

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 878 254**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **04 12395**

⑤① Int Cl⁸ : C 12 Q 1/68 (2006.01)

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 22.11.04.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 26.05.06 Bulletin 06/21.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *BIO-RAD PASTEUR Société anonyme*
— FR.

⑦② Inventeur(s) : SAVOYE CHANTAL et SARFATI
PATRICE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ COMPOSITION POUR L'AMPLIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES.

⑤⑦ L'invention concerne une composition liquide concen-
trée et tamponnée, pour l'amplification d'acides nucléiques,
comprenant au moins un dNTP, au moins une enzyme né-
cessaire à l'amplification, au moins une amorce oligonu-
cléotidique, et au moins une sonde nucléotidique
fluorescente, en présence de polyol et/ou de polyvinylpyrro-
lidone (PVP).

FR 2 878 254 - A1



L'invention concerne une composition stable de réactifs pour l'amplification d'acides nucléiques.

L'amplification d'acides nucléiques est communément utilisée pour détecter de faibles quantités de gènes spécifiques dans le domaine diagnostique, ou médical notamment.

Plusieurs techniques d'amplification existent : PCR (*Polymerase chain Reaction*, réaction en chaîne par polymérase), RT-PCR (transcription inverse suivie d'une PCR), SDA (*Strand Displacement amplification*, amplification par déplacement de chaînes), NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*), amplification basée sur la séquence d'acide nucléique), etc.. Chacune d'elles nécessite l'utilisation d'un mélange de plusieurs réactifs : une ou plusieurs amorces oligonucléotidiques, des dNTP (desoxynucleotides triphosphates), une ou plusieurs enzymes (polymérase, transcriptase inverse, ...), un tampon salin, et avantageusement une ou plusieurs sondes fluorescentes.

Le mélange de ces réactifs implique un pipetage minutieux de chacun d'entre eux, afin d'atteindre les performances de sensibilité et de spécificité requises, et d'assurer la reproductibilité des résultats d'amplification. En outre, la préparation du mélange des réactifs d'amplification doit être physiquement séparée de l'addition de l'acide nucléique à amplifier pour éviter la contamination des solutions mères de réactifs d'amplification par l'acide nucléique à amplifier.

Ces réactifs sont généralement conservés à -20°C, et les sondes et amorces sont le plus souvent lyophilisées pour assurer un stockage de longue durée.

Des agents cryoprotecteurs peuvent alors être utilisés, par exemple des sucres ou des polyols pour maintenir l'intégrité des oligonucléotides au cours d'une lyophilisation (EP 833 667). De même, le glycérol est utilisé pour protéger les enzymes (EP 455 744).

EP 455 744 propose d'ailleurs un concentrat réactionnel pour le séquençage d'acides nucléiques, qui comprend une polymérase thermostable, des dNTP, un ddNTP, un agent de réduction, du glycérol, et éventuellement une amorce, évitant ainsi le mélange de ces réactifs au moment de l'utilisation.

Par ailleurs, des trousse d'amplification, contenant tous les réactifs nécessaires à l'amplification, sont commercialisées par la société ARTUS. Toutefois, ces trousse doivent impérativement être conservées à -20°C. De plus, le fournisseur indique que la conservation à 4°C ne peut pas dépasser 5 heures.

Il n'existe pas de composition stable pendant plusieurs mois à 4°C permettant l'amplification d'acides nucléiques (communément appelée un « mix ») contenant l'ensemble des réactifs essentiels à la réaction d'amplification, et en particulier une ou des sondes nucléotidiques fluorescentes.

L'utilisation de sondes nucléotidiques fluorescentes est particulièrement avantageuse pour la détection et le suivi des réactions d'amplification (telles que notamment PCR ou RT-PCR en temps réel). En effet, les tests d'amplification utilisant les sondes fluorescentes, suppriment toute étape manuelle post amplification pour la détection, ce qui permet d'obtenir un résultat rapide et évite le risque de contamination par aérosols (« carryover »).

Or se pose le problème de la stabilité des sondes fluorescentes employées, qui se dégradent rapidement, ajoutant à l'instabilité des enzymes et des dNTP utilisés pour l'amplification.

Les auteurs de la présente invention se sont attachés à résoudre ces problèmes, tout en voulant éviter les inconvénients d'un mélange extemporané des réactifs.

Les auteurs de l'invention ont alors mis en évidence que la présence de polyol et/ou de polyvinylpyrrolidone (PVP) permettait de stabiliser à la fois les enzymes, et les sondes fluorescentes dans une composition liquide, voire également les dNTP.

Un objet de l'invention est donc une composition liquide concentrée et tamponnée, pour l'amplification d'acides nucléiques, comprenant au moins un dNTP, au moins une enzyme nécessaire à l'amplification, au moins une amorce nucléotidique, et au moins une sonde nucléotidique fluorescente en présence de polyol et/ou de polyvinylpyrrolidone (PVP).

Une telle composition, aussi désignée communément « mix », offre l'avantage d'être stable au cours du temps indépendamment des conditions de stockage. Même après une conservation de plusieurs mois à température ambiante, les enzymes, les sondes fluorescentes, voire également les dNTP, restent stables. Le niveau de sensibilité et spécificité requis pour l'amplification et de la détection de l'acide nucléique étant assuré.

La composition ne nécessite pas la mise en oeuvre de manipulation supplémentaire autre que l'ajout d'un diluant, et pour cette raison peut être considérée comme un mix réactionnel prêt à l'emploi.

10 Cette composition est utile quel que soit le type d'amplification d'acides nucléiques envisagé.

Par « amplification », on entend l'augmentation de la concentration d'une séquence d'acide nucléique particulière à partir d'un acide nucléique purifié ou d'un mélange de séquences d'acides nucléiques. Cette étape d'amplification peut être réalisée par n'importe quelle méthode conventionnelle d'amplification enzymatique de l'ADN ou de l'ARN, telle qu'en particulier la PCR décrite par Saiki et al. (1988) et dans les brevets EP 200 362 et 201 184, les techniques TAS (Transcription-based Amplification System) proposées par Kwoh et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Fahy et al. (1991), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) décrite dans EP 329 822, la technique Transcription Mediated Amplification (TMA) décrite dans US 5,399,491, la technique SDA (Strand Displacement Amplification) décrite par Walker et al. (1992), ou la technique Ligase Chain Reaction (LCR, gap-LCR) décrite dans le brevet EP 25 0 320 308, la technique Rolling Circle Amplification (RCA) décrite dans le brevet US 563,912 ou encore la technique LLA (Linked Linear Amplification (LLA) décrite dans le brevet US 6,027.

De préférence, l'amplification est une PCR en temps réel ou une RT-PCR en temps réel.

30 Une composition préférée est une composition telle que définie précédemment pour l'amplification d'acides nucléiques par PCR, comprenant dATP, dCTP, dGTP, et l'un parmi dTTP ou dUTP, ainsi qu'au moins une enzyme nécessaire à la PCR, au moins deux amorces oligonucléotidiques, au

moins une sonde nucléotidique fluorescente, en présence de polyol et/ou de PVP.

Une autre composition préférée est une composition telle que définie précédemment pour l'amplification d'acides nucléiques par RT-PCR, comprenant dATP, dCTP, dGTP, et l'un parmi dTTP ou dUTP, ainsi qu'au moins une enzyme nécessaire à la RT-PCR, au moins deux amorces oligonucléotidiques, au moins une sonde nucléotidique fluorescente, en présence de polyol et/ou de PVP.

10

Tampon :

Par « composition tamponnée », on entend que le pH de la concentration est contrôlé par la présence d'un tampon. Il peut s'agir d'une solution saline tamponnée standard, par exemple contenant un sel de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS®), de préférence le chlorhydrate ou l'acétate, dans de l'eau pour atteindre une concentration de TRIS® de 5 mM à 500 mM de préférence de 7 mM à 400 mM.

A cette solution tampon, un sel de magnésium et/ou de manganèse (de préférence le chlorure ou le sulfate) peut être ajouté pour fournir une concentration de travail de 1 mM à 8 mM, de préférence de 1,5 à 5 mM. Un sel de potassium, de préférence du chlorure de potassium peut aussi être ajouté à la solution, à une concentration de travail de 5 mM à 1 M, de préférence de 7 mM à 800 mM. Un sel de sodium, de préférence le chlorure, peut également être ajouté, à une concentration de 5 mM à 500 mM, de préférence de 7 mM à 400 mM. Un sel d'ammonium, par exemple du sulfate d'ammonium, peut aussi être ajouté au mélange à une concentration de travail de 2 mM à 100 mM, de préférence 3,5 mM à 80 mM. Des combinaisons de sulfate d'ammonium et de chlorure de potassium, ou d'autres sels, peuvent aussi être utilisés à des concentrations équivalentes à celles déjà mentionnées. D'autres composés peuvent également être utilisés, tels que l'éthylènediaminetétraacétate (EDTA), le dithiothreitol (DTT), le tween-20, la BSA (bovine serum albumin) ou le triton X-100. Le pH est ajusté pour obtenir une valeur de pH comprise entre 7,4 à 9,2, de préférence 7,8 à 8,8.

Enzymes :

La composition comprend au moins une enzyme nécessaire à l'amplification. Il peut s'agir d'une ADN polymérase telles que la *Taq* DNA polymerase, VENT™, DEEPVENT.™, Pfu, Pwo ou Tth. Il peut s'agir encore de *Taq* polymerase « hot start » dont le site enzymatique peut être bloqué à basse température par une réaction immunologique (EP 592 035), chimique (US 5,677,152 ; US 5,773,258), ou par une interaction ionique. L'ensemble de ces enzymes sont commercialisées. Le cas échéant, des transcriptases inverse peuvent être utilisées, par exemple des transcriptases inverses à activité RNase H. D'autres enzymes peuvent être ajoutées, par exemple de l'UDG (uracyl DNA glycosylase). En particulier, l'enzyme UDG thermolabile peut être utilisée.

Les enzymes, par exemple la *Taq* DNA polymerase, la transcriptase inverse et l'UDG, sont utilisés de préférence à des concentrations comprises entre 0,5 U à 8 U de *Taq* polymérase par réaction, ce qui correspond à 10 U/ml à $8 \cdot 10^3$ U/ml. L'expression de la concentration de l'enzyme est bien connue de l'homme du métier, une unité étant la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmol de dNTP dans un matériau insoluble dans l'acide dans un délai de 30 minutes à 72°C. La transcriptase inverse est de préférence utilisée entre 1 U et 10^3 U par réaction, ce qui correspond à 20 U/ml à 10^6 U/ml. L'unité de transcriptase inverse est la quantité d'enzymes qui incorpore 1 nmol de dTTP dans des produits insolubles dans l'acide en 10 minutes à 37°C avec une matrice ARN poly-A et une amorce oligo-dT₁₂₋₁₈. L'UDG, lorsqu'elle est ajoutée à la composition, est de préférence utilisée entre 0,1 U et 2 U, correspondant à 2 U/ml à $2 \cdot 10^3$ U/ml. Une unité d'UDG catalyse la libération d'une nmol d'uracil libre à partir de poly(dU) en une heure à 37°C .

dNTPs :

Les désoxynucléotides triphosphate (dNTP) sont fournis en une concentration de préférence d'au moins cinq fois supérieure à la concentration de travail. Cela signifie que chaque dNTP est de préférence utilisé entre 0,3 mM et 75 mM. Les dNTP incluent le désoxyadénosine triphosphate (dATP), le

désoxyguanosine triphosphate (dGTP), désoxycytidine triphosphate (dCTP) et la désoxythymidine triphosphate (dTTP). De préférence, ces quatre dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont utilisés dans les compositions de l'invention. D'autres dNTP, telles que la désoxyuridine triphosphate (dUTP), et des analogues de dNTP ainsi que des dNTP conjugués peuvent aussi être utilisés et sont compris dans le terme « dNTP » utilisé ici.

Amorces :

Typiquement, les amorces oligonucléotidiques possèdent une taille généralement comprise entre 12 à 25 nucléotides de longueur. Toutefois, il des amorces ayant une taille inférieure à 12 nucléotides ou supérieures à 25 nucléotides peuvent aussi être utilisées. La longueur de l'amorce n'est pas essentielle à la mise en œuvre de l'invention. Généralement les amorces oligonucléotidiques sont synthétisées par voie chimique. Les amorces oligonucléotidiques peuvent être composées des bases A, T, G, C, U ou des analogues de bases, par exemple l'inosine ou des PNA (peptide nucleic acid).

Les amorces oligonucléotidiques utilisées s'hybrident classiquement au brin complémentaire de la matrice lors de la réaction d'amplification.

Chaque amorce est de préférence utilisée à une concentration d'au moins 5 fois la concentration de travail, ce qui signifie une concentration d'environ 0,1 μM à 200 μM , préférentiellement entre 1 μM et 50 μM .

Sondes :

La sonde nucléotidique peut comprendre de 8 à 40 nucléotides de longueur. La longueur de la sonde n'est pas essentielle à la mise en œuvre de l'invention. Elle est typiquement utilisée pour capturer ou détecter une séquence cible à laquelle elle s'hybride.

Le marquage de la sonde est particulièrement avantageux pour faciliter la détection de l'acide nucléique amplifié, en particulier lors des réactions d'amplification et de détection en temps réel, à savoir que la séquence cible est détectée et/ou quantifiée tandis que la réaction d'amplification se déroule.

La sonde est dite « fluorescente » en ce qu'elle porte un marqueur fluorescent.

Ces marqueurs fluorescents incluent notamment la fluorescéine, Tamra, N,N,N',N'-tétraméthyl-6-carboxyrhodamine ; FAM, 5-carboxy-fluorescéine ; JOE, 2',7'-diméthyl-4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescéine, ROX, 6-carboxy-X-rhodamine ; CY3 ; CY5 ; TET, tétrachloro-fluorescéine ou HEX, hexachloro-fluorescéine.

La détection de l'acide nucléique amplifié peut être notamment réalisée en utilisant la technologie dite « Molecular Beacon » (Tyagi et Kramer, 1996 ; Cayouette et al., 1999). Selon cette technologie, un fluorophore et un "quencher" sont liés à chaque extrémité de la séquence de la sonde. En l'absence de l'acide nucléique cible, les séquences des bras s'hybrident l'un à l'autre pour former une structure en « épingle à cheveux » qui met en contact le fluorophore et le quencher. En présence d'un acide nucléique cible, la sonde et la séquence cible s'hybrident. La structure en épingle à cheveux ne peut pas coexister avec la double hélice rigide qui est formée par cette hybridation et le changement conformationnel en résultant entraîne la séparation des séquences des bras provoquant l'éloignement du fluorophore et du quencher. Lorsque le fluorophore et le quencher sont séparés, le signal de fluorophore est détectable. Tous les marqueurs fluorescents indiqués ci-dessus peuvent être utilisés. Le quencher peut de préférence être choisi parmi le Dabcyl, Eclipse Dark Quencher, et Black Hole Quenchers. Ces molécules sont facilement disponibles auprès de Eurogentec, Biosearch Technology, Proligo.

Chaque sonde fluorescente est de préférence utilisée à une concentration supérieure à au moins 5 fois la concentration de travail, ce qui signifie entre 0,1 μM à 200 μM , de préférence entre 0,5 μM et 30 μM .

Polyols :

Les polyols utilisables dans l'invention ont une structure linéaire, ramifiée, ou cyclique. Les polyols les plus appropriés incluent le glycérol, le sorbitol ou le pentaérythritol. D'autres polyols tels l'inositol, le dulcitol, le mannitol, le propylène glycol ou l'éthylène glycol et leurs dérivés peuvent

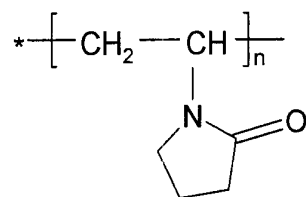
également être utilisés. Des combinaisons de polyols peuvent également être utilisées.

Les polyols sont de préférence dissous dans un tampon ou dans l'eau et de préférence utilisés dans la composition à une concentration supérieure à 1 mM, de préférence supérieure à 250 mM, de préférence supérieure à 500 mM, de préférence encore supérieure à 1 M.

Préférentiellement, le glycérol est utilisé à une concentration supérieure à 5 M, le sorbitol est utilisé à une concentration supérieure à 1 M, l'inositol est utilisé à une concentration supérieure à 500 mM, et le penta-érythritol est utilisé à une concentration supérieure à 250 mM.

PVP :

Le polyvinylpyrrolidone est un polymère de formule :



15

Le PVP est un excipient dans la préparation de produits pharmaceutiques, principalement pour la production de comprimés ou de granules. Des PVP avec un poids moléculaire moyen de 2500 à 750 000 sont sur le marché sous les noms suivants : Kollidon, Luviskol, Albigen A, et Divergan (BASF) ; PVP et Plasdone (General Aniline and Film Corp.) ; Collacral et Luviskol VA (copolymères avec des esters de vinyle, BASF) ; PVP/VA (copolymères avec de l'acétate de vinyle, General Aniline and Film Corp.).

Le PVP est de préférence dissous dans un tampon ou dans l'eau. Il est utilisé à une concentration supérieure à 0,1 mM.

Dans le cadre de l'invention, on préfère utiliser le PVP-10 dont le poids moléculaire est 10000 g/mol. Le PVP-10 est de préférence utilisé à une concentration supérieure à 30 mM, préférentiellement à environ 300mM.

30

Emploi :

La composition contient sous forme concentrée les réactifs nécessaires à une amplification d'acides nucléiques. La seule étape complémentaire nécessaire pour la mise en route de l'amplification est la dilution de cette composition avant ou après la mise en contact avec l'échantillon d'acide nucléique à amplifier.

Le diluant est de préférence une solution saline tampon, comprenant éventuellement des sels de magnésium ou de manganèse, entre autres sels. Les concentrations de tampon et des sels sont ajustées pour obtenir des concentrations en tampon et en sels finales adaptées à une réaction d'amplification. Il peut s'agir d'une solution saline tampon qui contient au moins l'un des ingrédients choisis parmi le TRIS à une concentration d'au moins 8 mM, du sel de potassium ou de sodium à une concentration d'au moins 8 mM, du sel d'ammonium à une concentration d'au moins 5 mM, et du sel de magnésium ou de manganèse à une concentration d'au moins 0,8 mM, les ingrédients étant utilisés seuls ou en mélange.

Il peut par exemple s'agir d'une solution saline tamponnée standard, contenant un sel de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), de préférence le chlorhydrate ou l'acétate, dans de l'eau pour atteindre une concentration de TRIS de 8 mM à 2,5 M de préférence de 10 mM à 125 mM. A cette solution tampon, un sel de magnésium et/ou de manganèse, de préférence le chlorure ou le sulfate, peut être ajouté à une concentration de 0,85 mM à 400 mM, de préférence de 1 mM à 20 mM. Un sel de potassium, de préférence du chlorure de potassium, peut aussi être ajouté à la solution, à une concentration de travail de 8 mM à 4,5 M, de préférence de 10 mM à 250 mM. Un sel de sodium, de préférence le chlorure, peut également être ajouté, à une concentration de 8 mM à 2,5 M, de préférence de 10 mM à 125 mM. Un sel d'ammonium, par exemple du sulfate d'ammonium, peut aussi être ajouté au mélange à une concentration de travail de 5 mM à 500 mM, de préférence 5 mM à 25 mM. Des combinaisons de sulfate d'ammonium et de chlorure de potassium, ou d'autres sels, peuvent aussi être utilisés à des concentrations équivalentes à celles déjà mentionnées. D'autres composés peuvent également être utilisés, tels que l'éthylènediaminetétraacétate (EDTA), le dithiothreitol (DTT), le tween-

20, la BSA (bovine serum albumin) ou le triton X-100. Le pH est ajusté pour obtenir une valeur de pH comprise entre 7,4 à 9,2, de préférence 7,8 à 8,8.

Un exemple de diluant est un tampon pour *Taq* DNA polymerase à une concentration en $MgCl_2$ entre 1 mM et 20 mM.

5 Plusieurs modes de réalisation sont possibles pour la préparation d'un mélange réactionnel complet pour l'amplification d'acide nucléique.

Un aspect préféré de l'invention vise un procédé de préparation d'un mélange réactionnel complet pour l'amplification d'acides nucléiques, comprenant :

10 (i) la dilution d'une composition concentrée telle que définie précédemment, dans une solution saline tampon adaptée pour l'amplification des acides nucléiques ;

(ii) la mise en contact d'un échantillon d'acides nucléiques à amplifier avec un volume désiré de la composition diluée à l'étape (i).

15 De préférence, le procédé de préparation comprend les étapes suivantes :

(i₁) la répartition de la composition concentrée dans un contenant et le stockage sous cette forme,

(i₂) l'addition d'une solution saline tamponnée au moment de l'emploi,

20 (ii) la mise en contact d'un échantillon d'acides nucléiques à amplifier avec la composition diluée à l'étape (i₂).

En pratique, on peut par exemple prélever 5 µl d'une composition concentrée telle que définie ci-dessus (mix), ajouter 35 µl de diluant (tampon), puis 10 µl d'échantillon d'acide nucléique, ou encore prélever 5 µl de la
25 composition concentrée (mix), ajouter 20 µl de diluant (tampon) et 25 µl d'échantillon.

La mise en contact peut s'effectuer dans n'importe quel contenant adapté à l'amplification, tels que des tubes, des puits d'une microplaque, des capillaires.

30 De manière alternative, un autre procédé de préparation d'un mélange réactionnel complet pour l'amplification d'acides nucléiques, comprend :

(i) le mélange d'un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, dans une solution saline tampon adaptée pour l'amplification des acides nucléiques ;

(ii) l'ajout du mélange obtenu à l'étape (i) avec un volume désiré de la composition concentrée telle que définie précédemment.

De préférence, ce procédé comprend en pratique la répartition de la composition concentrée telle que définie précédemment, dans des tubes, dans les puits d'une microplaque, ou dans n'importe quel autre contenant adapté à l'amplification, puis la distribution dans la composition concentrée de l'échantillon d'acides nucléiques (préalablement mélangé à la solution saline tampon).

L'amplification peut démarrer spontanément ou après une incubation à chaud (95°C) par exemple, si on utilise une polymérase « hot start ».

L'échantillon d'acides nucléiques peut être de tout type. Il provient de préférence d'un échantillon biologique tel que du sang, urine, salive ou biopsie tissulaire, qui de manière avantageuse a été préalablement traité pour en extraire les acides nucléiques par tout procédé connu de l'homme du métier.

La présente invention vise donc également un procédé d'amplification d'acides nucléiques, comprenant les étapes (i), et/ou (ii) telles que définies précédemment, et (iii) le démarrage de la réaction d'amplification des acides nucléiques présents dans l'échantillon, amplification détectable au moyen du marqueur fluorescent porté par la ou les sondes.

Il peut s'agir de n'importe quel type d'amplification comme décrit plus haut, par exemple une RT-PCR en temps réel, ou une PCR en temps réel.

Trousses :

L'invention fournit également une trousse (« kit ») pour l'amplification et/ou la détection d'acides nucléiques, comprenant au moins un récipient contenant la composition concentrée telle que définie précédemment et éventuellement une notice d'utilisation de la trousse. D'autres trousses peuvent comprendre un premier récipient contenant la composition concentrée, telle que définie précédemment, et un deuxième récipient contenant une solution saline tampon telle que définie précédemment.

LEGENDES DES FIGURES :

Figure 1 : Comparaison des Ct obtenus pour l'amplification de 1000 copies d'ADN (A) et 10 copies d'ADN (B) après différents temps d'incubation, à 37°C, des mix PCR contenant aucun polyol (mix 1), 6,5 M glycérol (mix 2), 750 mM inositol (mix 3), 530 mM penta-erythritol (mix 4), 1,5 M sorbitol (mix 5).

Figure 2 : Comparaison des Ct obtenus pour l'amplification de 3 séquences d'ADN, après différents temps d'incubation, à 37°C, des mix PCR ne contenant ni polyol ni PVP (mix 6) , ou contenant 0,3 M PVP10 (mix 7), 6,5M glycerol (mix 8), 0,3 M PVP-10 + 6,5 M glycérol (mix 9).

EXEMPLES :

Exemple 1 :

Cet exemple montre l'effet de stabilisation du glycérol, du sorbitol, du pentaérythritol, et de l'inositol sur des mélanges pour PCR en temps réel.

L'étude de la stabilité des réactifs est réalisée à 37°C. En se basant sur la loi d'Arrhenius, il est admis qu'une enzyme stable pendant une semaine à 37°C conserve son activité pendant 6 mois à 4°C.

Cinq compositions pour PCR en temps réel sont préparées. Chaque composition (« mix ») contient du tampon 1X (Qiagen,) 1,5 mM de MgCl₂, 5 µM de chaque amorce (Eurobio Laboratoires), 2,5 mM de chaque dNTP (Eurobio Laboratoires), 1 µM de sonde Molecular Beacon marquée par Fam-Dabcyl (Eurogentec), 1 U de Taq polymérase (Qiagen) et

- pas de polyol : mix 1,
- 6,8 M de glycérol (Prolabo) : mix 2,
- 750 mM inositol (Fluka) : mix 3,
- 530 mM de pentaérythritol (Merck) : mix 4,
- 1,5 M sorbitol (Sigma) : mix 5.

Des fractions aliquotes de 45 µl sont prélevées à partir de chaque composition (mix) et conservées à 37°C jusqu'à la date de l'analyse.

Une solution diluante est préparée. Elle contient du tampon 1,29X et 6,93 mM de MgCl₂. Des fractions aliquotes de 315 µl sont prélevées et conservées à 37°C jusqu'à la date de l'analyse.

Le jour de l'analyse, une fraction aliquote du diluant est ajoutée à une
5 fraction aliquote du mix PCR. Après mélange, 40 µl de la solution sont répartis dans les tubes de PCR. 10 µl d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* contenant 1 copie/µl sont ajoutés à trois tubes de PCR différents, 10 µl d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* contenant 100 copies/µl sont ajoutés à trois tubes différents, et 10 µl d'eau sont ajoutés à deux tubes différents.

10 Des réactions de PCR sont réalisées au jour 0, au jour 3 ± 1, au jour 6 ou 7, au jour 13 et au jour 21.

Les réactions de PCR sont réalisées sur l'icycler iQ (Bio-Rad). 50 cycles composés de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 59°C, 30 secondes à 72°C sont réalisés, après une étape initiale de 15 minutes à 95°C pour activer
15 la polymérase « hot start ».

Les analyses sont réalisées au moyen du logiciel de l'icycler iQ. Les valeurs de cycle seuil (Ct cycle threshold) pour chaque réaction PCR sont déterminées après positionnement manuel de la ligne de base entre les cycles 4 et 25 et le positionnement manuel du seuil à une valeur constante de 50
20 unités relatives de fluorescence (RFU : Relative Fluorescence Unit). Le Ct est le cycle de la PCR à partir duquel la fluorescence mesurée est supérieure à celle du bruit de fond.

Les moyennes des valeurs des Ct des triplicats obtenues après amplification de 10 copies/PCR et 1000 copies/PCR avec les mélanges (mix 1
25 à 5) incubés à 37°C, sont montrées à la figure 1.

Tous les polyols présentés dans cet exemple permettent de stabiliser les mélanges de réactifs pour PCR en temps réel. Le penta-érythritol et le sorbitol présentent les meilleures performances en tant que stabilisant
30 puisqu'ils augmentent la stabilité des mélanges d'un facteur au moins égal à 3,5 et 6,5 respectivement.

Exemple 2:

Cet exemple démontre l'effet de stabilisation du glycérol et du PVP-10 sur des mélanges pour PCR en temps réel.

5 Quatre compositions concentrées pour PCR en temps réel sont préparées. Chaque composition («mix») contient du tampon 1X (Qiagen,) 5 mM de MgCl₂, 5 µM de chaque amorce (Eurobio Laboratoires), 2,5 mM de chaque dNTP (Eurobio Laboratoires), 2 µM de sonde Molecular Beacon marquée par Fam-Dabcyl (Eurogentec), 4 µM de sonde Molecular Beacon
10 marquée par Tamra-Dabcyl (Eurogentec), 2 µM de sonde Molecular Beacon marquée par Atto-590-Dabcyl (Eurogentec), 2 U de Taq polymérase (Qiagen) et

- ni PVP ni polyol : mix 6
- 0,3 M PVP-10 (sigma) : mix 7
- 15 - 6,5 M de glycérol (Prolabo) : mix 8
- 6,5 M de glycérol et 0,3 M de PVP-10 :mix 9

Trois séquences sont amplifiées et détectées simultanément. Les séquences 1 et 2 appartiennent au génome de *Mycobacterium tuberculosis* et la séquence 3 est un standard interne.

20 La séquence 1 est détectée par la sonde Fam, la séquence 2 est détectée par la sonde Tamra et la séquence 3 est détectée par la sonde Atto-590.

Des fractions aliquotes de 45 µl sont prélevées à partir de chaque composition (mix) et conservées à 37°C jusqu'à la date de l'analyse.

25 Une solution diluante est préparée. Elle contient du tampon 1,15X et 5,75 mM de MgCl₂. Des fractions aliquotes de 315 µl sont prélevées et conservées à 37°C jusqu'à la date de l'analyse.

Le jour de l'analyse, une fraction aliquote du diluant est ajoutée à une fraction aliquote du mix PCR. Après mélange, 40 µl de la solution sont répartis
30 dans les tubes de PCR.

10 µl d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* contenant 1 copie/µl de la séquence 2 sont ajoutés à deux tubes de PCR différents, 10 µl d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* contenant 100 copies/µl de la séquence 2 sont

ajoutés à deux tubes différents, et 10 µl d'eau sont ajoutés à deux tubes différents.

Des réactions de PCR sont réalisées au jour 0, au jour 3 ± 1 , au jour 6 ou 7, au jour 13 et au jour 21.

5 Les réactions de PCR sont réalisées sur l'icycler iQ (Bio-Rad). 50 cycles composés de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 59°C, 30 secondes à 72°C sont réalisés, après une étape initiale de 15 minutes à 95°C pour activer la polymérase « hot start ».

Les analyses sont réalisées au moyen du logiciel de l'icycler iQ.

10 Les valeurs de Ct pour chaque réaction PCR correspondant à la séquence 1 (sonde Fam-Dabcyl) sont déterminées après positionnement manuel de la ligne de base entre les cycles 4 et 23 et le positionnement manuel du seuil à une valeur constante de 35 RFU.

15 Les valeurs de Ct pour chaque réaction PCR correspondant à la séquence 2 (sonde Tamra-Dabcyl) sont déterminées après positionnement manuel de la ligne de base entre les cycles 4 et 30 et le positionnement manuel du seuil à une valeur constante de 20 RFU.

20 Les valeurs de Ct pour chaque réaction PCR correspondant à la séquence 3 (sonde Atto-590-Dabcyl) sont déterminées après positionnement manuel de la ligne de base entre les cycles 4 et 30 et le positionnement manuel du seuil à une valeur constante de 10 RFU.

25 Les moyennes des valeurs des Ct des duplicats obtenues après amplification de 10 copies/PCR et 1000 copies/PCR avec les mélanges (mix 6 à 9) incubés à 37°C, sont montrées à la figure 2.

Le glycérol ou le PVP-10 permet de stabiliser un mix pour PCR en temps réel, contenant plusieurs sondes fluorescentes.

La combinaison du PVP-10 et du glycérol permet d'augmenter cette stabilité.

30

Exemple 3 :

Cet exemple compare la stabilité d'une même composition conservée à trois températures différentes : 37°C, 20°C et 4°C.

5 Une composition pour PCR en temps réel est préparée. Elle contient du tampon 2X (Qiagen,) 3 mM de MgCl₂, 6 µM de chaque amorce (Eurogentec), 2 mM de dATP, 2 mM de dGTP , 2 mM de dCTP , 2 mM de dUTP, 1 mM de dTTP (Amersham), 6 µM de sonde Molecular Beacon marquée par Fam-Dabcyl (Eurogentec), 2,5 U de Taq polymérase (Qiagen),
10 0,25 U d'UDG (Invitrogen), 6,5M glycérol (Prolabo) et 300 mM PVP-10 (Sigma).

Des fractions aliquotes de 45 µl sont prélevées à partir de chaque composition (mix) et conservées à 37°C, à 20°C ou à 4°C jusqu'à la date de l'analyse.

15 Une solution diluante est préparée. Elle contient du tampon 2X et 14,25 mM de MgCl₂. Des fractions aliquotes de 180 µl sont prélevées et conservées à 37°C, à 20°C ou 4°C jusqu'à la date de l'analyse.

Le jour de l'analyse, une fraction aliquote du diluant est ajoutée à une fraction aliquote du mix PCR. Après mélange, 25 µl de la solution sont répartis
20 dans les tubes de PCR.

25 25 µl d'ADN du virus de l'hépatite B contenant 1 copie/µl sont ajoutés à deux tubes de PCR différents, 25 µl d'ADN du virus de l'hépatite B contenant 10 copies/µl sont ajoutés à deux tubes différents, 25 µl d'ADN du virus de l'hépatite B contenant 100 copies/µl sont ajoutés à deux tubes différents et 25 µl d'eau sont ajoutés à deux tubes différents.

Des réactions de PCR sont réalisées au jour 0, au jour 21, au jour 35 puis tous les mois entre 2 et 6 mois, à 9 mois et à 12 mois.

30 Les réactions de PCR sont réalisées sur l'icycler iQ (Bio-Rad). 50 cycles composés de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C ont été réalisés, après une étape initiale de 10 minutes à 37°C pour activer l'UDG et de 15 minutes à 95°C pour activer la polymérase « hot start ».

Les analyses sont réalisées au moyen du logiciel de l'icycler iQ. Les valeurs des Ct pour chaque réaction PCR sont déterminées après

positionnement manuel de la ligne de base entre les cycles 2 et 32 et le positionnement manuel du seuil à une valeur constante de 50 RFU.

Les moyennes des valeurs des Ct des duplicats obtenues après amplification de 25 copies/PCR, 250 copies/PCR et 2500 copies/PCR de la composition conservée à 37°C, 20°C et 4°C sont montrées au tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Comparaison des Ct obtenus pour l'amplification de 25 copies d'ADN, 250 copies d'ADN, 250 copies d'ADN et 2500 copies d'ADN après différents temps de conservation de la composition, à 37°C, à 20°C et à 4°C.

	Ct (25 copies / PCR)			Ct (250 copies / PCR)			Ct (2500 copies / PCR)		
	37°C	20°C	4°C	37°C	20°C	4°C	37°C	20°C	4°C
J0	41,0 + 0,7	41,0 + 0,7	41,0 + 0,7	37,4 + 0,0	37,4 + 0,0	37,4 + 0,0	34,7 + 0,0	34,7 + 0,0	34,7 + 0,0
J21	41,1 + 3,7	39,7 + 0,0	40,3 + 0,2	34,9 + 0,0	36,0 + 0,8	37,0 + 0,1	32,0 + 0,0	33,0 + 0,6	33,9 + 0,1
J35	48,4 + 1,6	40,0 + 0,2	41,2 + 0,3	34,6 + 0,6	35,0 + 0,7	36,3 + 0,0	30,4 + 0,3	32,7 + 0,0	33,4 + 0,3
2 mois	> 50	41,2 + 4,4	42,1 + 0,7	> 50	36,5 + 0,0	37,2 + 0,4	45 + 1,2	33,4 + 0,1	34,5 + 0,6
3 mois	NT	38,4 + 0,2	40,9 + 0,2	NT	35,0 + 0,2	36,8 + 0,3	> 50	32,4 + 0,1	33,3 + 0,1
4 mois	NT	38,3 + 0,1	39,7 + 2,9	NT	35,4 + 0,5	36,8 + 0,0	NT	32,1 + 0,1	33,4 + 0,3
5 mois	NT	NT	39,8 + 0,1	NT	NT	37,3 + 0,5	NT	NT	34,5 + 0,5
6 mois	NT	40,6 + 0,7	40,0 + 0,6	NT	38,4 + 0,4	37,0 + 0,4	NT	34,6 + 0,2	34 + 0,4
9 mois	NT	> 50	40,2 + 0,5	NT	> 50	36,8 + 0,2	NT	> 50	33,9 + 0,2
12 mois	NT	NT	42 + 0,7	NT	NT	37,5 + 0,4	NT	NT	34,9 + 0,5

Une composition stable 21 jours à 37°C, est stable au moins 6 mois à
5 température ambiante et au moins 12 mois à 4°C.

En conclusion, l'ensemble des résultats présentés démontre une
stabilité des compositions supérieure à 6 mois à 20°C, et supérieure à 1 an à 4
10 °C et une stabilité plus longue à -20°C.

BIBLIOGRAPHIE

- 5 - Cayouette M, Sucharzuk A, Moores J, Tyagi S, and Kramer FR
(1999) Using molecular beacons to monitor PCR product formation. *Strategies*
Newsl. 12:85–88.
- Fahy et al. (1991) *PCR Meth. Appl.*, 1, 25-33
- Kwoh et al. (1989) *PNAS*, 86, 1173-1177
- 10 - Saiki et al., (1988), *Science*, 239:487
- Tyagi S and Kramer FR (1996) *Nature Biotechnol.*, 16, 303-308
- Walker et al. (1992) *P.N.A.S*, 89, 392-396
- 15

REVENDICATIONS

1. Composition liquide concentrée et tamponnée, pour l'amplification d'acides nucléiques, comprenant au moins un dNTP, au moins une enzyme
5 nécessaire à l'amplification, au moins une amorce oligonucléotidique, et au moins une sonde nucléotidique fluorescente, en présence d'au moins un polyol et/ou du polyvinylpyrrolidone (PVP).
2. Composition selon la revendication 1, comprenant un polyol et du
10 PVP.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, comprenant en outre un sel de magnésium ou de manganèse.
- 15 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle le polyol est choisi parmi le glycérol, le sorbitol, l'inositol et le penta-érythritol.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4 pour l'amplification d'acides nucléiques par PCR, comprenant dATP, dCTP, dGTP,
20 et l'un parmi dTTP ou dUTP, ainsi qu'au moins une enzyme nécessaire à la PCR, au moins deux amorces oligonucléotidiques, au moins une sonde nucléotidique fluorescente, en présence de polyol et/ou de PVP.
6. Composition selon l'une des revendications 1 à 4 pour
25 l'amplification d'acides nucléiques par RT-PCR, comprenant dATP, dCTP, dGTP, et l'un parmi dTTP ou dUTP, ainsi qu'au moins une enzyme nécessaire à la RT-PCR, au moins deux amorces oligonucléotidiques, au moins une sonde nucléotidique fluorescente, en présence de polyol et/ou de PVP.
- 30 7. Composition selon la revendication 4, comprenant au moins 5M de glycérol.

8. Composition selon la revendication 4, comprenant au moins 1M de sorbitol.

9. Composition selon la revendication 4, comprenant au moins 500 mM d'inositol.

10. Composition selon la revendication 4, comprenant au moins 250 mM de penta-érythritol.

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle le PVP est du PVP-10.

12. Composition selon la revendication 11, comprenant au moins 30 mM de PVP-10.

13. Procédé de préparation d'un mélange réactionnel complet pour l'amplification d'acides nucléiques, comprenant :

(i) la dilution d'une composition concentrée selon l'une des revendications 1 à 12, dans une solution saline tampon adaptée pour l'amplification des acides nucléiques ;

(ii) la mise en contact d'un échantillon d'acides nucléiques à amplifier avec un volume désiré de la composition diluée à l'étape (i).

14. Procédé de préparation d'un mélange réactionnel complet pour l'amplification d'acides nucléiques, comprenant :

(i) le mélange d'un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, dans une solution saline tampon adaptée pour l'amplification des acides nucléiques ;

(ii) l'ajout du mélange obtenu à l'étape (i) avec un volume désiré de la composition concentrée selon l'une des revendications 1 à 12.

15. Procédé d'amplification d'acides nucléiques, comprenant les étapes (i) et (ii) telles que définies à l'une des revendications 13 ou 14, et (iii) le démarrage de la réaction d'amplification des acides nucléiques présents dans

l'échantillon, amplification détectable au moyen du marqueur fluorescent porté par la sonde.

16. Procédé d'amplification selon la revendication 15, qui est une
5 RT-PCR en temps réel.

17. Procédé d'amplification selon la revendication 15, qui est une
PCR en temps réel.

10 18. Trousse pour l'amplification et/ou la détection d'acides
nucléiques, comprenant au moins un récipient contenant la composition
concentrée, telle que définie à l'une des revendications 1 à 12.

15 19. Trousse pour l'amplification et/ou la détection d'acides
nucléiques, comprenant un premier récipient contenant la composition
concentrée, telle que définie à l'une des revendications 1 à 12, et un deuxième
récipient contenant une solution saline tampon adaptée pour l'amplification des
acides nucléiques.

20 20. Trousse selon la revendication 19, dans laquelle la solution
saline tampon contient au moins l'un des ingrédients choisis parmi le TRIS à
une concentration d'au moins 8 mM, du sel de potassium ou de sodium à une
concentration d'au moins 8 mM, du sel d'ammonium à une concentration d'au
moins 5 mM, et du sel de magnésium ou de manganèse à une concentration
25 d'au moins 0,8 mM, les ingrédients étant utilisés seuls ou en mélange.

21. Utilisation de polyol et/ou de polyvinylpyrrolidone (PVP) pour
stabiliser à la fois des enzymes et des sondes nucléotidiques fluorescentes
dans une composition liquide.

30

22. Utilisation selon la revendication 21, dans laquelle le polyol et/ou
le PVP stabilise également les dNTP.

23. Utilisation selon la revendication 21 ou 22, dans laquelle la composition liquide est une composition concentrée et tamponnée, pour l'amplification d'acides nucléiques, comprenant au moins un dNTP, au moins une enzyme nécessaire à l'amplification, au moins une amorce oligonucléotidique, et au moins une sonde nucléotidique fluorescente.

24. Utilisation selon l'une des revendications 21 à 23, dans laquelle le polyol est choisi parmi le glycérol, le sorbitol, l'inositol et le penta-érythritol.

25. Utilisation selon l'une des revendications 21 à 23, dans laquelle le PVP est du PVP-10.

...RAD PAS.

1/2

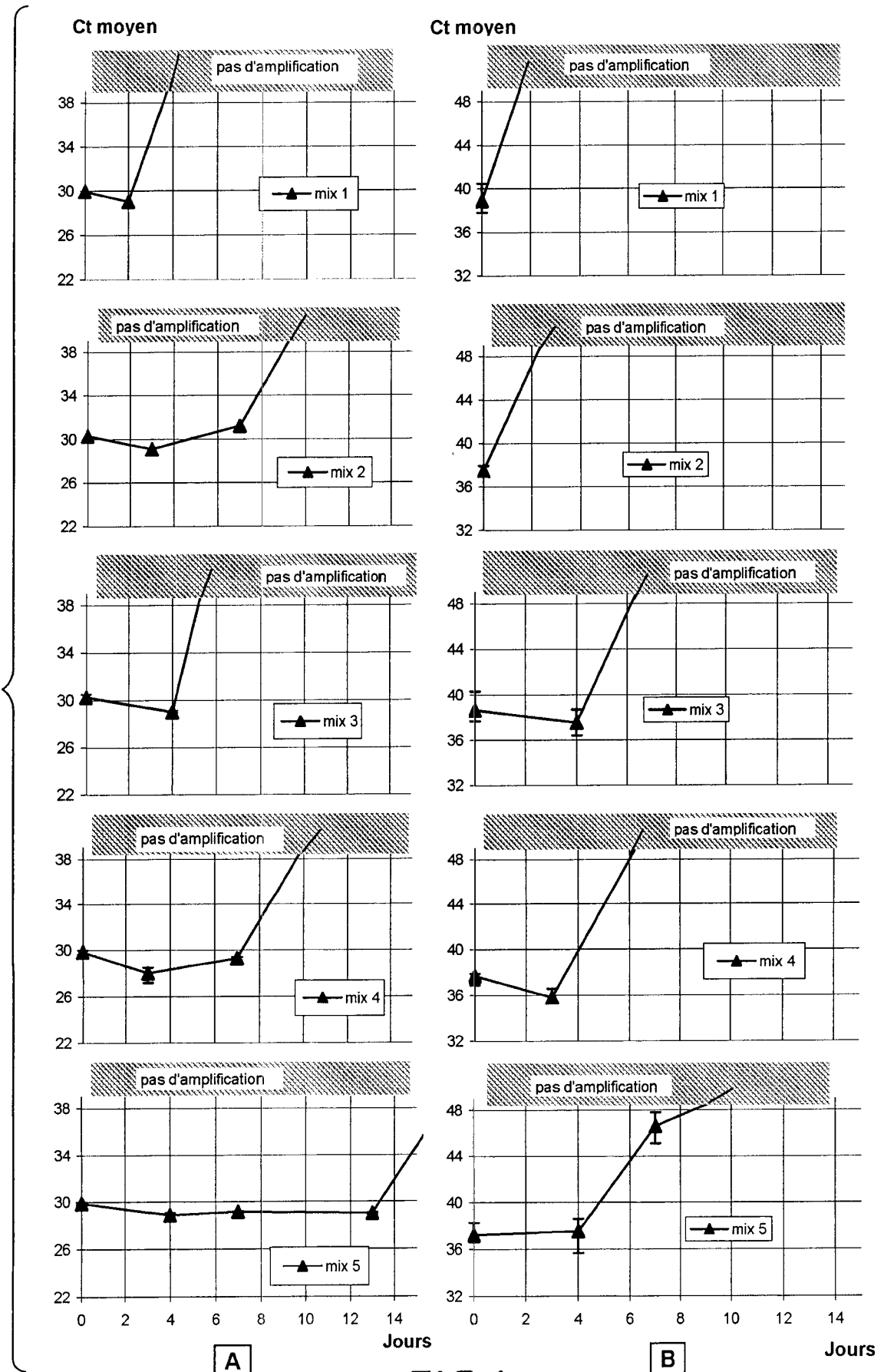
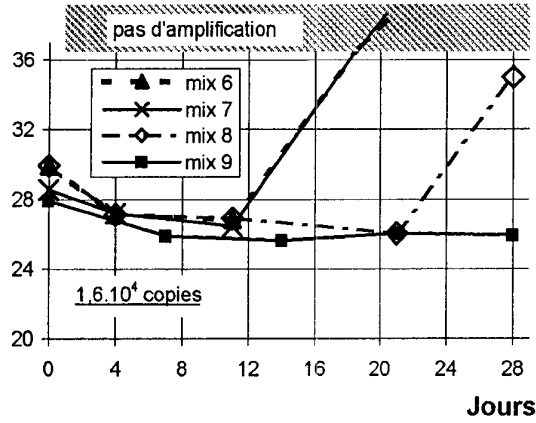


FIG.1

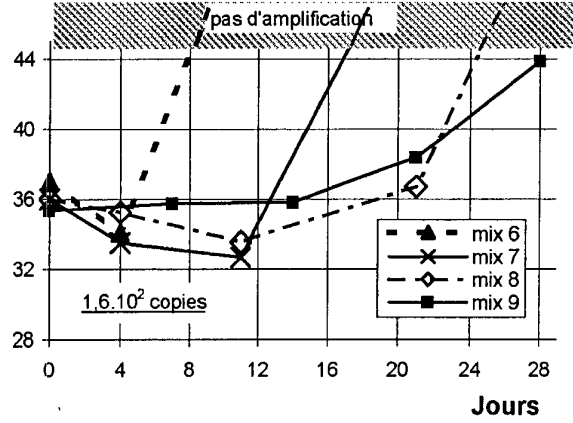
2/2

Sonde Fam-DabcyI

Ct moyen

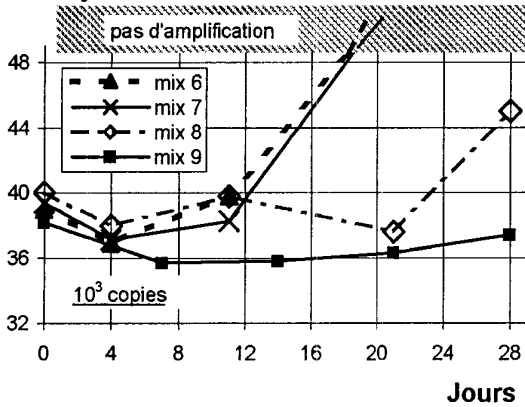


Ct moyen

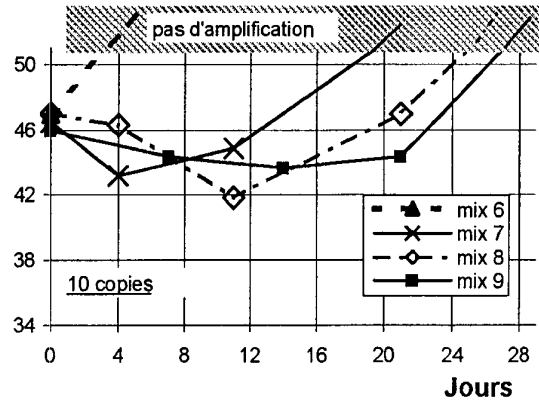


Sonde Tamra-DabcyI

Ct moyen



Ct moyen



Sonde Atto-590-DabcyI

Ct moyen

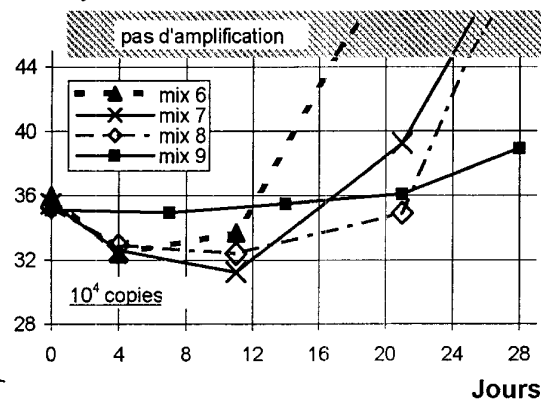


FIG.2



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 658505
FR 0412395

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>KOONJUL PRIYUM K ET AL: "Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 3, 1 février 1999 (1999-02-01), pages 915-916, XP002348231 ISSN: 0305-1048</p> <p style="text-align: center;">-----</p>		<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 octobre 2005		Guarinos Viñals, E	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0412395 FA 658505**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 07-10-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0915173	A	12-05-1999	AU 749765 B2	04-07-2002
			AU 8960398 A	27-05-1999
			CA 2249638 A1	04-05-1999
			JP 3458062 B2	20-10-2003
			JP 11225799 A	24-08-1999
			JP 2003189900 A	08-07-2003
			US 6077669 A	20-06-2000

EP 0678581	A	25-10-1995	AT 197071 T	15-11-2000
			BR 9501583 A	14-11-1995
			CA 2145719 A1	19-10-1995
			DE 69519122 D1	23-11-2000
			DE 69519122 T2	22-03-2001
			ES 2152995 T3	16-02-2001
			JP 2757979 B2	25-05-1998
			JP 8038199 A	13-02-1996

WO 9711196	A	27-03-1997	AU 702896 B2	11-03-1999
			AU 7019296 A	09-04-1997
			BR 9606653 A	04-11-1997
			CA 2204641 A1	27-03-1997
			EP 0796347 A2	24-09-1997
			JP 3092163 B2	25-09-2000
			JP 10500313 T	13-01-1998
			JP 2000300281 A	31-10-2000

US 2002009738	A1	24-01-2002	US 2003170631 A1	11-09-2003

US 2004121338	A1	24-06-2004	AUCUN	

EP 0726310	A	14-08-1996	AT 244759 T	15-07-2003
			AU 699590 B2	10-12-1998
			AU 4916796 A	27-08-1996
			CA 2210584 A1	15-08-1996
			DE 69628959 D1	14-08-2003
			DE 69628959 T2	13-05-2004
			ES 2202387 T3	01-04-2004
			JP 3282819 B2	20-05-2002
			JP 10503383 T	31-03-1998
			WO 9624664 A1	15-08-1996
			US 5556771 A	17-09-1996
			US 5614387 A	25-03-1997

US 5846701	A	08-12-1998	AUCUN	
