

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 275**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6848 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2017 PCT/EP2017/053922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017 WO17144457**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2017 E 17706465 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3420100**

54 Título: **Eliminación de las interacciones cebador-cebador durante la extensión del cebador**

30 Prioridad:

25.02.2016 US 20166229988 P

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

04.11.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GODWIN, BRIAN CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 874 275 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

Eliminación de las interacciones cebador-cebador durante la extensión del cebador

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, al análisis *in vitro* de dianas de ácido nucleico y, más en particular, a un procedimiento mejorado de enriquecimiento de dianas de ácido nucleico por extensión del cebador.

10 **Antecedentes de la invención**

Los dímeros de cebadores y otras interacciones cebador-cebador son artefactos indeseables de las reacciones de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro*. Se usan comúnmente herramientas de diseño de cebadores para evitar que las secuencias de cebador se puedan hibridar de forma cruzada o autohibridar. Sin embargo, los estudios han demostrado que se requiere poca o ninguna complementariedad para que se formen dímeros de cebadores y se extiendan o se repliquen. Brownie, J., *et al.* (1997) *The elimination of primer dimers during PCR*, Nucl. Acids Res., 25:3235. La explicación propuesta es que la alta concentración de cebadores y la baja concentración de la secuencia diana crean condiciones termodinámicamente favorables para la hibridación y extensión cebador-cebador. En el documento US 2003/190627, se usa un cebador que comprende un nucleótido modificado para prevenir las interacciones cebador-cebador.

Los dímeros de cebadores pueden dar lugar a productos secundarios indeseables que consumen reactivos y compiten con la amplificación de las verdaderas dianas. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener un procedimiento de eliminación o reducción de las interacciones cebador-cebador. Un procedimiento de este tipo beneficiará especialmente a las aplicaciones donde se van a detectar dianas de ácido nucleico infrecuentes. Un procedimiento de este tipo beneficiará especialmente al diagnóstico clínico y al campo de reciente aparición de biopsia líquida, o detección de múltiples dianas nucleicas infrecuentes en plasma humano.

30 **Sumario de la invención**

En un modo de realización, la invención es un procedimiento de amplificación de un ácido nucleico diana en una muestra con interacción cebador-cebador reducida que comprende: una etapa de extensión del cebador, en la que la muestra se pone en contacto con un ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario al ácido nucleico diana que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa, para generar un producto de extensión del cebador; y una etapa de amplificación exponencial, en la que la muestra se pone en contacto con un segundo cebador complementario al producto de extensión del cebador. El producto de extensión del cebador se puede ligar a un adaptador bicatenario antes de la etapa de amplificación. El adaptador y el primer cebador pueden comprender sitios de unión para cebadores de amplificación universales y el segundo cebador puede ser un cebador universal. El cebador puede ser un oligonucleótido monocatenario que consiste en dos brazos complementarios a una secuencia diana separados por una secuencia conectora no complementaria a la secuencia diana. La etapa de amplificación exponencial puede utilizar una polimerasa tolerante del nucleótido modificado. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además una etapa de purificación antes de la etapa de amplificación, en la que el primer cebador y el ácido nucleico molde se separan del producto de extensión del cebador. En algunos modos de realización, el nucleótido modificado es uracilo. El procedimiento puede comprender una etapa de prevención del arrastre antes de la etapa de amplificación, en la que la muestra se pone en contacto con uracil ADN glucosilasa.

En otro modo de realización, la invención es un kit para sintetizar hebras de ácido nucleico por extensión del cebador con formación de dímeros de cebadores reducida que comprende un ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario a la primera hebra del ácido nucleico diana y que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa. El kit puede comprender además un segundo cebador complementario a la segunda hebra del ácido nucleico diana o un adaptador. El cebador puede ser un oligonucleótido monocatenario que consiste en dos brazos complementarios a una secuencia diana separados por una secuencia conectora no complementaria a la secuencia diana.

Aún en otro modo de realización, la invención es una mezcla de reacción para sintetizar hebras de ácido nucleico por extensión del cebador con formación de dímeros de cebadores reducida que comprende un ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario a la primera hebra del ácido nucleico diana y que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La **FIG. 1** es un diagrama del procedimiento de la invención que muestra un artefacto de dímero de cebadores no extensible.

La **FIG. 2** es un diagrama que muestra la formación del artefacto formado por sondas de inversión molecular (MIP)

hibridadas y extendidas.

La **FIG. 3** es un diagrama del procedimiento que muestra un artefacto no extensible formado por sondas de inversión molecular (MIP).

La **FIG. 4** es un diagrama del procedimiento de la invención que muestra etapas de amplificación opcionales.

La **FIG. 5** es un diagrama del procedimiento de la invención que muestra etapas de amplificación opcionales usando sondas de inversión molecular (MIP).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "polimerasa" se refiere a una ácido nucleico polimerasa, ya sea natural (purificada a partir de su especie natural) o recombinante (producida en y purificada a partir de un huésped transformado). En el contexto de la invención, la polimerasa puede tener su secuencia de aminoácidos original o una secuencia de aminoácidos modificada siempre que la polimerasa mantenga su capacidad de paralizar la replicación en la base modificada de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Los términos "paralizar" y "paralizar la replicación" se refieren a ralentizar la velocidad o al cese completo de incorporación de nucleótidos por la polimerasa. La polimerasa paralizada puede permanecer unida al sustrato o disociarse del sustrato.

El término "nucleótido modificado" se refiere a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido que contiene una base distinta de adenosina, guanosina, timidina o citosina. El nucleótido modificado puede ser abásico (no tiene ninguna base). La base modificada puede contener una modificación encontrada en la naturaleza: desaminación, metilación, oxidación o un enlace inducido por UV. La base modificada puede contener una modificación no encontrada en la naturaleza.

El término "sonda" significa cualquier molécula que se pueda unir selectivamente a una biomolécula diana específicamente pretendida, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de interés que se vaya a unir, capturar o hibridar por las sondas.

El término "adaptador" significa una secuencia de nucleótidos que se puede añadir a otra secuencia para importar propiedades adicionales a esa secuencia. Un adaptador puede ser mono o bicatenario, o puede tener tanto una porción monocatenaria como una porción bicatenaria.

El término "cebador universal" y "sitio de cebado universal" se refiere a un cebador y sitio de cebado que no están presentes de forma natural en la secuencia diana. Típicamente, el sitio de cebado universal está presente en adaptadores o cebadores específicos de diana. El cebador universal se puede unir a y dirigir la extensión del cebador desde el sitio de cebado universal.

El término "dímero de cebadores" se refiere a un producto de hibridación de dos cebadores oligonucleotídicos presentes en el mismo recipiente de reacción. El dímero de cebadores se puede formar por dos cebadores idénticos o dos cebadores con secuencias diferentes. El dímero de cebadores puede implicar una o más regiones de emparejamiento de bases entre los dos cebadores. El emparejamiento de bases puede ser un emparejamiento de bases de Watson-Crick, así como un enlace de hidrógeno adicional (por ejemplo, emparejamiento de Hoogsteen o apilamiento de bases) que estabiliza un ácido nucleico bicatenario. El dímero de cebadores puede comprender cebadores hibridados o cebadores hibridados y extendidos.

El término "polimerasa replicativa" se refiere a replicasas cromosómicas que comparten las propiedades y estructuras comunes. Las propiedades comunes incluyen la capacidad de extender procesivamente un cebador de ácido nucleico utilizando un molde de ADN monocatenario (sin síntesis *de novo*). Las estructuras comunes incluyen los dominios de la palma, los dedos y el pulgar, véase Johansson *et al.*, (2013) *Replicative DNA Polymerases*, Cold Spring Harb Perspect Biol. 5(6):a012799. Las polimerasas replicativas incluyen polimerasa epsilon y polimerasa delta humana y de levadura, Pol B de arqueas y Pol III eubacteriana.

La presente invención proporciona un procedimiento de amplificación de un ácido nucleico diana en una muestra con interacción cebador-cebador reducida que comprende a) una etapa de extensión del cebador, en la que la muestra se pone en contacto con una ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario al ácido nucleico diana que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa, para generar un producto de extensión del cebador; y b) una etapa de amplificación exponencial, en la que la muestra se pone en contacto con un segundo cebador complementario al producto de extensión del cebador. El producto de extensión del cebador se puede ligar a un adaptador bicatenario antes de la etapa b). El adaptador y el primer cebador pueden comprender sitios de unión para cebadores de amplificación universales y

el segundo cebador es un cebador universal. El cebador puede ser un oligonucleótido monocatenario que consiste en dos brazos complementarios a una secuencia diana separados por una secuencia conectora no complementaria a la secuencia diana. La etapa de amplificación exponencial puede utilizar una polimerasa tolerante del nucleótido modificado. Antes de la etapa b), se puede realizar una purificación. El nucleótido modificado puede ser uracilo. En esta etapa, el procedimiento puede comprender además una etapa de prevención del arrastre antes de la etapa b), en la que la muestra se pone en contacto con uracil ADN glucosilasa.

La presente invención también proporciona un kit para sintetizar hebras de ácido nucleico por extensión del cebador con formación de dímeros de cebadores reducida que comprende una ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario a la primera hebra del ácido nucleico diana y que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa. Dicho kit puede comprender además un segundo cebador complementario a la segunda hebra del ácido nucleico diana y/o un adaptador. El cebador puede ser un oligonucleótido monocatenario que consiste en dos brazos complementarios a una secuencia diana separados por una secuencia conectora no complementaria a la secuencia diana.

La presente invención, además, proporciona una mezcla de reacción para sintetizar hebras de ácido nucleico por extensión del cebador con formación de dímeros de cebadores reducida que comprende una ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario a la primera hebra del ácido nucleico diana y que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa.

La presente invención comprende un procedimiento de reducción y eliminación de las interacciones cebador-cebador que se producen durante las reacciones de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro* donde están presentes cebadores oligonucleotídicos. Dichas interacciones cebador-cebador a menudo se deben a la complementariedad parcial y al emparejamiento de bases débiles entre cebadores oligonucleotídicos. Existen procedimientos de diseño de cebadores empíricos y herramientas de programa informático para minimizar o evitar dicho emparejamiento de bases. Sin embargo, estos procedimientos tienen una aplicabilidad limitada a las reacciones multiplex. Cuando están presentes docenas de incluso cientos de cebadores oligonucleotídicos diferentes, es difícil, si no imposible, evitar cierta complementariedad cruzada. Durante las reacciones de extensión del cebador o amplificación exponencial altamente multiplexadas, las interacciones cebador-cebador pueden dar lugar a productos secundarios indeseables comúnmente denominados dímeros de cebadores. El principal contribuyente a estos productos secundarios es la extensión por polimerasa de un cebador usando un cebador separado como molde. Aunque la complementariedad cruzada y la hibridación cebador-cebador es difícil de prevenir, reducir o eliminar la extensión de pares de cebadores hibridados disminuiría o eliminaría la formación de productos secundarios indeseables.

En un modo de realización, la invención es un procedimiento de amplificación de dianas de ácido nucleico con formación de dímeros de cebadores reducida o eliminada. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra que contiene uno o más ácidos nucleicos diana con una ácido nucleico polimerasa y uno o más cebadores de extensión que contienen bases modificadas que provocan la paralización de la ácido nucleico polimerasa durante la extensión del cebador. La ácido nucleico polimerasa se paralizará durante la extensión de un cebador dentro de un dímero de cebadores donde el nucleótido modificado está presente en su trayectoria. No se espera que el ácido nucleico diana contenga el nucleótido modificado y la polimerasa no se paralizará durante la extensión de un cebador hibridado al ácido nucleico diana. (Figura 1)

Determinadas polimerasas paralizan la replicación cuando encuentran nucleótidos inusuales en la hebra molde que pueden reflejar sitios de daños en el ADN. Por ejemplo, el uracilo en el ADN provoca que varias polimerasas se paralicen, incluyendo varias polimerasas de la familia B y de la familia D de arqueas, por ejemplo, *Pfu* polimerasa. Véase Wardle, *et al.*, (2007) *Uracil recognition by replicative DNA polymerases is limited to the archaea, not occurring with bacteria and eukarya*, Nucl. Acids Res., 36:705. Los sitios abásicos provocan que las enzimas replicativas procariontas y eucariotas se paralicen, por ejemplo, Pol III de *E. coli* y polimerasa delta de levadura. Véanse Goodman, M. (2000) *Coping with replication 'train wrecks' in Escherichia coli using Pol V, Pol II and RecA proteins*. Trends in Biochem. Sci., 25:189; y Boiteux, *et al.*, (2004) *Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in Saccharomyces cerevisiae*, DNA Repair 3:1. También se sabe que los dímeros de ciclobutano pirimidina y los fotoproductos (6-4) (dímeros TT) provocados por la irradiación con luz UV paralizan las polimerasas replicativas de arqueas y eucariotas (incluyendo de mamíferos). Ghosal *et al.*, (2013) *DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome*, Transl. Cancer Res. 2:107; Jozwiakowski, *et al.*, (2015) *Archaeal replicative primases can perform translesion DNA synthesis PNAS* 112 (7) E633-E638. Los dímeros de pirimidina junto con las bases modificadas se pueden incorporar en un cebador oligonucleotídico por medio del procedimiento con fosforamidita. Yamamoto, *et al.* (2006) *Chemical synthesis of oligodeoxy-ribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies*, Nucl. Acids Res. 34:4406. Además de los ejemplos específicos descritos en el presente documento, la descripción de la invención posibilita el uso de cualquier otro nucleótido modificado (conocido o bien aún por sintetizar) que se pueda incorporar en un cebador y pueda paralizar la ADN polimerasa.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un cebador de extensión que contiene uno o más uracilos, o uno o más sitios abásicos, o uno o más dímeros de pirimidina y una

ADN polimerasa de la familia B de arqueas (por ejemplo, *Pfu* polimerasa). En otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un cebador de extensión que contiene uno o más dímeros de pirimidina o sitios abásicos y una ADN polimerasa replicativa eucariota o de arqueas o un derivado de la misma.

5

En algunos modos de realización, el cebador que incorpora el nucleótido modificado es un oligonucleótido corto que consiste principalmente en una única región de complementariedad parcial o exacta con el ácido nucleico diana (figura 1). Además de la región de complementariedad con la diana, el cebador puede comprender opcionalmente secuencias adicionales para etapas posteriores tales como un sitio de restricción o una secuencia complementaria a un sitio de unión a cebador de amplificación universal, un sitio de unión a cebador de secuenciación universal o un código de barras.

10

En otros modos de realización, el cebador que incorpora el nucleótido modificado es un oligonucleótido diseñado para formar una estructura secundaria compleja que consiste en una combinación de regiones monocatenarias y bicatenarias autohíbridadas. En algunos modos de realización, el oligonucleótido es una sonda de inversión molecular (MIP) (figura 2). Se describen estructuras de MIP en Turner *et al.*, (2009) *Methods for Genomic Partitioning*. Annu. Rev Genomics Hum. Genet., 10:263. La MIP es un oligonucleótido monocatenario que consiste en dos brazos complementarios a una secuencia diana separados por una secuencia conectora no complementaria a la secuencia diana. Las secuencias complementarias a la sonda dentro de la secuencia diana se separan entre sí de modo que los extremos 5' y 3' de la sonda se separen entre sí cuando la sonda se hibrida a la secuencia diana. El hueco se puede llenar extendiendo el extremo 3' de la sonda hibridada. Después de la extensión de la hebra, los dos extremos se pueden unir por ligación. La digestión con exonucleasa opcional retira las sondas no circularizadas.

15

20

25

Los oligonucleótidos de MIP pueden compartir ocasionalmente regiones de complementariedad que permitan la hibridación y extensión del extremo 3' de la sonda para formar un círculo completo. El círculo se somete a ligación y se vuelve resistente al tratamiento con exonucleasa. (Figura 2). Si se incorpora en el cebador un nucleótido modificado que bloquea la polimerasa, se previenen la extensión del cebador y la ligación posterior. (Figura 3).

30

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además la amplificación del producto de la extensión del cebador obtenido en las etapas previas. El producto de la extensión del cebador contiene el nucleótido modificado en el cuerpo del cebador. En el caso de un cebador con una única región de complementariedad (figura 1), el procedimiento puede comprender la amplificación con cebadores en dirección 5' y en dirección 3' específicos de gen.

35

En otros modos de realización, se usan cebadores de amplificación universales. Se pueden introducir sitios de unión para cebadores universales en el cebador de extensión del cebador inicial y en un adaptador ligado al extremo 3' del producto de extensión del cebador. La ligación de adaptadores a ácidos nucleicos monocatenarios es conocida en la técnica, véase, por ejemplo, la pub. de solicitud de EE. UU. n.º 20140193860. Esencialmente, el procedimiento usa una población de adaptadores donde la protuberancia en el extremo 3' monocatenaria en lugar de tener un sitio de ligación universal, tiene una secuencia aleatoria, por ejemplo, una secuencia de hexámero aleatorio. En algunos modos de realización, el cebador de extensión del cebador inicial comprende un sitio de unión para uno de los cebadores universales y el adaptador comprende un sitio de unión para el segundo cebador universal (figura 4). En otros modos de realización, el cebador de extensión del cebador inicial contiene sitios de unión para dos cebadores universales. (Figura 5).

40

45

La amplificación puede proseguir con ácido nucleico polimerasas tolerantes a la presencia del nucleótido modificado en el molde, es decir, puede incorporar una base opuesta al nucleótido modificado y completar la síntesis de la hebra. Por ejemplo, las polimerasas que pueden sortear el uracilo incluyen polimerasas termoestables de bacterias termófilas, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquations*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, especie Sps17 de *Thermus*, especie Z05 de *Thermus*, *Thermus caldophilus*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosiphon africanus*.

50

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además una etapa de separar los productos de extensión del cebador del molde de ácido nucleico diana y los cebadores no usados. Si se usa una ADN polimerasa tolerante de uracilo en la etapa de amplificación, los dímeros de cebadores no extendidos con uracilos se deben retirar de la mezcla de reacción.

55

En los modos de realización donde el cebador que incorpora el nucleótido modificado es un oligonucleótido corto que consiste principalmente en una única región de complementariedad parcial o exacta con el ácido nucleico diana (figura 1), el producto de extensión del cebador se puede someter a ligación y extensión de la segunda hebra. Posteriormente, los ácidos nucleicos monocatenarios, incluyendo los cebadores, se pueden separar por tamaño.

60

En los modos de realización donde el cebador que incorpora el nucleótido modificado es un oligonucleótido diseñado para formar una estructura secundaria compleja que consiste en una combinación de regiones

65

monocatenarias y bicatenarias autohíbridadas (por ejemplo, MIP, figura 2), el producto de extensión del cebador se convierte en ADN circular sin 3'-OH libre. En dichos modos de realización, las sondas no usadas y el ADN molde se pueden retirar por digestión con exonucleasa. Se puede usar exonucleasa monocatenaria (por ejemplo, Exo I) para retirar cebadores no usados y ADN diana desnaturalizado o ADN de muestra, y se puede usar exonucleasa bicatenaria (por ejemplo, exonucleasa T7) para retirar ADN diana bicatenario. Se puede usar una mezcla de exonucleasas para reducir la cantidad de todos los ácidos nucleicos en la muestra excepto las sondas ligadas (circularizadas).

En algunos modos de realización, el nucleótido modificado es uracilo. Se puede usar la incorporación de uracilo en el ADN sintetizado *in vitro* para la prevención del arrastre en una instalación que realice de forma rutinaria la amplificación exponencial de ADN. Opcionalmente, el contaminante de ADN que contiene uracilo de una amplificación de ADN anterior se puede degradar por uracil ADN glucosilasa (UDG), también conocida como uracil-N-ADN glucosilasa (UNG). Véase Longo, *et al.*, (1990) *Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in polymerase chain reactions*, Gene 93:125. En este modo de realización, el tratamiento con UDG se lleva a cabo después de la etapa de extensión del cebador y antes de la etapa de amplificación exponencial. La etapa de extensión del cebador se lleva a cabo sin dUTP en la mezcla de reacción de modo que (excepto para el cebador de extensión) el producto de extensión del cebador no incorpore ningún uracilo. En la etapa de amplificación, algunos modos de realización utilizarían una ADN polimerasa tolerante de uracilo y dUTP para posibilitar la futura prevención del arrastre. En algunos modos de realización, no se lleva a cabo el tratamiento con UDG opcional. El molde que contiene uracilo no permite la extensión del cebador si se usa la polimerasa bloqueada por uracilo de acuerdo con la presente invención. El ácido nucleico de arrastre monocatenario con un cebador no extendido se digiere con nucleasas.

Los procedimientos de la presente invención se pueden usar como parte de un diseño experimental más complejo. En algunos modos de realización, se usan los productos de la extensión del cebador o amplificación posterior para el protocolo de secuenciación de ácidos nucleicos, incluyendo secuenciación de molécula única de alto rendimiento. Específicamente, el procedimiento puede ser una parte de una etapa de generación de colecciones en la que la extensión del cebador (y amplificación opcional) multiplex genera una colección de ácidos nucleicos diana que se van a secuenciar. Los ácidos nucleicos diana en la colección se pueden modificar para que incorporen códigos de barras para la identificación molecular (ID molecular único (MID)) e identificación de muestras (ID de muestra multiplex (SID)). Estas secuencias de código de barras pueden incorporar uno o ambos cebadores o en el adaptador.

La secuenciación se puede realizar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. La secuenciación de molécula única de alto rendimiento es especialmente ventajosa. Los ejemplos de dichas tecnologías incluyen la plataforma HiSeq de Illumina (Illumina, San Diego, Cal.), la plataforma Ion Torrent (Life Technologies, Grand Island, NY), la plataforma de Pacific BioSciences que utiliza los reactivos de SMRT® (Pacific Biosciences, Menlo Park, Cal.), o la tecnología de secuenciación basada en nanoporos desarrollada por Genia Technologies (Mountain View, Cal.) u Oxford Nanopore Technologies (Cambridge, Reino Unido) o cualquier otra tecnología de secuenciación de molécula única existente actualmente o futura que implique o no secuenciación por síntesis. En algunos modos de realización, la secuenciación utiliza un sitio de cebador universal presente en adaptadores ligados a uno o ambos extremos del ácido nucleico diana o en cebadores usados para copiar o amplificar los ácidos nucleicos diana antes de la secuenciación. Aún en otros modos de realización, se usa un cebador específico de gen para la secuenciación.

Una muestra usada en el procedimiento de la invención comprende cualquier muestra de un individuo (por ejemplo, un paciente humano) o muestra ambiental o una preparación de laboratorio que contenga ácidos nucleicos. Los polinucleótidos se pueden extraer de la muestra o la muestra se puede someter directamente a los procedimientos de la invención. La muestra de partida también puede ser ácidos nucleicos, ADN o ARN, aislados o extraídos. La muestra puede constituir cualquier tejido o líquido obtenido de un organismo. Por ejemplo, la muestra puede ser una biopsia de tumor o una muestra de sangre o plasma. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra fijada con formol e incluida en parafina (FFPE). La muestra puede comprender ácidos nucleicos de una o más fuentes, por ejemplo, uno o más pacientes. En algunos modos de realización, los tejidos se pueden infectar con un patógeno y, por tanto, contener ácidos nucleicos del huésped y del patógeno.

Los procedimientos de extracción de ADN son bien conocidos en la técnica. Véase J. Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 1989, 2.ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, N.Y.). Una variedad de kits están disponibles comercialmente para extraer ácidos nucleicos (ADN o ARN) de muestras biológicas (por ejemplo, BD Biosciences Clontech (Palo Alto, Cal.), Epicentre Technologies (Madison, Wis.); Gentra Systems, Inc. (Minneapolis, Minn.); y Qiagen, Inc. (Valencia, Cal.), Ambion, Inc. (Austin, Tex.); BioRad Laboratories (Hercules, Cal.); y más.

En algunos modos de realización, la muestra de partida usada en el procedimiento de la invención es una colección, una colección genómica o una colección de expresión que comprende una pluralidad de polinucleótidos. En otros modos de realización, se crea una colección usando el procedimiento de extensión del cebador de la invención. Siendo el material de partida una muestra biológica, el procedimiento crea una colección de

amplificación o una colección de amplicones que representan variedad o secuencias. Una colección se puede almacenar y usar múltiples veces para amplificación o secuenciación adicional de los ácidos nucleicos en la colección.

5 En algunos modos de realización, la invención es un kit para la extensión del cebador de un ácido nucleico diana que evita o tiene un número reducido de dímeros de cebadores. El kit comprende uno o más cebadores específicos de diana que contienen una base modificada y una ácido nucleico polimerasa que paraliza la síntesis de la hebra tras alcanzar la base modificada en la hebra molde. En algunos modos de realización, la polimerasa es una polimerasa de arqueas. En algunos modos de realización, la base modificada es uracilo y la polimerasa es una polimerasa de la familia B de arqueas. En otros modos de realización, el nucleótido modificado es abásico y la polimerasa es una polimerasa replicativa. Aún en otros modos de realización, el nucleótido modificado es un dímero de pirimidina y la polimerasa es una polimerasa replicativa. En algunos modos de realización, el kit comprende además un adaptador. El adaptador puede comprender secuencias necesarias para otras etapas de análisis *in vitro*, tales como uno o más códigos de barras moleculares, sitios de ligación y sitios de unión a cebador universal. El kit también puede contener reactivos y enzimas para la síntesis, amplificación, ligación y purificación de ácidos nucleicos, incluyendo digestión con exonucleasa de los cebadores y sondas en exceso.

En algunos modos de realización, la invención es una mezcla de reacción para la extensión del cebador de un ácido nucleico diana que evita o tiene un número reducido de dímeros de cebadores. La mezcla de reacción comprende uno o más cebadores específicos de diana que contienen una base modificada y una ácido nucleico polimerasa que paraliza la síntesis de la hebra tras alcanzar la base modificada en la hebra molde. En algunos modos de realización, la polimerasa es una polimerasa de arqueas. En algunos modos de realización, la base modificada es uracilo y la polimerasa es una polimerasa de la familia B de arqueas. En otros modos de realización, el nucleótido modificado es abásico y la polimerasa es una polimerasa replicativa. Aún en otros modos de realización, el nucleótido modificado es un dímero de pirimidina y la polimerasa es una polimerasa replicativa.

Ejemplos

Ejemplo 1 (profético) Captura con dianas con reactividad cruzada reducida de sondas de inversión molecular (MIP).

Se han usado sondas de inversión molecular (MIP) para enriquecer secuencias diana en aplicaciones de secuenciación de nueva generación. Las agrupaciones de sondas usadas pueden generar cientos e incluso miles de amplicones diana. Sin embargo, el diseño de sondas para que funcionen bien en el contexto de cientos o miles de otras sondas no es trivial. Esto se debe a las interacciones que se pueden producir entre sondas que crean productos indeseables en las colecciones finales. Esta situación se puede exacerbar cuando se usan secuencias de identificador único en estas sondas, ya que son secuencias aleatorias genomanipuladas en las sondas para posibilitar la identificación de moléculas por medio de secuenciación. La incorporación de bases de uracilo en las sondas de inversión molecular debería reducir la generación de productos indeseables al bloquear la extensión por polimerasa cuando dos sondas interactúan.

Como se muestra en la figura 2, si una MIP se hibrida a otra MIP, se inicia la extensión del cebador, la ligación cierra el círculo y el producto resultante se protege de la digestión con nucleasa. De acuerdo con la invención, la MIP que contiene uracilo se incuba con el ácido nucleico diana y la polimerasa de acuerdo con las condiciones de reacción estándar recomendadas para la MIP. La mezcla de reacción se somete a extensión del cebador, ligación y, opcionalmente, amplificación posterior. Existe una etapa opcional de digerir los ácidos nucleicos lineales (no circulares) con exonucleasa. Se usa una mezcla de exonucleasas monocatenarias y bicatenarias (exonucleasa ExoI y T7). Como se muestra en la figura 3, la interacción cebador-cebador puede dar como resultado la hibridación, pero no existe ninguna extensión del cebador ni ligación en el producto de hibridación. Durante la etapa de amplificación, el producto de hibridación no se puede amplificar. La amplificación posterior se lleva a cabo con una polimerasa tolerante de uracilo. Si se desea la prevención del arrastre, después de la etapa de extensión del cebador, la mezcla de reacción se trata con UDG. Si se desea la prevención del arrastre posterior, la amplificación se lleva a cabo en presencia de dUTP.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de amplificación de un ácido nucleico diana en una muestra con interacción cebador-cebador reducida que comprende:
- 10 a. una etapa de extensión del cebador, en la que la muestra se pone en contacto con una ácido nucleico polimerasa y un primer cebador complementario al ácido nucleico diana que comprende al menos un nucleótido modificado que paraliza la incorporación de nucleótidos por la polimerasa, para generar un producto de extensión del cebador; y
- 15 b. ligar el mismo a un adaptador bicatenario; y
- c. una etapa de amplificación exponencial, en la que la muestra se pone en contacto con un segundo cebador complementario al producto de extensión del cebador.
- 20 en la que la etapa de amplificación exponencial utiliza una polimerasa tolerante del nucleótido modificado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el adaptador y el primer cebador comprenden sitios de unión para cebadores de amplificación universales y el segundo cebador es un cebador universal.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1-2, en el que el cebador es un oligonucleótido monocatenario que consiste en dos brazos complementarios a una secuencia diana separados por una secuencia conectora no complementaria a la secuencia diana.
4. El procedimiento de la reivindicación 1-3, que comprende además una etapa de purificación antes de la etapa b., en la que el primer cebador y el ácido nucleico molde se separan del producto de extensión del cebador.
5. El procedimiento de la reivindicación 1-4, en el que el nucleótido modificado es uracilo.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además una etapa de prevención del arrastre antes de la etapa b., en la que la muestra se pone en contacto con uracil ADN glucosilasa.
7. Uso de un kit para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra de acuerdo con las reivindicaciones 1-6.
- 35 8. Uso de una mezcla de reacción para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra de acuerdo con las reivindicaciones 1-6.

FIGURA 1

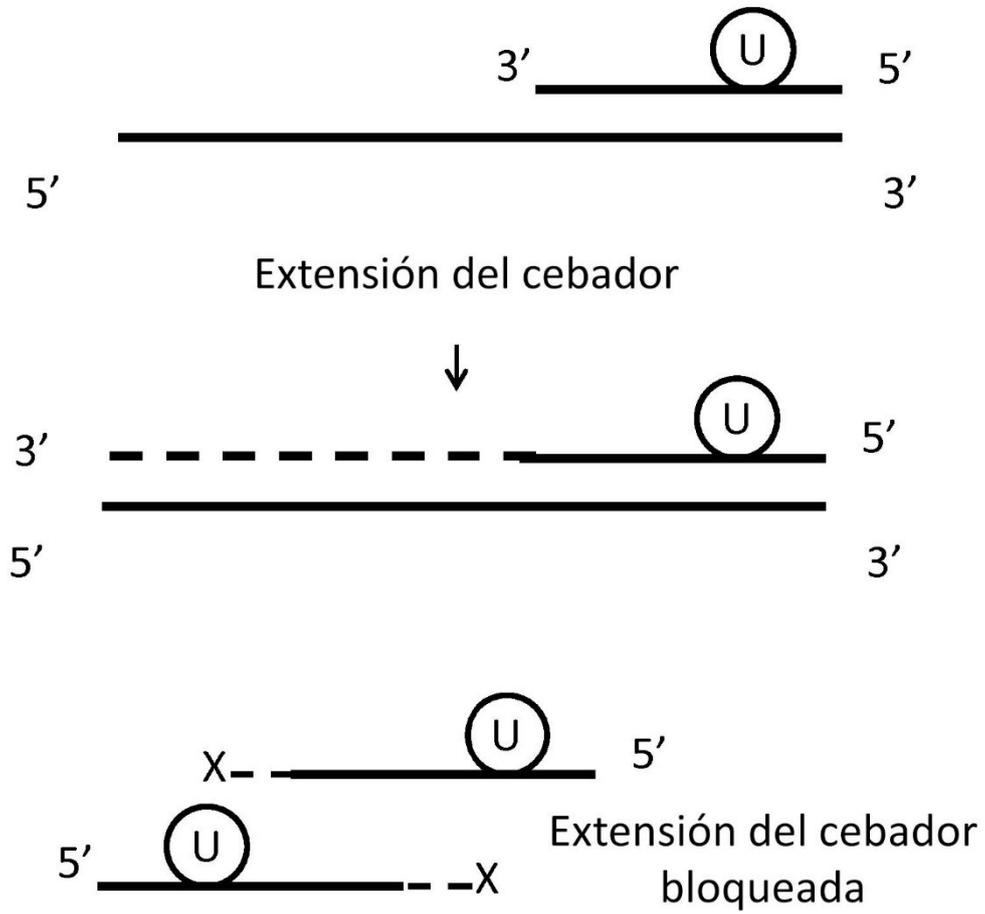


Fig. 2

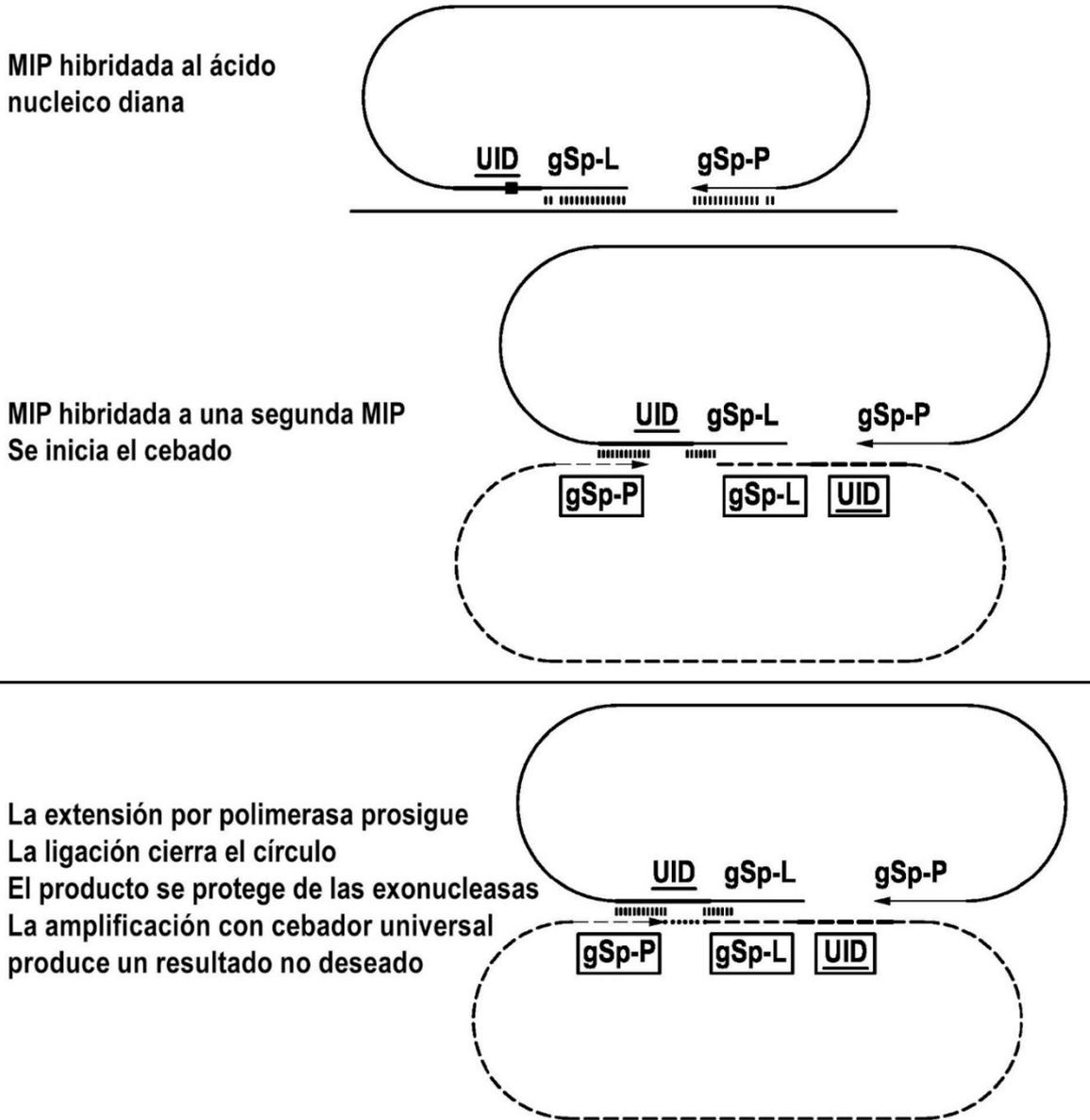
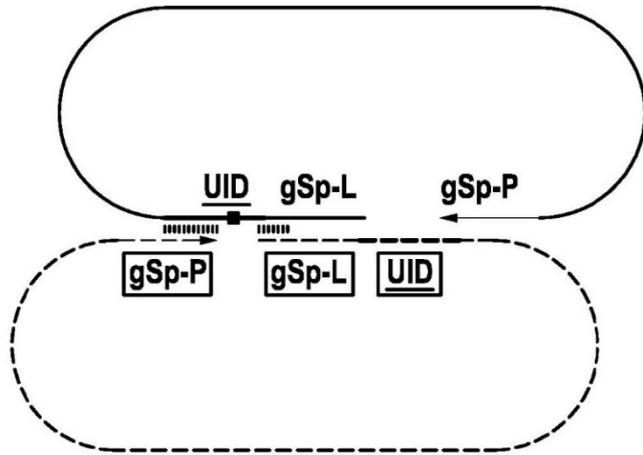


Fig. 3

MIP hibridada a una segunda MIP
Se inicia el cebado



La extensión por polimerasa se detiene
No es posible la ligación
Las MIP se digieren por exonucleasas
Ningún producto se amplifica por PCR
con cebador universal

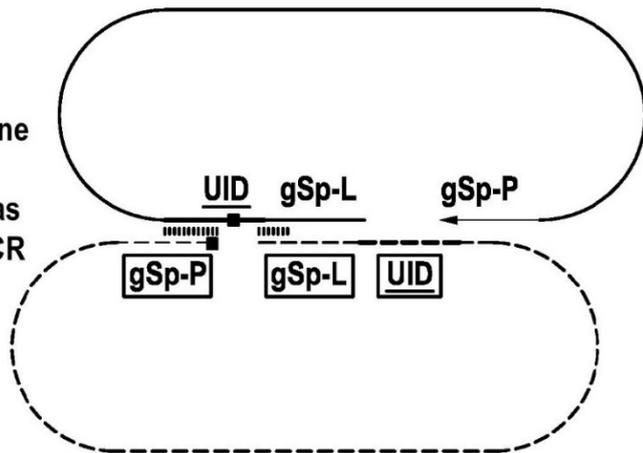


FIGURA 4

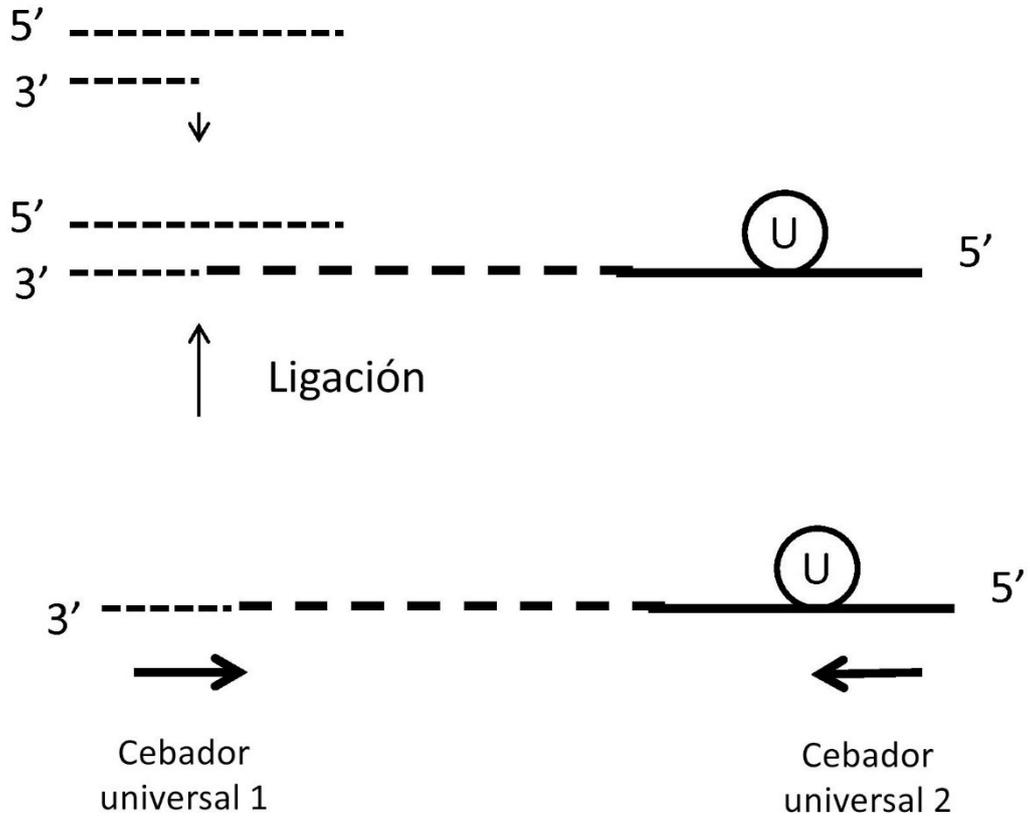


Fig. 5

