



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 739**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06012490 .6**

96 Fecha de presentación : **03.04.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1705253**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Composiciones y métodos para la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR).**

30 Prioridad: **03.04.1997 US 42629 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.03.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.03.2011**

73 Titular/es: **LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION**  
**5791 Van Allen Way**  
**Carlsbad, California 92008, US**

72 Inventor/es: **Lee, Jun E. y**  
**Rashtchian, Ayoub**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 739 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

Composiciones y métodos para la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR).

5 **Campo de la invención**

La presente invención está en los campos de la biología molecular y celular.

10 La invención se refiere particularmente a composiciones y procedimientos útiles para la amplificación de las moléculas de ácido nucleico por la reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR). Específicamente, la invención proporciona composiciones y procedimientos para la amplificación de las moléculas de ácido nucleico en un procedimiento RT-PCR simplificado de una o dos etapas mediante el uso de combinaciones de enzimas transcriptasa inversa y ADN polimerasa termoestable en conjunto con moléculas que contienen acetato (o combinaciones de moléculas que contienen azufre y moléculas que contienen acetato) y opcionalmente albúmina sérica bovina. La invención de este modo facilita la amplificación rápida y eficiente de las moléculas de ácido nucleico y la detección y cuantificación de las moléculas de ARN. La invención también es útil en la producción y amplificación rápida de los ADNc (cadena simple y cadena doble) que se pueden usar para una variedad de propósitos industriales, médicos y forenses.

20 **Antecedentes de la invención***Transcripción inversa de ARN*

25 El término “transcriptasa inversa” describe una clase de polimerasas caracterizada como ADN polimerasas dependiente de ARN. Todas las transcriptasas inversas conocidas requieren un cebador para sintetizar un transcripto de ADN desde un molde de ARN. Históricamente, la transcriptasa inversa se ha usado principalmente para transcribir ARNm en ADNc que posteriormente se puede clonar en un vector para la manipulación adicional.

30 La transcriptasa inversa del virus de la mioblastosis aviar (AMV) fue la primera ADN polimerasa dependiente de ARN ampliamente usada (Verma, Biochim. Biophys. Acta 473:1 (1977)). La enzima tiene actividad de ADN polimerasa dirigida al ARN 5’-3’, actividad de ADN polimerasa dirigida a ADN 5’-3’ y actividad de ARNasa H. ARNasa H es una ribonucleasa procesiva 5’ y 3’ específica para la cadena de ARN para los híbridos ARN-ADN (Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, New York: Wiley & Sons (1984)). Los errores de transcripción no se pueden corregir con la transcriptasa inversa porque las transcriptasas inversas virales conocidas carecen de actividad de exonucleasa 3’-5’ necesaria para la corrección (Saunders y Saunders, Microbial Genetics Applied to Biotechnology, London: Croom Helm (1987)). Un estudio detallado de la actividad de la transcriptasa inversa de AMV y su actividad de ARNasa H asociada ha sido presentada por Berger *et al.*, Biochemistry 22:2365-2372 (1983).

40 Otra transcriptasa inversa que se usa intensamente en la biología molecular es la transcriptasa inversa originada del virus de leucemia murina Moloney (M-MLV). Ver, por ejemplo, Gerard, G.R., ADN 5:271-279 (1986) y Kotewicz, M.L., *et al.*, Gene 35:249-258 (1985). También se ha descrito la transcriptasa inversa de M-MLV que carece sustancialmente de actividad de ARNasa H. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Núm. 5,244,797.

*Amplificación por PCR del ARN*

45 Las transcriptasas inversas se han usado extensamente en la transcripción inversa del ARN antes de la amplificación por PCR. Este procedimiento, a menudo denominado como ARN-PCR o RT-PCR, es ampliamente usado para la detección y cuantificación del ARN.

50 Para tratar de resolver los problemas técnicos a menudo asociados con la RT-PCR, se han desarrollado numerosos protocolos que toman en cuenta las tres etapas básicas del procedimiento: (a) la desnaturalización del ARN y la hibridación del cebador inverso, (b) la síntesis de ADNc; y (c) amplificación por PCR. En el llamado procedimiento RT-PCR “no acoplado” (por ejemplo, RT-PCR de dos etapas), la transcripción inversa se realiza como una etapa independiente mediante el uso de la condición de buffer óptima para la actividad de transcriptasa inversa. Después de la síntesis de ADNc, la reacción se diluye para disminuir el  $MgCl_2$  y las concentraciones de trifosfato de desoxirribonucleósido (dNTP) para las condiciones óptimas para la actividad de ADN polimerasa Taq, y se lleva a cabo una PCR de acuerdo con condiciones estándares (ver Patentes U.S. Núm. 4.683.195 y 4.683.202). Por contraste, los procedimientos RT-PCR “acoplados” usan un buffer común o comprometido para las actividades de transcriptasa inversa y ADN polimerasa Taq. En una versión, el apareamiento del cebador inverso es una etapa separada precedente a la adición de enzimas, que posteriormente se añade al recipiente de reacción único. En otra versión, la actividad de transcriptasa inversa es un componente de la ADN polimerasa Taq termoestable. El apareamiento y la síntesis del ADNc se realizan en presencia de  $Mn^{++}$ , posteriormente se realiza la PCR en presencia de  $Mg^{++}$  después de la eliminación del  $Mn^{++}$  por un agente quelante. Finalmente, el procedimiento “continuo” (por ejemplo, RT-PCR de una etapa) integra las tres etapas de RT-PCR en una reacción continua única que evita la apertura del tubo de reacción para la adición del componente o enzima. Se ha descrito la RT-PCR continua como un sistema de enzima único mediante el uso de la actividad de transcriptasa inversa de ADN polimerasa Taq termoestable y polimerasa Tth y como un sistema de dos enzimas mediante el uso de ADN polimerasa AMV-RT y Taq en el que se omitió la etapa de desnaturalización del ARN inicial de 65°C.

Los intentos para hacer más eficiente el proceso de RT-PCR no han sido fáciles y varios informes han documentado una interferencia entre la transcriptasa inversa y ADN polimerasa Taq termoestable cuando se usan en combinación en una RT-PCR de tubo único por baja sensibilidad o falta de resultados. Por ejemplo, ha habido al menos un informe de una inhibición general de la ADN polimerasa Taq cuando se mezcla con las transcriptasas inversas en mezclas de RT-PCR de una etapa/un tubo (Sellner, L.N., *et al.*, Nucl. Acids Res. 20(7):1487-1490 (1992)). Este mismo informe indicó que la inhibición no se limitó a un tipo de RT: tanto AMV-RT como M-MLV-RT inhibieron la ADN polimerasa Taq y limitaron la sensibilidad de la RT-PCR. En las condiciones de reacción usadas en los estudios de Sellner *et al.* (67 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 17 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 6  $\mu\text{M}$  de EDTA, 0,2 mg/ml de gelatina), se halló que el grado de inhibición de Taq polimerasa aumenta con la concentración creciente de RT, hasta una relación de aproximadamente 3 unidades de RT:2 unidades de ADN polimerasa Taq más allá de que Taq polimerasa se volvió completamente inactiva.

Otros informes describen intentos de desarrollar condiciones para las reacciones de RT-PCR de una etapa. Por ejemplo, se ha informado el uso de AMV-RT para la RT-PCR de una etapa en buffer que comprende 10 mM de Tris-HCl, (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , y 0,01% de gelatina (Aatsinki, J.T., *et al.*, BioTechniques 16(2):282-288 (1994)), mientras que otro informe demostró la RT-PCR de una etapa mediante el uso de una composición que comprende ADN polimerasa AMV-RT y Taq en un buffer que consiste en 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 0,01% de gelatina y 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Mallet, F., *et al.*, BioTechniques 18(4):678-687 (1995)). En las condiciones de reacción usadas en este último informe, la sustitución de M-MLV-RT (formas de ARNasa H+ o ARNasa H+) para AMV-RT mostró la misma actividad que en la reacción RT-PCR continua.

### Breve compendio de la invención

La presente invención se refiere generalmente a las composiciones y procedimientos útiles para la RT-PCR una etapa/un tubo, mediante el uso de M-MLV-RT, o sus derivados ARNasa deficiente en H ("ARNasa H+"), en combinación con una o más ADN polimerasas, en presencia de moléculas que contienen acetato (o combinaciones de moléculas que contienen azufre y moléculas que contienen acetato) para aliviar la inhibición de PCR observada a menudo cuando se usan composiciones que comprenden dos o más enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa, en la que la molécula que contiene acetato proporciona el ion acetato en una concentración de aproximadamente 60 mM.

En particular, la invención se refiere a los procedimientos para amplificar una molécula de ácido nucleico que comprende (a) mezclar un molde de ARN con una composición que comprende una transcriptasa inversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV), que preferentemente está sustancialmente reducida en cuando a la actividad de ARNasa H y que con máxima preferencia es SuperScript I o SuperScript II, en combinación con una o más ADN polimerasas y una o más moléculas que contienen acetato, en que la concentración de iones acetato es aproximadamente 60 mM para formar una mezcla; y (b) incubar la mezcla en condiciones suficientes para amplificar una molécula de ADN complementario con el total o una porción del molde de ARN.

En realizaciones preferidas de tales procedimientos, las ADN polimerasas usadas son ADN polimerasas termoestables, y con máxima preferencia Tne, Tma, Taq, Pfu, Tth, VENT, DEEPVENT, Pwo, Tfl, o una mutante, variante o derivado de estas; en este aspecto de la invención la más preferida es la ADN polimerasa Taq.

En otros aspectos preferidos de la invención, las ADN polimerasas puede comprender una primera ADN polimerasa que tiene actividad de 3' exonucleasa, con máxima preferencia una ADN polimerasa seleccionada del grupo que consiste en Pfu, Pwo, DEEPVENT, VENT, Tne, Tma, Kod, y sus mutantes, variantes y derivados, y una segunda ADN polimerasa que tiene actividad de 3' exonucleasa sustancialmente reducida, con máxima preferencia una ADN polimerasa seleccionada del grupo que consiste en Taq, Tfl, Tth, y sus mutantes, variantes y derivados. En aspectos adicionales preferidos de la invención, la relación de unidades de la transcriptasa inversa a las ADN polimerasas es de aproximadamente 0,2:2 a aproximadamente 500:2, y en aspectos particularmente preferidos la relación es de aproximadamente 0,5:2 a aproximadamente 250:2 o mayor que aproximadamente 3:2.

La concentración de una o más moléculas que contienen acetato es de aproximadamente 60 mM. La invención también se refiere a procedimientos tales en el que la fuente de las moléculas que contienen acetato es un buffer o una sal que contiene acetato que puede ser acetato de amonio, acetato de magnesio, TRIS-acetato, o acetato de manganeso, así como otros buffer y sales que contienen acetato que serán familiares para los expertos en la técnica.

La invención se refiere a tales procedimientos en los que la mezcla además comprende una o más nucleótidos, preferentemente trifosfatos de desoxirribonucleósido (con máxima preferencia dATP, dUTP, dTTP, dGTP o dCTP), trifosfatos de desoxirribonucleósido (con máxima preferencia ddATP, ddUTP, ddGTP, ddTTP o ddCTP) o sus derivados. Tales nucleótidos opcionalmente se pueden marcar en forma detectable (por ejemplo, con una marca detectable radiactiva o no radiactiva).

La invención también se refiere a tales procedimientos en los que la mezcla además comprende uno o más cebadores de oligonucleótidos, que preferentemente son cebadores oligo(dT), cebadores aleatorios, cebadores arbitrarios o cebadores específicos del blanco, y que es más preferentemente un cebador específico del gen.

## ES 2 355 739 T3

La invención también se refiere a tales procedimientos en los que la etapa de incubación comprende (a) incubar la mezcla a una temperatura (con máxima preferencia una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 60°C) y durante un tiempo suficiente para obtener una molécula de ADN complementaria con el total o una porción del molde de ARN; y (b) incubar la molécula de ADN complementaria con el molde de ARN a una temperatura y durante un tiempo suficiente para amplificar la molécula de ADN, preferentemente por medio de termociclado, más preferentemente termociclado que comprende alternar calentamiento y enfriamiento de la mezcla suficiente para amplificar dicha molécula de ADN, y con máxima preferencia termociclado que comprende alternar desde un primer intervalo de temperatura de aproximadamente 90°C a aproximadamente 100°C, a un segundo intervalo de temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 75°C, preferentemente de aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C. En aspectos de la invención particularmente preferidos, el termociclado se realiza más de 10 veces, más preferentemente más de 20 veces.

La invención también se refiere a procedimientos en los que la amplificación no está sustancialmente inhibida.

La invención también se refiere a procedimientos para amplificar una molécula de ácido nucleico que comprende (a) mezclar un molde de ARN con una composición que comprende una transcriptasa inversa del virus de leucemia murina Moloney (M-MLV), que preferentemente está sustancialmente reducida en cuanto a la actividad de ARNasa H, en combinación con una o más ADN polimerasas (con máxima preferencia seleccionada del grupo que consiste en Tne, Tma, Taq, Pfu, Tth, VENT, DEEPVENT, Pwo, Tfl, y sus mutante, variantes o derivados), una o más moléculas que contienen acetato para proporcionar el ion acetato en una concentración de aproximadamente 60 mM y una o más moléculas que contienen potasio, para formar una mezcla; y (b) incubar la mezcla en condiciones suficientes para amplificar una molécula de ADN complementario con el total o una porción del molde de ARN.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden una transcriptasa inversa del virus de leucemia murina Moloney (M-MLV), una o más ADN polimerasas y una o más moléculas que contienen acetato (en el que la concentración de acetato es aproximadamente 60 mM), o combinaciones de una o más moléculas que contienen azufre y una o más moléculas que contienen acetato en las concentraciones anteriores.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención serán evidentes para los expertos a la luz de los siguientes dibujos y la descripción de la invención, y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una fotografía de un gel teñido con bromuro de etidio (EtdBr) que demuestra la inhibición de RT-PCR por la transcriptasa inversa. Las calles 1, 10, 11 y 20 contienen fragmentos de ADN de tamaño de 100 pb.

La Figura 2A es una fotografía de un gel teñido con EtdBr que demuestra el papel protector de la albúmina sérica bovina (BSA) en RT-PCR de ARNm de  $\beta$ -actina de 100 pg de molde de ARNm total de HeLa. La calle 1 contiene un fragmento del tamaño de ADN, y la flecha indica la secuencia blanco de  $\beta$ -actina de 1026 pb.

La Figura 2B es una fotografía de gel teñido con EtdBr que demuestra el papel protector de la BSA en RT-PCR de ARNm de CAT de  $10^5$  copias de molde de ARNm de CAT. La calle 1 contiene un fragmento del tamaño de ADN, y la flecha indica la secuencia blanco de CAT de 653 pb.

La Figura 3 es una fotografía de gel teñido con EtdBr que demuestra el desempeño de varias RT en buffer que contienen ion sulfato o BSA. Calle 1: fragmento del tamaño de ADN de 100 pb; Calles 2-5: 5 unidades/reacción de AMV-RT; Calles 6-9: 5 unidades/reacción de M-MLV-RT; Calles 10-13: 5 unidades/reacción de M-MLV-RT (ARNasa H<sup>+</sup>). La flecha indica la secuencia blanco de CAT de 500 pb.

La Figura 4 es una fotografía de gel teñido con EtdBr que demuestra el efecto de la temperatura de reacción de la transcripción inversa sobre la formación de producto de RT-PCR. Las muestras duplicadas de 100 ng (calles 1-6) o 10 ng (calles 7-12) del ARN total de HeLa se transcribió en forma inversa en las temperaturas indicadas, y se amplificaron una secuencia blanco de la subunidad  $\epsilon$  de ADN polimerasa III de 606 pb (calles 1-6) o una secuencia blanco de 253 pb de  $\beta$ -actina (calles 7-12) por PCR. M: marcadores de tamaño de ADN.

La Figura 5 es una fotografía de gel teñido con EtdBr que demuestra el mejor rendimiento de los productos de RT-PCR obtenidos por la realización de la reacción de RT a temperaturas superiores. Las muestras duplicadas de 10 ng de ARN total de tabaco (calles 1-6) o de 100 ng de ARN total del HeLa (calles 7-12) se transcribieron en forma inversa a 45°C (calles 1, 2, 7 y 8), 50°C (calles 3, 4, 9 y 10) o 55°C (calles 5, 6, 11 y 12), y una secuencia blanco de GADPH 500 pb (punta de flecha; calles 1-6) o una secuencia blanco de una subunidad  $\epsilon$  de ADN polimerasa III de 1475 pb (flecha; calles 7-12) se amplificaron por PCR. M: marcadores de tamaño de ADN; L: fragmento de tamaño de ácido nucleico de 100 pb.

La Figura 6 es una fotografía de gel teñido con EtdBr que demuestra la sensibilidad y eficiencia de la invención en RT-PCR de productos grandes (2-3 kb). Un fragmento de esclerosis tuberosa II de 2,78 kb se amplificó a partir de varias cantidades de ARN total del HeLa que se transcribió en forma inversa mediante el uso de las composiciones de la invención sin (calles 1-6) o con (calles 7-12) la adición de 1  $\mu$ l de mezcla de enzima ELONGASA o mediante el

## ES 2 355 739 T3

uso de un kit de RT del proveedor A (calles 13-18). Las calles 1, 2, 7, 8, 13 y 14: 1 ng de ARN de HeLa; Calles 3, 4, 9, 10, 15 y 16: 10 ng de ARN de HeLa; Calles 5, 6, 11, 12, 17 y 18: 100 ng de ARN de HeLa; M: marcadores de tamaño de ADN.

5 La Figura 7 es una fotografía de gel teñido con EtdBr que demuestra la sensibilidad y eficiencia de la invención en RT-PCR de productos largos (> 3 kb). 100 ng de ARN total del HeLa se transcribió en forma inversa mediante el uso de las composiciones de la invención con la adición de 1  $\mu$ l de mezcla de enzima ELONGASA, y los fragmentos del gen de coli de poliposis adenomatosa que era de 7,3 kb (calles 1, 2), 7,7 kb (calles 3, 4) o 8,9 kb (calles 5, 6) de tamaño se amplificaron por PCR. M: marcadores de tamaño de ADN (digesto de HindII de  $\lambda$  ADN).

10

### Descripción detallada de la invención

#### *Panorama*

15 La presente invención se refiere a las composiciones y procedimientos para usar en la producción de la reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) y análisis de los ácidos nucleicos. En particular, la invención proporciona composiciones que comprenden una o más moléculas que contienen acetato, para proporcionar ion acetato en una concentración de aproximadamente 60 mM, transcriptasa inversa M-MLV, una o más ADN polimerasas, una o más cebadores, uno o más nucleótidos y un buffer adecuado. Estas composiciones se pueden usar en los procedimientos de la invención para producir, analizar, cuantificar y manipular de otro modo las moléculas de ácido nucleico mediante el uso de un procedimiento de RT-PCR de una o dos etapas.

20

#### *Composiciones*

25

El buffer en las composiciones de la invención proporciona condiciones de pH y iones apropiadas para las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa y enzimas de ADN polimerasa. Los nucleótidos usados en las composiciones (por ejemplo, trifosfatos de desoxirribonucleósido (dNTP)), y las moléculas de ácido nucleico del cebador proporcionan los sustratos para la síntesis o amplificación de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Las composiciones de la invención también pueden incluir los reactivos de inhibición-reducción para asistir en la superación de la inhibición en las reacciones de RT-PCR.

30

#### *Buffer y condiciones iónicas*

35

El buffer y las condiciones iónicas de las presentes composiciones se han optimizado para reducir la inhibición mediada por RT de la RT-PC. Las composiciones preferidas de la invención comprenden una o más moléculas de acetato para proporcionar ion acetato en una concentración de aproximadamente 60 mM o una combinación de una o más moléculas que contienen azufre y una o más moléculas que contienen acetato.

40

Las moléculas que contienen acetato se deben formular en las composiciones para proporcionar una concentración de ion acetato en la solución de aproximadamente 60 mM.

Las moléculas que contienen acetato se formulan preferentemente en las presentes composiciones en la forma de una o más sales o buffers. Los ejemplos de sales que contienen acetato adecuadas de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, acetato de amonio, acetato de magnesio, acetato de manganeso, acetato de potasio, acetato de sodio y similares. Los ejemplos de buffer que contienen acetato adecuados de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, TRIS-acetato (tris[{{hidroximetil}}aminometano]acetato), ADA (ácido N-[2-acetamido]-2-iminodiacético), y acetato de imidazol (ácido 2-hidroxi-3-[4-imidazolil]-propiónico).

50

De acuerdo con la invención, se pueden formular una o más moléculas que contienen potasio en las presentes composiciones para sustituir, y de este modo reducir el requerimiento de concentración para el azufre. En este aspecto de la invención, la adición de moléculas que contienen azufre y moléculas que contienen potasio disminuye el requerimiento de concentración para el azufre en aproximadamente 13-75%, preferentemente en aproximadamente 25-50%. Por ejemplo, cuando las moléculas que contienen potasio se formulan en las presentes composiciones, la concentración de moléculas que contienen azufre se puede reducir de aproximadamente 18 mM a aproximadamente 2-14 mM, o preferentemente a aproximadamente 4-9 mM. Se entenderá, obviamente, que los uno o más iones de potasio también se pueden usar en las composiciones de la invención descritas antes que contienen una o más moléculas de acetato en vez de, o además de, la una o más moléculas que contienen azufre.

60

Las moléculas que contienen potasio se deben formula en las composiciones a una concentración preferida de al menos 2 mM, preferentemente al menos 5 mM, aún más preferentemente al menos 10 mM, y con máxima preferencia al menos 20 mM. Los intervalos de concentración particularmente preferidos de moléculas que contienen potasio en las presentes composiciones incluyen aproximadamente 2 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 75 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM y aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM.

65

## ES 2 355 739 T3

Las moléculas que contienen potasio preferentemente se formulan en las presentes composiciones en la forma de una o más sales o buffer. Los ejemplos de sales de potasio adecuadas de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, sulfato de potasio, sulfito de potasio, cloruro de potasio, nitrato de potasio y similares. Los más preferidos son cloruro de potasio, sulfato de potasio y acetato de potasio. Los buffers de potasio preferidos de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, fosfato de potasio (monobásico), fosfato de potasio (dibásico) y similares. Otras sales y buffer de potasio, y otras moléculas que contienen potasio, adecuadas para el uso en las presentes composiciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

Las moléculas y buffers que contienen azufre, acetato o potasio que son adecuadas para usar en las presentes composiciones están disponibles en el comercio a partir de una amplia variedad de fuentes, por ejemplo, de Sigma (St. Louis, Missouri).

### Enzimas transcriptasa inversa

Las composiciones de la presente invención también comprenden enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa. De acuerdo con la presente invención, las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa son transcriptasas inversas del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV). Las enzimas preferidas para usar en la invención incluyen las que están sustancialmente reducidas en cuanto a la actividad de ARNasa H. Por una enzima "sustancialmente reducida en cuanto a la actividad de ARNasa H" se entiende que la enzima tiene menos que aproximadamente 20%, más preferentemente menos que aproximadamente 15%, 10% o 5%, y con máxima preferencia menos que aproximadamente 2%, de la actividad de ARNasa H de una enzima tipo salvaje o ARNasa H<sup>+</sup> tal como transcriptasa inversa M-MLV tipo salvaje. La actividad de ARNasa H se puede determinar por una variedad de ensayos, tales como los descritos, por ejemplo, en la Patente U.S. Núm. 5.244.797, en Kotewicz, M.L., *et al.*, Nucl. Acids Res: 16:265 (1988) y en Gerard, G.F., *et al.*, FOCUS 14(5):91 (1992), cuyas descripciones se incorporan por completo en la presente por referencia.

Las enzimas particularmente preferidas para usar en la invención incluyen, pero sin limitación, transcriptasa inversa M-MLV (ARNasa H- o sustancialmente reducida en la actividad de ARNasa H), y transcriptasa inversa RSV (ARNasa H- o sustancialmente reducida en la actividad de ARNasa H). Las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa están disponibles en el comercio (por ejemplo, SUPERSCRIP<sup>TM</sup>, SUPERSCRIPT II<sup>TM</sup> y M-MLV, disponible en Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland).

### ADN polimerasas

Las composiciones de la invención también comprenden una o más ADN polimerasas, que son preferentemente ADN polimerasas termoestables. Estas ADN polimerasas se pueden aislar de fuentes naturales o recombinantes, por técnicas que son bien conocidas en la técnica (Ver WO 92/06200, Patentes U.S. Núm. 5.455.170 y 5.466.591, WO 96/10640 y Solicitud de Patente U.S. Núm. 08/370.190, presentada el 9 de enero de 1995, cuyas descripciones se incorporan en la presente por referencia), a partir de una variedad de bacterias termófilas que están disponibles en el comercio (por ejemplo, de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) o se pueden obtener por técnicas de ADN recombinante (ver, por ejemplo, WO 96/10640 y Solicitud de Patente U.S. Núm. 08/370,190, presentada el 9 de enero de 1995). Son adecuadas para usar como fuentes de polimerasas termoestables o los genes de estas para la expresión en sistemas recombinantes las bacterias termófilas *Thermus thermophilus*, *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woosii* y otras especies del género *Pyrococcus*, *Bacillus sterothermophilus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus brockianus*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga maritima* y otras especies del género *Thermotoga*, y *Methanobacterium thermoautotrophicum*, y sus mutantes, variantes o derivados. Se entiende, sin embargo, que las ADN polimerasas termoestables de otros organismos también se pueden usar en la presente invención sin apartarse del alcance o las realizaciones preferidas de estas. Como alternativa al aislamiento, las ADN polimerasas termoestables están disponibles en el comercio en, por ejemplo, Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland), New England BioLabs (Beverly, Massachusetts), Finnzymes Oy (Espoo, Finlandia), Stratagene (La Jolla, California), Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, Indiana) y Perkin Elmer Cetus (Norwalk, Connecticut).

Las ADN polimerasas termoestables particularmente preferidas para usar en las composiciones y los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, ADN polimerasas Taq, Tne, Tma, Tli/VENT<sup>TM</sup>, DEEPVENT<sup>TM</sup>, Pfu, Pwo, Tfi o Tth, o sus mutantes o derivados. La ADN polimerasa Taq está disponible en el comercio, por ejemplo de Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland), o se puede aislar de su fuente natural, la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que se describió previamente (Patentes U.S. Núm. 4.889.818 y 4.965.188). La ADN polimerasa se puede aislar de su fuente natural, la bacteria termófila *Thermotoga neapolitana* (Ver WO 96/10640 y Solicitud de Patente U.S. Núm. 08/370,190, presentada el 9 de enero de 1995), y ADN polimerasa Tma de su fuente natural, la bacteria termófila *Thermotoga maritima* (Ver Patente U.S. Núm. 5.374.553, cuya descripción se incorpora en la presente por referencia). Los procedimientos para producir mutantes y derivados de las ADN polimerasas termófilas, particularmente las Tne y Tma polimerasas, se describen en la Solicitud de Patente U.S. en trámite Núm. 08/689.807 de Deb. K Chatterjee, y en la solicitud de Patente U.S. en trámite Núm. 08/689,818 de Deb K Chatterjee y A. John Hughes, ambas presentadas el 6 de septiembre de 1996, que se incorporan por referencia en la presente en su totalidad. Tfi, Tli/VENT<sup>TM</sup> y DEEPVENT<sup>TM</sup> están disponibles en el comercio (por ejemplo, en New England BioLabs;

## ES 2 355 739 T3

Beverly, Massachusetts), o se pueden producir como se describe (Bej, A.K., y Mahbubani, M.H., en: PCR Technology: Current Innovations, Griffin, H.G., y Griffin, A.M., eds., CRC Press, pp. 219-237 (1994) para Tli/VENT™; Flaman, J.-M., *et al.*, Nucl. Acids Res. 22(15):3259-3260 (1994) para DEEPVENT™). Las ADN polimerasas termoestables se añaden preferentemente a las presentes composiciones en una concentración final en solución de aproximadamente 0,1-200 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-50 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-40 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-36 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-34 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-32 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-30 unidades por mililitro, o aproximadamente 0,1-20 unidades por mililitro, y con máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 20 unidades por mililitro.

En composiciones preferidas de la invención, la concentración de ADN polimerasas se determina como una relación de la concentración de las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa. En consecuencia, en composiciones particularmente preferidas la relación de unidades de las enzimas transcriptasa inversa a las enzimas ADN polimerasas varía de aproximadamente 0,2:2 a aproximadamente 500:2, preferentemente de aproximadamente 0,5:2 a aproximadamente 250:2 y con máxima preferencia una relación mayor que 3:2. Obviamente, otras relaciones adecuadas de unidades de actividades de enzimas transcriptasa inversa a ADN polimerasas adecuadas para usar en la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

### Reactivos de inhibición-reducción

De acuerdo con los procedimientos de la invención, uno o más agentes de inhibición-reducción adicionales se pueden añadir opcionalmente a las presentes composiciones para ayudar a superar la inhibición de las reacciones de RT-PCR por las RT tales como RT M-MLV. Los agentes de inhibición-reducción preferidos para usar en las presentes composiciones incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas tales como (pero sin limitación) albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, ovalbúmina, Albumax, caseína, gelatina, colágeno, globulina, lisozima, transferrina, mioglobina, hemoglobina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, fumarasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), amiloglucosidasa, anhidrasa carbónica,  $\beta$ -lactoglobulina, aprotinina, inhibidor de tripsina de soja, tripsinógeno, fosforilasa b, miosina, actina,  $\beta$ -galactosidasa, catalasa, digestos de soja trópticos, triptosa, lectinas y similares, o sus fragmentos o derivados. Son particularmente preferidos para usar en las composiciones y los procedimientos de la invención albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, Albumax y caseína. Los péptidos, polipéptidos o proteína preferentemente se añaden a las composiciones para obtener una concentración final en la solución de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100  $\mu$ g/ml, preferentemente aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100  $\mu$ g/ml, más preferentemente aproximadamente 1 a aproximadamente 50  $\mu$ g/ml y con máxima preferencia aproximadamente 2 a aproximadamente 20  $\mu$ g/ml.

### dNTP

Las composiciones de la invención además comprenden uno o más nucleótidos (por ejemplo, trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP)). Los componentes nucleotídicos de las presentes composiciones sirven como los "bloques de construcción" para los ácidos nucleicos recién sintetizados, que se incorporan en la presente por la acción de las transcriptasa inversas o ADN polimerasas. Los ejemplos de nucleótidos adecuados para usar en las presentes composiciones incluyen, pero sin limitación, dUTP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dITP, 7-deaza-dGTP,  $\alpha$ -tio-dATP,  $\alpha$ -tio-dTTP,  $\alpha$ -tio-dGTP,  $\alpha$ -tio-dCTP o sus derivados, los cuales están disponibles en el comercio provenientes de fuentes que incluyen Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland), New England BioLabs (Beverly, Massachusetts) y Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri). Los dNTP pueden ser no marcados, o pueden estar marcados de forma detectable por acoplamiento a ellos por procedimientos conocidos en la técnica con radioisótopos (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ), vitaminas (por ejemplo, biotina), restos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, o ficoeritrina), marcas quimioluminiscentes, dioxigenina y similares. Los dNTP marcados también se pueden obtener comercialmente, por ejemplo en Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland) o Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri). En las presentes composiciones, los dNTP se añaden para dar una concentración de trabajo de cada dNTP de aproximadamente 10-1000 micromolar, aproximadamente 10-500 micromolar, aproximadamente 10-250 micromolar, o aproximadamente 10-100 micromolar, y con máxima preferencia una concentración de aproximadamente 100 micromolar.

### Cebadores

Además de los nucleótidos, las presentes composiciones comprenden uno o más cebadores que facilitan la síntesis de una primera molécula de ADN complementaria con el total o una porción de un molde de ARN (por ejemplo, una molécula de ADNc de cadena simple). Tales cebadores también se pueden usar para sintetizar una molécula de ADN complementario con el total o una porción de la primera molécula de ADN, de este modo se forma una molécula de ADNc de cadena doble. Adicionalmente, estos cebadores se pueden usar para amplificar moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Tales cebadores incluyen, pero sin limitación, los cebadores específicos del blanco (que son preferentemente cebadores específico del gen), cebadores oligo(dT), cebadores aleatorios o cebadores arbitrarios. Los cebadores adicionales que se pueden usar para la amplificación de las moléculas de ADN de acuerdo con los procedimientos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

## ES 2 355 739 T3

### *Procedimientos de RT-PCR*

En la reacción de RT-PCR, las mezclas de reacción se incuban a una temperatura suficiente para sintetizar una molécula de ADN complementaria con el total o una porción del molde de ARN. Tales condiciones normalmente varían de aproximadamente 20°C a 75°C, más preferentemente de aproximadamente 35°C a 60°C y con máxima preferencia de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C. Después de la reacción de transcripción inversa, la reacción se incubaba a una temperatura suficiente para amplificar la molécula de ADN sintetizada. Preferentemente la amplificación se obtiene por medio de una o más reacciones en cadena de polimerasa (PCR). Las condiciones preferidas para la amplificación comprenden el termociclado, que puede comprender alternar calentamiento y enfriamiento de la mezcla suficiente para amplificar la molécula de ADN y que con máxima preferencia comprende alternar de un primer intervalo de temperatura de aproximadamente 90°C a aproximadamente 100°C, a un segundo intervalo de temperatura de aproximadamente 45°C a aproximadamente 75°C, más preferentemente de aproximadamente 50°C a aproximadamente 75°C o de aproximadamente 55°C a aproximadamente 75°C, y con máxima preferencia de aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C. De acuerdo con la invención, el termociclado se puede realizar cualquier número de veces, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 veces, más preferentemente mayor que aproximadamente 10 veces y con máxima preferencia mayor que aproximadamente 20 veces.

Las composiciones y los procedimientos de la presente invención también se pueden usar para la producción, análisis y cuantificación de moléculas de ácido nucleico más grandes (por ejemplo, por "PCR larga" o "RT-PCR larga"), preferentemente las moléculas de ácido nucleico que son más grandes de aproximadamente 4-8 kilobases de tamaño, más preferentemente más grandes que aproximadamente 5-7 kilobases de tamaño, y con máxima preferencia moléculas de ácido nucleico que son más grandes que aproximadamente 7 kilobases de tamaño. En este aspecto de la invención, las combinaciones de ADN polimerasas, preferentemente mezclas de una o más ADN polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 3'-5' (es decir, una "3' exo<sup>-</sup>" polimerasa) con una o más ADN polimerasas que tienen actividad exonucleasa 3'-5' (es decir, una "3' exo<sup>+</sup>" polimerasa), se pueden añadir a las composiciones de la invención (ver Patente U.S. Núm. 5.436.149; ver también Solicitud de Patente U.S. en trámite Núm. 08/801,720, de Ayoub Rashtchian y Joseph Solus, presentada el 14 de febrero de 1997, y la Solicitud de Patente U.S. en trámite de Ayoub Rashtchian y Joseph Solus titulada "Stable Compositions for Nucleic Acid Amplification and Sequencing," presentada el 27 de marzo de 1998, cuyas descripciones se incorporan en la presente en su totalidad. Las 3' exo<sup>-</sup> y 3' exo<sup>+</sup> polimerasas para usar en este aspecto de la invención son las 3' exo<sup>-</sup> y 3' exo<sup>+</sup> polimerasas termoestables. Particularmente preferidas son las 3' exo<sup>-</sup> polimerasas que incluyen, pero sin limitación, Taq, Tne(exo<sup>-</sup>), Tma(exo<sup>-</sup>), VENT(exo<sup>-</sup>)<sup>TM</sup>, DEEPVENT(exo<sup>-</sup>)<sup>TM</sup>, Pfu(exo<sup>-</sup>) y Pwo(exo<sup>-</sup>) polimerasas, o sus mutantes, variantes o derivados, que se añaden preferentemente a las composiciones de la invención a una concentración en la solución de aproximadamente 0,1-200 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-50 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-40 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-36 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-34 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-32 unidades por mililitro, aproximadamente 0,1-30 unidades por mililitro, o aproximadamente 0,1-20 unidades por mililitro, y con máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 20 unidades por mililitro. Las 3' exo<sup>+</sup> polimerasas particularmente preferidas incluyen, pero sin limitación, VENT<sup>TM</sup>, Pfu, Pwo, Tne, Kod y Tma, y con máxima preferencia DEEPVENT<sup>TM</sup>, ADN polimerasas, que se deben añadir a las mezclas en cantidad suficiente para dar una concentración de trabajo final de aproximadamente 0,0002-200 unidades por mililitro, aproximadamente 0,002-100 unidades por mililitro, aproximadamente 0,002-20 unidades por mililitro, aproximadamente 0,002-2,0 unidades por mililitro, aproximadamente 0,002-1,6 unidades por mililitro, aproximadamente 0,002-0,8 unidades por mililitro, aproximadamente 0,002-0,4 unidades por mililitro, o aproximadamente 0,002-0,2 unidades por mililitro, con máxima preferencia a concentraciones de aproximadamente 0,40 unidades por mililitro. Estas ADN polimerasas termoestables están disponibles en el comercio, por ejemplo en Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland), New England BioLabs (Beverly, Massachusetts), Finnzymes Oy (Espoo, Finlandia), Stratagene (La Jolla, California), Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, Indiana) y Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, Connecticut). Las mezclas de las composiciones de la invención y las 3' exo<sup>-</sup> y 3' exo<sup>+</sup> polimerasas se pueden usar en los procedimientos de la invención para producir mejor sensibilidad de detección y producción de productos RT-PCR grandes.

Habiendo descrito la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen con la presente para fines de solo de ilustración y no se consideran limitantes de la invención.

### Ejemplo 1

#### *Inhibición de RT-PCR por RT*

Para examinar la inhibición de la amplificación por RT-PCR con RT, se usó el ARN de CAT como un molde. Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ l en buffer PCR (20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl) o buffer ELONGASA (60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9,1), 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; concentración de azufre total de aproximadamente 23 mM) que contiene 20 unidades de M-MLV(H-) RT, 1 mM de ditiotreitól (DTT), 0,2 mM de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 0,2 mM de dNTP, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 unidades de Taq y varias cantidades de ARNm de CAT (0, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> o 10<sup>7</sup> copias por reacción). Las condiciones de RT-PCR fueron un ciclo de 45°C durante 30 minutos y 94°C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos/60°C 30 segundos y posteriormente 72°C durante 5 minutos.

## ES 2 355 739 T3

Después del análisis de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (Figura 1), se observó amplificación significativa de la secuencia blanco de 500 pb en las reacciones realizadas en el buffer ELONGASA mediante el uso de  $10^6$  o  $10^7$  copias del molde de ARNm de CAT (Figura 1, calles 8 y 9). En contraste, no se observó producto de PCR significativo para las reacciones realizadas en buffer de PCR estándar en todas las concentraciones del molde (Figura 1, calles 18, 19). Estos resultados indican que la presencia de RT en las mezclas de reacción de PCR inhibe la reacción de amplificación, pero que esta inhibición se reduce al menos parcialmente mediante el uso del buffer ELONGASA.

### 10 Ejemplo comparativo 2

#### *Papel del azufre en la reducción de la inhibición de RT en la amplificación por PCR*

Para determinar si el ion sulfato en el buffer ELONGASA podría ser un componente clave para la reducción de la inhibición de RT observada en el Ejemplo 1, se estudiaron en detalle varios parámetros de reacción tales como pH, condiciones iónicas y composición del buffer. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l que contiene 1 mM de DTT, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de  $MgSO_4$ , 0,2 mM de cada uno de los cebadores sentido y antisentido de  $\beta$ -actina humana, 1 pg de molde de ARN del HeLa total, 2 unidades de ADN polimerasa Taq y 10 unidades de RT M-MLV(H-) en soluciones salinas reguladas que comprenden varias condiciones iónicas y buffer. Las condiciones de RT-PCR fueron 30 minutos a 45°C y 2 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos/55°C durante 30 segundos/68°C durante 90 segundos, y una extensión final durante 5 minutos a 72°C. La capacidad de detectar un producto de RT-PCR de 1,026 pb amplificado de 1 pg de ARN de HeLa total se usó como una evaluación del éxito de la amplificación en las condiciones de reacción específicas.

Después del análisis de los productos de RT-PCR de  $\beta$ -actina de 1,026 pb en electroforesis en gel de agarosa 1%, se obtuvieron los resultados mostrados en las Tablas 1-7.

Tabla 1: Las composiciones que comprenden Tris-HCl (pH 8,5-9,3) demostraron una sensibilidad de aproximadamente 1 pg de ARN total del HeLa cuando estaba presente 18 mM  $(NH_4)_2SO_4$ . Sin embargo, este aumento de sensibilidad se obtuvo en un intervalo de pH más amplio (pH 7,8-9,3) cuando se usó buffer de Tris- $SO_4$  en lugar de Tris-HCl.

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 355 739 T3

TABLA 1

*pH óptimo en buffer Tris-HCl y Tris-SO<sub>4</sub>*

5	pH	7,5	7,8	8,0	8,3	8,5	8,8	9,0	9,3	9,5
	Tris-HCl, 60 mM <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 18 mM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Sensibilidad (Rendimiento del producto de PCR)	-	-	-	-	+	-	++	+	-
	pH	7,5	7,8	8,0	8,3	8,5	8,8	9,0	9,3	9,5
20	Tris-SO <sub>4</sub> 60 mM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 18 mM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	Concentración de azufre total (mM) <sub>2</sub>	41	38	35	32	30	26	23	22	21
30	Sensibilidad (Rendimiento del producto de PCR)	-	+	+	+	+	+	++	+	-

<sup>1</sup>El pH en la mezcla de reacción de Tris-HCl se ajustó mediante el uso de HCl. En consecuencia, no se aportó azufre por medio del ajuste de pH, y la concentración de azufre para cada pH analizado fue aproximadamente 18 mM.

<sup>2</sup>El pH en la mezcla de reacción de Tris-SO<sub>4</sub> se ajustó mediante el uso de ácido sulfúrico. En consecuencia, la adición de ácido sulfúrico aumentó la concentración de azufre a aproximadamente la mostrada.

Tabla 2: A fin de detectar el producto de RT-PCR de 1,026-pb en las composiciones que comprenden buffer Tris-HCl, la inclusión de 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en las composiciones fue esencial. Sin embargo, si se usó buffer Tris-SO<sub>4</sub> (20-80 mM, pH 8,0-9,0) en lugar de Tris-HCl, no se requirió la inclusión de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabla 2. Requerimiento de azufre y potasio

pH	9,0						8,5						8,0						
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tris-HCl, 60 mM	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 18 mM <sup>1</sup>	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80	+
Sensibilidad (Rendimiento del producto de PCR)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	9,0						8,5						8,0						
Tris-SO <sub>4</sub> , 60 mM	20	40	60	80	100		20	40	60	80	100		20	40	60	80	100		
KCl, 40 mM	+	+	+	+			+	+	+	+	+		+	+	+	+			
Concentración de azufre total (mM) <sup>2</sup>	20	21	23	25	26		22	26	30	34	38		24	29	35	41	46		
Sensibilidad (Rendimiento del producto de PCR)	-	-	+	+	-		+	+	+	+	-		-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>El pH de la mezcla de reacción de Tris-HCl se ajustó mediante el uso de HCl. En consecuencia, no se aportó azufre por medio del ajuste de pH, y la concentración de azufre para cada pH analizado fue aproximadamente 18 mM.

<sup>2</sup>El pH en la mezcla de reacción de Tris-SO<sub>4</sub> se ajustó mediante el uso de ácido sulfúrico. En consecuencia, la adición de ácido sulfúrico aumentó la concentración de azufre a aproximadamente la mostrada.

## ES 2 355 739 T3

Tabla 3: El requerimiento de azufre para la detección sensible del producto de RT-PCR de 1,026 pb también se demostró por el uso de taurina ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ), que contiene ion azufre. La taurina redujo la inhibición de RT-PCR mediada por RT casi tanto como lo hizo el sulfato de amonio.

5

TABLA 3

*Requerimiento de azufre*

10

Tris-HCl, 60 mM (pH 9,0)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
[Taurina], mM	0	10	20	40	60	0	0	0	0	0
[Sulfato de amonio], mM	0	0	0	0	0	0	1 0	20	4 0	60
Sensibilidad (rendimiento del producto de PCR)	-	+	++	++ +	++ +	-	+	++	-	-

25

Tabla 4: El aumento de la sensibilidad de la detección del sistema buffer Tris- $\text{SO}_4$  mostrado en la Tabla 2 (60 mM, pH 8,5-9,0) se podría mejorar por la adición de 20-40 mM de KCl, lo que indica que las moléculas que contienen potasio no solo eran sustitutos adecuados para las moléculas que contienen azufre en las presentes composiciones, sino que también pueden aumentar la sensibilidad de la reacción de RT-PCR por sí mismas.

30

Tabla 5: Se obtuvo similar sensibilidad de detección y mejora adicional por la adición de KCl en el sistema buffer de Tris-taurina.

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 4. Papel del potasio en concentraciones subóptimas de azufre.

pH	9,0						8,5						8,0											
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Tris-HCl, 60 mM	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 18 mM	-	-	++	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensibilidad (Rendimiento del producto de PCR)																								
pH	9,0						8,5						8,0											
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tris-SO <sub>4</sub> 60 mM.,	0	20	40	60	80	100	0	20	40	60	80	100	0	20	40	60	80	100	0	20	40	60	80	100
KCl, 40 mM	-	-	+	+	+	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensibilidad (Rendimiento del producto de PCR)																								



## ES 2 355 739 T3

Tabla 6: La adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en lugar de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en las presentes composiciones no redujo la inhibición de RT-PCR mediada por RT, lo que indica que las moléculas que contienen azufre son componentes clave para la reducción de la inhibición de RT en RT-PCR.

5

TABLA 6

*Requerimiento de azufre*

10

Composición del buffer (Aditivo a Tris-HCl, 60 mM)	Sensibilidad de la detección (Rendimiento del producto de PCR)	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM	$\text{NH}_4\text{Cl}$ , 40 mM
Sulfato de magnesio, 1,5 mM	+	-
Acetato de magnesio, 1,5 mM	+	--
Cloruro de magnesio, 1,5 mM	+	--

15

20

25

Tabla 7: El requerimiento de ion de azufre para la reducción de la inhibición de PCR mediada por RT fue menos riguroso en los sistemas buffer de Tris-acetato que en los sistemas buffer Tris-sulfato. En el sistema buffer Tris-acetato, los productos de RT-PCR de 1,026 pb de tamaño se pudieron observar aun en ausencia de los iones de azufre.

30

TABLA 7

*Requerimiento de azufre y efecto de los buffer*

35

Tris- $\text{SO}_4$ , 60 mM (pH 9,0)	+	+	+	+	+					
Tris-acetato, 60 mM (pH 8,4)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , mM	0	10	20	40	80	0	10	20	40	80
Sensibilidad (rendimiento del producto de PCR)	-	++	+++	-	-	+	++	+++	-	-

50

### Ejemplo 3

55

#### *Papel de la albúmina sérica bovina (BSA) en RT-PCR*

Para investigar otros componentes de reacción que podrían reducir la inhibición de RT-PCR mediada por RT, se añadió BSA a las presentes composiciones. Se formularon composiciones que comprenden cantidades crecientes de RT M-MLV( $\text{H}^-$ ) (de 10 unidades a 260 unidades) y varias cantidades de BSA, y estas composiciones se usaron en las reacciones de RT-PCR. Las reacciones se realizaron en un volumen final de  $50 \mu\text{l}$  que contiene 60 mM de  $\text{Tris-SO}_4$  (pH 9,1), 18 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 mM de dNTP, 1,2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 0,02 mM de DTT, 0,2 mM de cada uno de los cebadores sentido y antisentido de ARNm de CAT  $\beta$ -actina, 2 unidades de ADN polimerasa Taq y 100 pg de molde de ARN de HeLa total para la amplificación de  $\beta$ -actina, o  $10^5$  copias del molde de ARN de HeLa total para la amplificación de CAT. Las condiciones de RT-PCR fueron 30 minutos a  $45^\circ\text{C}$  y dos minutos a  $94^\circ\text{C}$ , seguido por 40 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  durante 15 segundos/ $55^\circ\text{C}$  durante 30 segundos/ $68^\circ\text{C}$  durante 90 segundos, y posteriormente una extensión final de cinco minutos a  $72^\circ\text{C}$ .

65

## ES 2 355 739 T3

Después del análisis de los productos de RT-PCR de RT- $\beta$ -actina de 1,026 pb en electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 2A), no se observó inhibición de RT con 10 unidades de RT, pero cantidades crecientes de RT (135 unidades-260 unidades) inhibieron completamente la RT-PCR. Sin embargo, tal inhibición de RT se redujo por la adición de 200-1000 ng de BSA por reacción (es decir, una concentración de BSA final de aproximadamente 4-20 pg/ml).

Se obtuvieron resultados similares del análisis de los productos de RT-PCR de CAT de 653 pb (Figura 2B), donde solo se requirió una cantidad ligeramente superior de BSA (300-1000 ng por reacción, es decir, una concentración final de BSA de aproximadamente 6-20 pg/ml) para la reducción de la inhibición de RT. En conjunto, estos resultados indican que la incorporación de proteínas tales como BSA en las composiciones de la invención puede ayudar a superar la inhibición de RT-PCR causada por RT.

### Ejemplo comparativo 4

#### *Rendimiento de M-MLV, AMV, M-MLV(H-) para RT-PCR en el buffer que contiene azufre y BSA*

Para estudiar el rendimiento de varias RT en RT-PCR, AMV-RT, M-MLV-RT, y M-MLV(H-)-RT se usaron en las presentes composiciones. Las reacciones de RT-PCR para M-MLV-RT y M-MLV H-RT (Superscript II) se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ l que contiene 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub>(pH 9,1), 18 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 mM de dNTP, 250 ng de BSA, 1,0 mM de DTT, 0,2 mM de cada uno de los cebadores sentido y antisentido de CAT, 2 unidades de ADN polimerasa Taq, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, y varias cantidades de molde de ARN de CAT (0, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> o 10<sup>5</sup> copias por reacción). Las composiciones que contienen AMV-RT fueron las mismas excepto que estas carecían de BSA. En cada reacción, se usaron 5 unidades de cada uno de AMV-RT, M-MLV-RT o M-MLV(H-)-RT. Las condiciones de ciclado de RT-PCR fueron 30 minutos a 45°C y 2 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos/60°C durante 30 segundos, y posteriormente una extensión final de cinco minutos a 72°C.

Como se muestra en la Figura 3, después del análisis de los productos de RT-PCR de CAT de 500 pb en electroforesis en gel del agar 1,5%, las reacciones realizadas con AMV-RT, M-MLV-RT, y M-MLV(H-)-RT demostraron un rendimiento de producto de RT-PCR eficiente y sensible, sin inhibición de las reacciones de RT-PCR observadas en ninguna de las condiciones de reacción.

### Ejemplo 5

#### *Amplificación por RT-PCR de moldes de ácido nucleico largos*

Habiendo demostrado la simplicidad y sensibilidad de los presentes procedimientos en amplificación por RT-PCR de los moldes de hasta 3,5 kb de tamaño, se examinó la eficacia de la invención para amplificar los ARNm hasta 8,9 kb.

El ARN total del HeLa se aisló con reactivo TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland) y se amplificó como antes. Para examinar posibles efectos de la temperatura, se montaron reacciones idénticas y se incubaron a 45°C a 55°C por duplicado. El ARN total del HeLa usado varió de 1 ng a 100 ng según la abundancia del ARNm. Después de la incubación de RT durante 30 minutos, las reacciones se incubaron a 94°C durante dos minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, seguido por una extensión final de 68°C durante cinco minutos.

Para productos de RT-PCR más grandes, la concentración de magnesio se aumentó a 1,8 mM desde el estándar de 1,5 mM, y se añadió 1  $\mu$ l de mezcla de enzima ELONGASA (Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland) a cada reacción. La reacción de 50  $\mu$ l final consistía en buffer de ELONGASA IX con 1,8 mM de MgSO<sub>4</sub> y otras sales, 200 pM de cada dNTP, 2 pg/ml de BSA, 0,2 pM de cebadores (GiBcO BRL Custom Primers; Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland), 100 ng de ARN total del HeLa, 1  $\mu$ l de la mezcla de enzima RT/Taq de la invención y 1  $\mu$ l de la mezcla de enzima ELONGASA. En los experimentos que usan el mismo molde de cebadores, se preparó una mezcla maestra de buffer, mezclas de enzimas, y cebadores o molde para asegurar la consistencia. Las muestras se incubaron a 50°C durante 30 minutos y posteriormente 94°C durante dos minutos. La amplificación se realizó con 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 58°C durante 30 segundos y 68°C durante seis a nueve minutos (un minuto/kb). Los productos de RT-PCR se resolvieron y visualizaron en geles de agarosa-TAE 0,8 o 1,0% (p/v) que contienen bromuro de etidio.

*Temperatura de la reacción RT.* La RT SUPERScript II ha mejorado la estabilidad de la temperatura en comparación con la M-MLV-RT (Gerard, G., *et al.*, FOCUS 14:91 (1992)). Para examinar el efecto de la temperatura sobre los productos de PCR, se examinaron 36 conjuntos de cebadores (que representan genes diferentes de ser humano, rata, planta, y un transcripto *in vitro*). Como se muestra en la Figura 4, se observaron rendimiento y especificidad del producto sustanciales a 45°C en muchos de los fragmentos examinados; el aumento de la temperatura de incubación no produjo aumento de rendimiento o especificidad. Este resultado, sin embargo, fue dependiente del molde y cebador específicos elegidos (Figura 5): para algunas combinaciones de molde-cebador, el corrimiento de las bandas causado por la unión inespecífica de cebadores que fue característica de las reacciones de RT realizadas a 45°C desapareció con

## ES 2 355 739 T3

el aumento de la temperatura (Figura 5; calles 1-6), mientras que en algunos casos se observó un aumento significativo del rendimiento del producto cuando las reacciones de RT se realizaron a temperaturas elevadas (Figura 5; calles 7-12).

5 *Productos de RT-PCR largos.* En los estudios de secuencias codificadoras de longitud completa o para la amplificación de segmentos largos de ARN, se analizó el uso de las composiciones de la presente invención suplementado con la mezcla enzimática ELONGASA. Como se muestra en la Figura 6, el presente sistema y el kit del proveedor A  
10 pudieron amplificar un producto de 2,8 kb desde 100 ng, pero no de 10 ng, del ARN total. La adición de mezcla enzimática ELONGASA al presente sistema no solo aumentó el rendimiento del producto con 100 ng de ARN total, pero también aumentó la sensibilidad para permitir la amplificación de moldes largos desde 10 ng de ARN total (Figura 6; calles 7-12). En contraste, el kit del proveedor A no pudo amplificar el blanco de 2,8 kb desde 10 ng de ARN total (Figura 6; calles 13-18) aun cuando este contenía una mezcla enzimática de polimerasa diseñada para moldes largos.

15 También se halló que las composiciones y los procedimientos de la invención son útiles para amplificar productos de RT-PCR grandes (>3-5 kb). Como se muestra en la Figura 7, las composiciones de la presente invención, cuando se suplementan con la mezcla enzimática ELONGASA, produjo productos de RT-PCR de hasta 8,9 kb de tamaño. El fragmento de las bandas observadas después de la amplificación con estas composiciones es común para RT-PCR larga, y la variación de los rendimientos del producto se puede deber parcialmente al uso de diferentes conjuntos del cebador. Estos resultados demuestran que la adición de la mezcla enzimática ELONGASA a las presentes  
20 composiciones hace posible amplificar ARNm largos y raros directamente de las preparaciones de ARN total por los procedimientos de la invención. Además, la termoestabilidad de RT SUPERSORIPT II, que facilita las reacciones de RT a temperaturas de hasta 55°C, puede aumentar la especificidad y el rendimiento del producto para algunos moldes y conjuntos de cebadores.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 355 739 T3

### REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para amplificar una molécula de ácido nucleico, dicho procedimiento que comprende
  - 5 (a) mezclar un molde de ARN con una composición que comprende una transcriptasa inversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV), una o más ADN polimerasas y una o más moléculas que contienen acetato para proporcionar el ion acetato a una concentración de aproximadamente 60 mM, para formar una mezcla; y
  - 10 (b) incubar dicha mezcla en condiciones suficientes para amplificar una molécula de ADN complementaria al total o una porción de dicho molde de ARN.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la ADN polimerasa es Taq ADN polimerasa.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las ADN polimerasas comprende un primer ADN polimerasa que tiene actividad 3' exonucleasa y una segunda ADN polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 3' sustancialmente reducida.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la relación de unidades de la transcriptasa inversa a las ADN polimerasas es de aproximadamente 0,2:2 a aproximadamente 500:2.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la relación es de aproximadamente 0,5:2 a aproximadamente 250:2.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la relación es mayor que 3:2.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición además comprende azufre en forma iónica.
- 30 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el azufre en forma iónica está en una concentración de al menos 18 mM.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que el azufre en forma iónica está en una concentración de al menos 19 mM.
- 35 10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la concentración de azufre iónico es aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM.
- 40 11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la fuente del azufre iónico es un buffer que contiene azufre.
12. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la fuente del azufre iónico es una sal que contiene azufre.
- 45 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el buffer que contiene azufre es TRIS-sulfato (tris[{{hidroximetil}}aminometano]sulfato).
14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la sal que contiene azufre se selecciona del grupo que consiste en sulfato de amonio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso.
- 50 15. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la molécula que contiene acetato es una sal que contiene acetato.
16. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la molécula que contiene acetato es un buffer que contiene acetato.
- 55 17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la sal que contiene acetato se selecciona del grupo que consiste en acetato de amonio, acetato de magnesio, acetato de manganeso, acetato de sodio y acetato de potasio.
- 60 18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el buffer que contiene acetato se selecciona del grupo que consiste en TRIS-acetato (Tris[{{hidroximetil}}aminometano]acetato), ADA (ácido N-[2-acetamido]-2iminodiacético), y acetato de imidazol (ácido 2-hidroxi-3-[4-imidazolil]-propiónico).
- 65 19. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla además comprende uno o más nucleótidos.

## ES 2 355 739 T3

20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que los nucleótidos son trifosfatos de desoxirribonucleósido o sus derivados, o ditrifosfatos de desoxirribonucleósido o sus derivados.

5 21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que los trifosfatos de desoxirribonucleósido se seleccionan del grupo que consisten en dATP, dUTP, dTTP, dGTP, y dCTP.

22. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla además comprende uno o más cebadores de oligonucleótidos.

10 23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cebador es un cebador oligo(dT).

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cebador es un cebador específico del blanco.

15 25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cebador es un cebador específico del gen.

26. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la transcriptasa inversa está sustancialmente reducida en cuanto a la actividad de ARNasa H.

20 27. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las ADN polimerasas son ADN polimerasas termoestables.

28. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, en el que las ADN polimerasas termoestables se seleccionan del grupo que consiste en Tne, Tma, Taq, Pfu, Tth, Tfi, VENT, DEEPVENT, Pwo, Tfl, y sus mutantes, variantes y derivados.

25 29. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha ADN polimerasa que tiene actividad de 3' exonucleasa se selecciona del grupo que consiste en Pfu, Pwo, DEEPVENT, VENT, Tne, Tma, Kod, y sus mutantes, variantes y derivados.

30 30. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha ADN polimerasa que tiene actividad de 3' exonucleasa sustancialmente reducida se selecciona del grupo que consiste en Taq, Tfl, Tth, y sus mutantes, variantes y derivados.

35 31. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de incubación (b) comprende

(a) incubar la mezcla a una temperatura y durante un tiempo suficiente para obtener una molécula de ADN complementario con el total o una porción de dicho molde de ARN; e

40 (b) incubar la molécula de ADN complementario con el molde de ARN a una temperatura y durante un tiempo suficiente para amplificar la molécula de ADN.

45 32. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, en el que la primera etapa comprende incubar dicha mezcla a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 60°C.

33. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, en el que la segunda etapa comprende termociclado.

50 34. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el termociclado comprende alternar el calentamiento y el enfriamiento de la mezcla suficiente para amplificar la molécula de ADN.

55 35. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el termociclado comprende alternar desde un primer intervalo de temperatura de aproximadamente 90°C a aproximadamente 100°C, a un segundo intervalo de temperatura de aproximadamente 45°C a aproximadamente 75°C.

36. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 35, en el que el segundo intervalo de temperatura es de aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C.

60 37. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en el que dicho termociclado se realiza más de 10 veces.

38. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en el que el termociclado se más realiza más de 20 veces.

65 39. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la transcriptasa inversa es SuperScript I o SuperScript II.

## ES 2 355 739 T3

40. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición además comprende una o más moléculas que contienen potasio.

5 41. Una composición que comprende una transcriptasa inversa de virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV), una o más ADN polimerasas, y una o más moléculas que contienen acetato para proporcionar el ion acetato a una concentración de aproximadamente 60 mM.

10 42. Una composición de acuerdo con la reivindicación 41, que además comprende una o más moléculas que contienen azufre que proporcionan azufre en forma iónica.

43. Una composición de acuerdo con la reivindicación 42, en el que el azufre iónico está en una concentración de al menos 18 mM.

15 44. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43 que además comprende una o más moléculas que contienen potasio.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

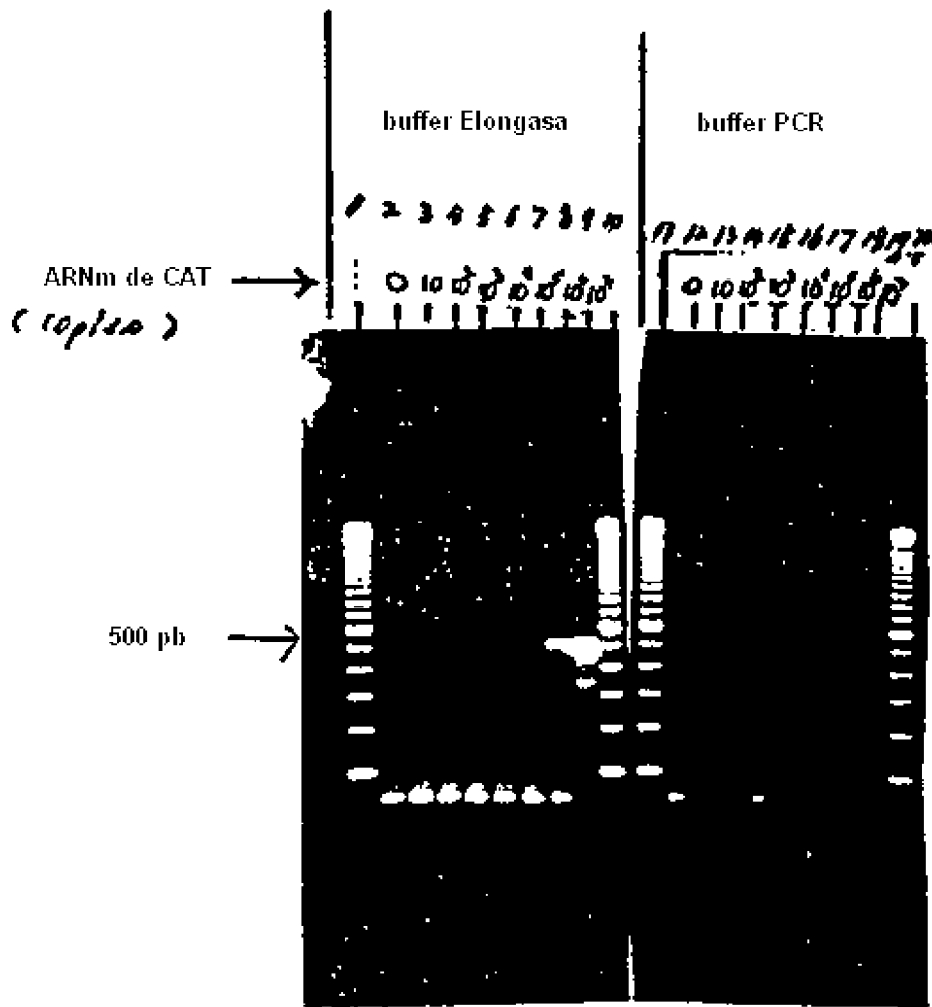


Figura 2a

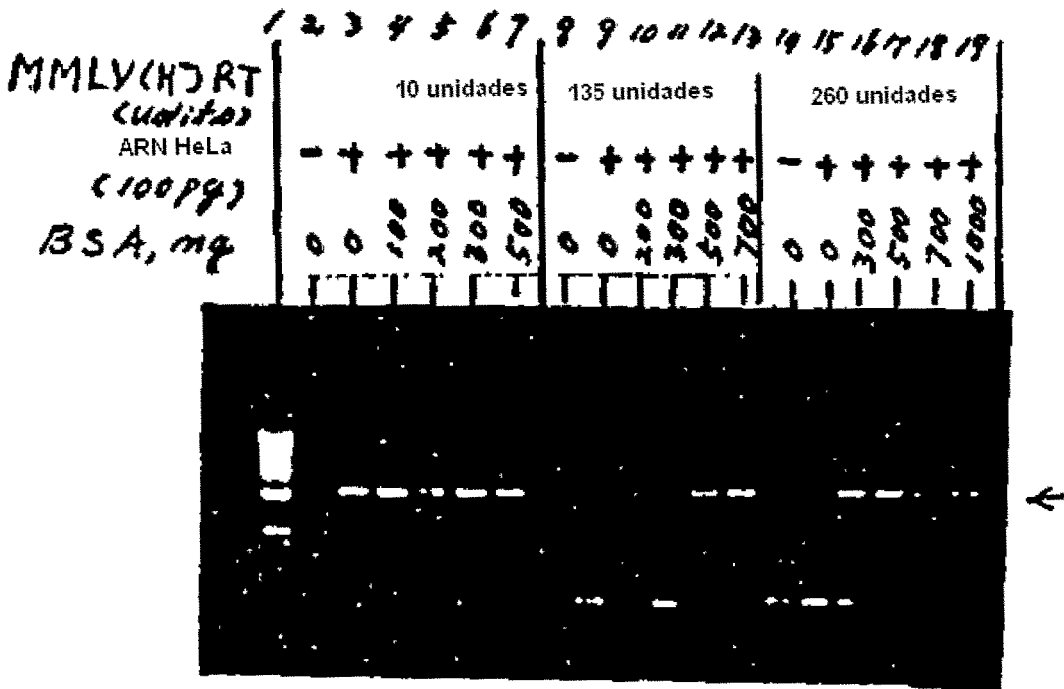


Figura 2b

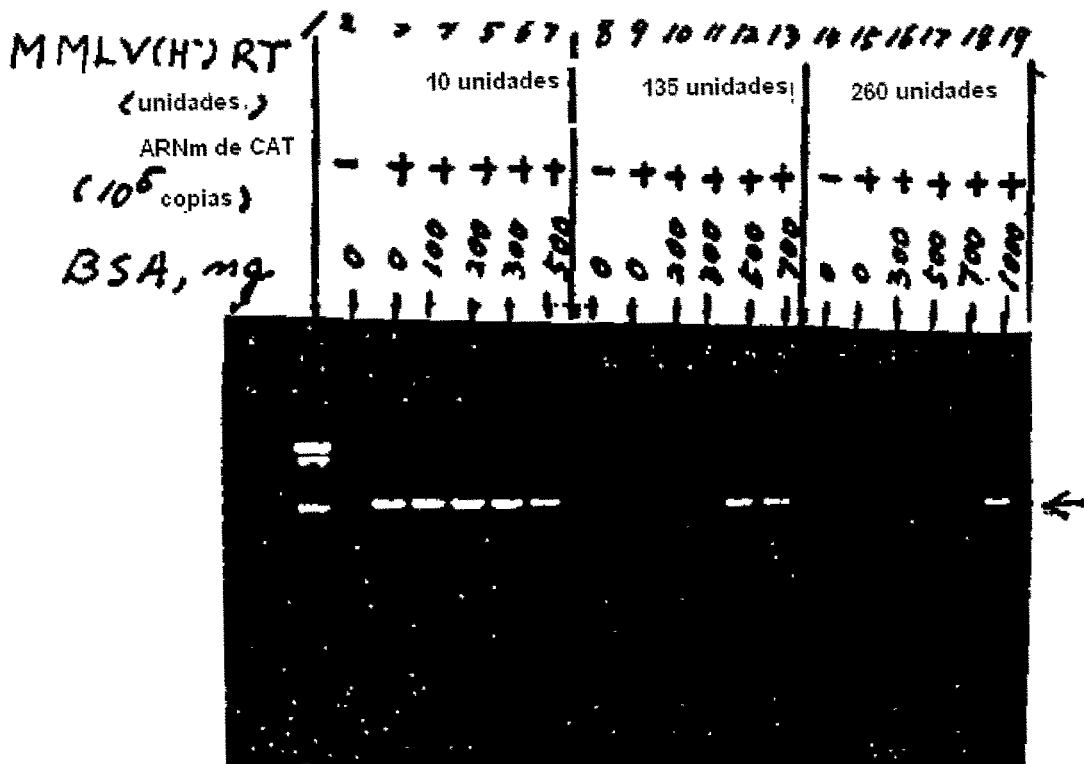


Figura 3

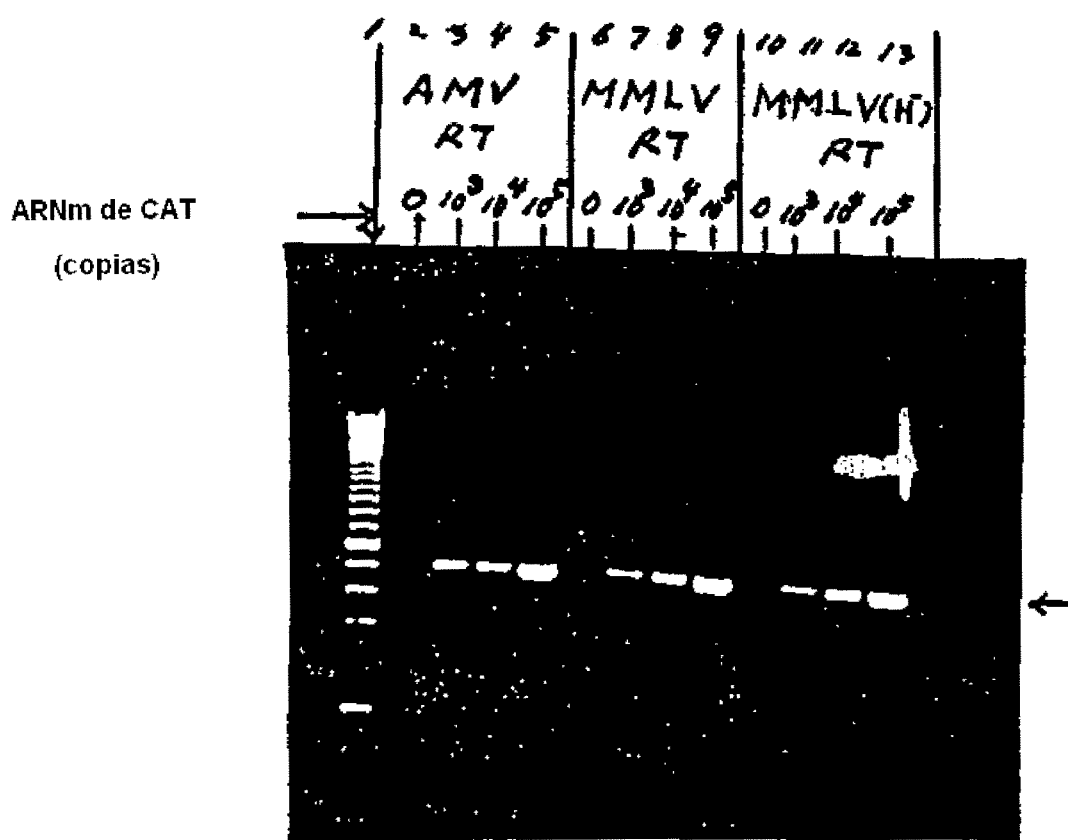


Figura 4

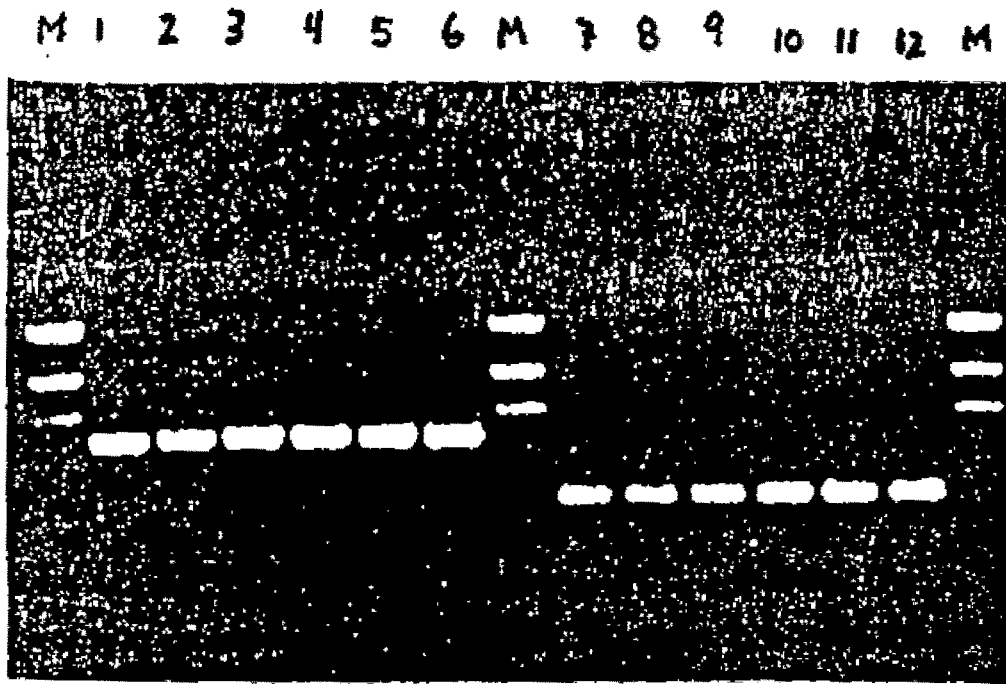


Figura 5

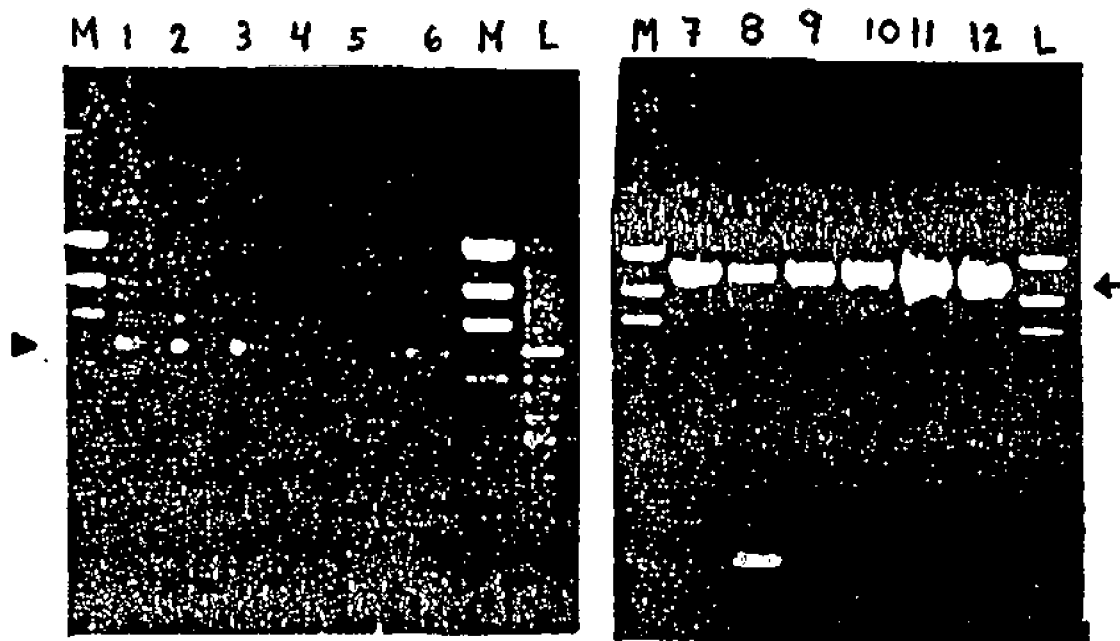


Figura 6

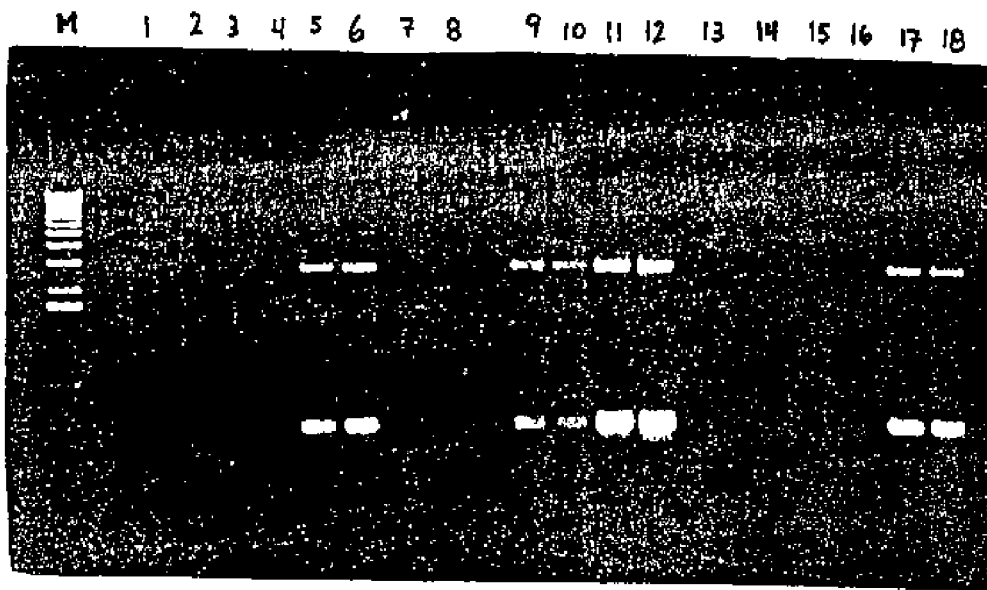


Figura 7

