con cualquier procedimiento de preparación de muestras usando un kit disponible en el mercado para la extracción de ácidos nucleicos

Figura 3

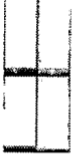



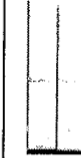


Carga de ARN del VIH (copias/ml):	10^5	10^4	5×10^3	10^3	5×10^2	2×10^2	0
Señal de línea de prueba							
Intensidad de señal	5,0	4,5	4,0	3,0	2,0	0,5	0

Figura 4

Detección SAMBA-NAT de *Chlamydia trachomatis*







<i>Chlamydia trachomatis</i> (copias/prueba)	10 ⁴	2x10 ³	750	200	50	0
Línea de lectura						
Intensidad de señal	5	4,5	4	3	2	0

Figura 5



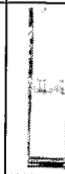
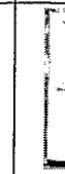

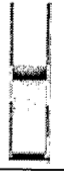


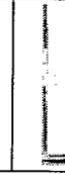
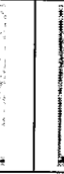
Carga de VIH (copias/ml)	10^5	10^4	10^3	2×10^2	0
SAMBA-NAT					
NASBA-NAT comercial					

Figura 6

Estabilidad de las enzimas liofilizadas

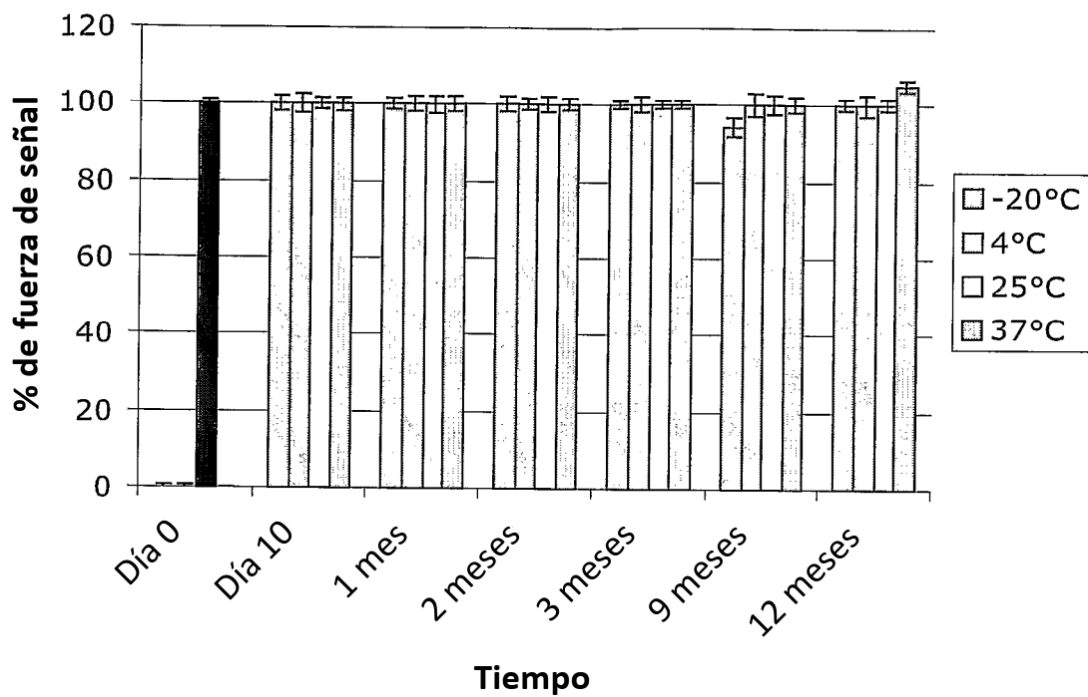


Figura 7

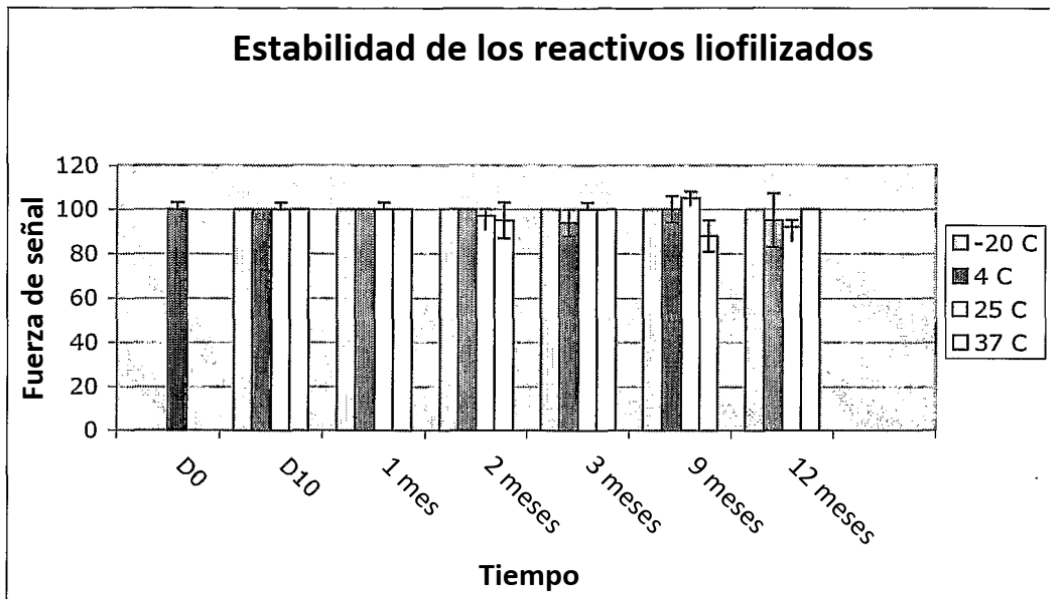


Figura 8

Comparación de protocolos

