



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016016546-2 B1**



**(22) Data do Depósito: 18/12/2014**

**(45) Data de Concessão: 06/09/2022**

---

**(54) Título:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AMPLICON E MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE UM GENE ASSOCIADO A CÂNCER E DE UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS VERDADEIRA

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

**(30) Prioridade Unionista:** 16/01/2014 US 61/928,368.

**(73) Titular(es):** ILLUMINA, INC..

**(72) Inventor(es):** HONGXIA XU; ALEX ARAVANIS; SHENGRONG LIN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2014071263 de 18/12/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/108663 de 23/07/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 18/07/2016

**(57) Resumo:** PREPARAÇÃO DE AMPLICONS E SEQUENCIAMENTO SOBRE SUPORTES SÓLIDOS. A presente revelação refere-se ao campo de biologia molecular e, especificamente, a métodos para capturar, amplificar e sequenciar polinucleotídeos alvo sobre uma superfície sólida.

“MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AMPLICON E MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE UM GENE ASSOCIADO A CÂNCER E DE UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS VERDADEIRA”

#### ANTECEDENTES

[001]A presente revelação refere-se, de modo geral, a métodos e composições para amplificação e sequenciamento de ácido nucleico e, mais especificamente, à captura e sequenciamento de polinucleotídeos alvo em um suporte sólido.

[002]Visto que as informações codificadas em um polinucleotídeo (por exemplo, DNA ou RNA) é de extrema importância para a medicina e ciências da vida, há a necessidade de sequenciar um polinucleotídeo de forma rápida e econômica. Atualmente, técnicas de sequenciamento comerciais exigem preparação de amostra e biblioteca, ambas são trabalhosas. Ademais, as leituras são mais lentas que o desejado para muitas aplicações. Portanto, o rendimento é limitado e o custo é relativamente alto.

[003]Dessa forma, há a necessidade de métodos mais rápidos e eficientes para preparar e sequenciar polinucleotídeos alvo. A presente revelação satisfaz essa necessidade e fornece vantagens relacionadas também.

#### SUMÁRIO DE MODALIDADES

[004]A revelação fornece um método para a preparação de amplicons. O método inclui: (a) colocar uma amostra de ácido nucleico que inclui uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com pelo menos um iniciador sob condições suficientes para hibridização, o pelo menos um iniciador contém um adaptador; (b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons; (c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados em um suporte sólido com a pluralidade de amplicons sob condições suficientes para a hibridização de modo a produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados,

sendo que o suporte sólido inclui adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais; (d) estender a pluralidade de iniciadores de captura específicos para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados complementares aos polinucleotídeos alvo; (e) anelar a pluralidade de iniciadores de captura universais à pluralidade dos produtos de extensão imobilizados e (f) amplificar por PCR a pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a população de amplicons imobilizados inclui uma uniformidade de 85% ou mais. O método pode ser usado com 10 ng ou menos de ácido nucléico de entrada e pode incluir, ainda, sequenciar a segunda pluralidade de amplicons imobilizados. O método também pode ser usado para determinar a presença de um gene associado a um distúrbio ou doença, incluindo um gene associado a câncer. O DNA isento de células também pode ser empregado no método da revelação.

[005]A revelação fornece adicionalmente um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos. O método inclui: (a) colocar uma amostra de ácido nucleico que inclui uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com iniciadores diretos e reversos gene-específicos sob condições suficientes para hibridização, sendo que cada espécie do iniciador direto gene-específico inclui um índice de sequência exclusivo e um adaptador; (b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons; (c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados sobre um suporte sólido com a pluralidade de amplicons sob condições suficientes para a hibridização de modo a produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados, sendo que o suporte sólido inclui adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais; (d) estender a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados

complementares aos polinucleotídeos alvo; (e) anelar a pluralidade de iniciadores de captura universais à pluralidade dos produtos de extensão imobilizados; (f) amplificar por PCR a pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a segunda pluralidade de amplicons imobilizados inclui uma uniformidade de 85% ou mais; (g) sequenciar a segunda pluralidade de amplicons imobilizados, e (h) eliminar erros de sequência aleatória para um ou mais polinucleotídeos alvo comparando-se três ou mais sequência de nucleotídeos em uma posição variante para uma espécie de polinucleotídeo alvo, em que as espécies de polinucleotídeos alvo são identificadas pelo índice de sequência exclusivo para, dessa forma, determinar uma variante de sequência de nucleotídeos no um ou mais polinucleotídeos alvo. O método pode detectar uma taxa de incompatibilidade de 0,3% ou menos para uma posição de nucleotídeo variante.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[006]A Figura 1 é um esquema que mostra etapas exemplificadoras na preparação e sequenciamento de amplicons sobre um suporte sólido.

[007]A Figura 2 mostra uma comparação entre a uniformidade de sequenciamento e a profundidade de sequenciamento para duas quantidades de entrada diferentes de ácido nucleico para uma série de sequenciamento de 100 ciclos multiplex de DNA genômico. A Figura 3 mostra uma comparação entre a uniformidade de sequenciamento e a profundidade de sequenciamento para quatro quantidades de entrada diferentes de ácido nucleico para uma série de sequenciamento de 50 ciclos multiplex de DNA obtida a partir de tecido fixado em formalina, embebido em parafina.

[008]A Figura 4 mostra uma comparação entre a uniformidade de sequenciamento e a profundidade de sequenciamento para 10 ng de DNA isento de célula isolado de 1 ml de plasma para uma série de sequenciamento multiplex.

[009]A Figura 5 é um esquema que exemplifica o uso de códigos de barras

moleculares exclusivos ou índices de nucleotídeo para distinguir variantes de nucleotídeo reais em erros de sequenciamento de nucleotídeo aleatório.

[010]A Figura 6 mostra uma comparação entre as taxas de incompatibilidade de nucleotídeo com (direita) e sem (esquerda) o uso de correção de código de barras molecular exclusivo.

[011]A Figura 7 é um esquema que mostra uma incorporação em uma única etapa de um índice em um polinucleotídeo alvo através de um iniciador de amplificação específico alvo em que o índice está a jusante de um sítio de ligação de iniciador de sequenciamento.

[012]A Figura 8 é um esquema que mostra uma incorporação em duas etapas de um índice em um polinucleotídeo alvo através de um iniciador de sequenciamento em que o índice está a montante do sítio de ligação de iniciador de sequenciamento.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES

[013]Esta revelação refere-se a métodos para a preparação rápida e eficiente e sequenciamento de polinucleotídeos alvo. Os métodos incluem amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de polinucleotídeos alvo, imobilização direta a um suporte sólido, amplificação e sequenciamento clonal. Os mesmos podem ser empregados individualmente ou utilizados juntamente em um procedimento integrado que permite um rápido sequenciamento de amplicon amostra-resposta. O método integrado é particularmente útil, pois a preparação de biblioteca de amplicon é desnecessária, dessa forma, eliminando ineficiências relacionadas à ligação. Outros atributos particularmente úteis do método integrado para o sequenciamento incluem, por exemplo, eliminar a necessidade de purificação de amplicon e etapas de enriquecimento adicionais após a PCR, permitir uma etapa de hibridização rápida para imobilização de amplicon e podem ser utilizados com quantidades muito pequenas de ácido nucleico de entrada enquanto obtém resultados de sequenciamento de alta

qualidade.

[014]Em uma modalidade específica, os métodos da presente revelação empregam PCR multiplex de uma população de polinucleotídeos alvo em que um iniciador contém um adaptador que é complementar a um oligonucleotídeo imobilizado sobre um suporte sólido. A população amplificada de polinucleotídeos alvo é imobilizada sobre um suporte sólido sem ser, primeiramente, submetida a uma etapa de purificação. A imobilização ocorre por hibridização a oligonucleotídeos de captura específicos alvo que foram pré-inoculados sobre o suporte sólido. O adaptador da população amplificada de polinucleotídeos alvo é anelado aos oligonucleotídeos complementares imobilizados e aos oligonucleotídeos complementares são usados como um iniciador em uma reação de extensão para produzir uma população de polinucleotídeos alvo de dupla fita. Após a amplificação clonal, as colônias de polinucleotídeo alvo são submetidas a sequenciamento multiplex que consiste em 35 ciclos ou mais.

[015]Conforme usado no presente documento, o termo “pluralidade” se refere a uma população de dois ou mais polinucleotídeos diferentes ou outra molécula citada. Consequentemente, exceto onde determinado em contrário, o termo “pluralidade” é usado de forma sinônima de população. Uma pluralidade inclui 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 ou mais membros diferentes da população. Uma pluralidade também pode incluir 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 2x205, 2x105, 3x105, 4x105, 5x105, 6x105, 7x105, 8x105, 9x105, 1x106, 2x106, 3x106, 4x106, 5x106, 6x106, 7x106, 8x106, 9x106 ou 1x107, ou mais membros diferentes. Uma pluralidade inclui todos os números inteiros entre os números de populações exemplificadores acima.

[016]Como usado no presente documento, o termo “polinucleotídeo alvo” se destina a significar um polinucleotídeo que é o objeto de uma análise ou ação. A análise ou ação inclui submeter o polinucleotídeo à cópia, amplificação, sequencia-

mento e/ou outro procedimento para a interrogação de ácido nucleico. Um polinucleotídeo alvo pode incluir sequências de nucleotídeos adicionais à sequência-alvo que será analisada. Por exemplo, um polinucleotídeo alvo pode incluir um ou mais adaptadores, incluindo um adaptador que funciona como um sítio de ligação de iniciador, que flanqueia(m) uma sequência de polinucleotídeos alvo que será analisada. Um polinucleotídeo alvo hibridizado a um oligonucleotídeo de captura ou iniciador de captura pode conter nucleotídeos que se estendem além da extremidade 5' ou 3' do oligonucleotídeo de captura de modo que nem todo o polinucleotídeo alvo seja passível de extensão. Em modalidades particulares, conforme apresentado em mais detalhes abaixo, uma pluralidade de polinucleotídeos alvo inclui espécies diferentes que se diferem em suas sequências de polinucleotídeo alvo, porém têm adaptadores que são iguais para duas ou mais espécies diferentes. Os dois adaptadores que podem flanquear uma sequência de polinucleotídeos alvo particular podem ter a mesma sequência ou os dois adaptadores podem ter sequências diferentes. Conseqüentemente, uma pluralidade de polinucleotídeos alvo diferentes pode ter a mesma sequência de adaptadores ou duas sequências de adaptadores diferentes em cada extremidade da sequência de polinucleotídeos alvo. Dessa forma, as espécies em uma pluralidade de polinucleotídeos alvo podem incluir regiões de sequência conhecida que flanqueiam regiões de sequência desconhecida que flanqueiam regiões de sequência desconhecida que serão avaliadas, por exemplo, por sequenciamento. Em casos em que os polinucleotídeos alvo transportam um adaptador em uma única extremidade, o adaptador pode ser localizado tanto na extremidade 3' como na extremidade 5' do polinucleotídeo alvo. Os polinucleotídeos alvo podem ser usados sem qualquer adaptador, nesse caso, uma sequência de ligação de iniciador pode se originar diretamente de uma sequência encontrada no polinucleotídeo alvo.

[017]Conforme usado no presente documento, o termo “diretamente” quando usado em referência ao contato de uma pluralidade de iniciadores de captura se

destina a significar que o material de contato é aplicado à pluralidade de iniciadores de captura sem uma etapa de purificação interveniente significativa seguindo um procedimento mencionado. As etapas de purificação intervenientes significativas incluem aqueles procedimentos que se destinam a reduzir a complexidade de componentes celulares, incluindo reduzir a presença de iniciadores, enzimas e modelos não amplificados ou incorretamente amplificados após uma reação de amplificação, por exemplo. As etapas de purificação intervenientes significativas não se destinam a incluir a modificação de tampões, precipitação dos ácidos nucleicos de amostra e outros procedimentos de manipulação de ácido nucleico menores.

[018]Conforme usado no presente documento, o termo “iniciadores de captura” se destina a significar um oligonucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeos que é capaz de se anelar especificamente a uma sequência de polinucleotídeos de fita simples que será analisada ou submetida a uma interrogação de ácido nucleico sob condições encontradas em uma etapa de anelamento de iniciador, por exemplo, de uma amplificação ou reação de sequenciamento. Geralmente, os termos “ácido nucleico”, “polinucleotídeo” e “oligonucleotídeo” são usados de forma intercambiável no presente documento. Os termos diferentes não se destinam a denotar qualquer diferença particular em tamanho, sequência ou outra propriedade, exceto quando especificamente indicado em contrário. Para clareza de descrição, os termos podem ser usados para distinguir uma espécie de ácido nucleico de outra quando se descreve um método ou composição particular que inclui várias espécies de ácido nucleico.

[019]Como usado no presente documento, o termo “alvo-específico” quando usado em referência a um iniciador de captura ou outro oligonucleotídeo se destina a significar um iniciador de captura ou outro oligonucleotídeo que inclui uma sequência de nucleotídeos específica a uma sequência de polinucleotídeos alvo, isto é, uma sequência de nucleotídeos capaz de se anelar seletivamente a uma região de identi-

ficação de um polinucleotídeo alvo. Os iniciadores de captura específicos alvo podem ter uma única espécie de oligonucleotídeo, ou podem incluir duas ou mais espécies com sequências diferentes. Dessa forma, os iniciadores de captura específicos alvo podem ser duas ou mais sequências, incluindo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais sequências diferentes. Os oligonucleotídeos de captura específicos alvo podem incluir uma sequência de iniciadores de captura alvo-específica e sequência de iniciadores universal. Outras sequências como sequências de iniciador de sequenciamento e similares também podem ser incluídas em um iniciador de captura específico alvo.

[020]Em comparação, o termo “universal” quando usado em referência a um iniciador de captura ou outra sequência de oligonucleotídeos se destina a significar um iniciador de captura ou outro oligonucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeos comum entre uma pluralidade de iniciadores de captura. Uma sequência comum pode ser, por exemplo, uma sequência complementar à mesma sequência de adaptador.

[021]Os iniciadores de captura universais são aplicáveis para interrogar uma pluralidade de polinucleotídeos diferentes sem necessariamente distinguir as espécies diferentes enquanto iniciadores de captura específicos alvo são aplicáveis para distinguir as espécies diferentes.

[022]Como usado no presente documento, o termo “índice” quando usado em referência a uma sequência de nucleotídeos se destina a significar uma sequência de nucleotídeos exclusiva que é distinguível de outros índices bem como de outras sequências de nucleotídeos dentro dos polinucleotídeos contidos dentro de uma amostra. Um índice de nucleotídeo pode ser uma sequência de nucleotídeos aleatória ou uma especificamente desenhada. Um índice de qualquer comprimento de sequência desejado desde que tenha comprimento suficiente para ser uma sequência de nucleotídeos exclusiva dentro de uma pluralidade de índices em uma população

e/ou dentro de uma pluralidade de polinucleotídeos que estão sendo analisados ou interrogados. Um índice de nucleotídeo da revelação é útil, por exemplo, para ser fixado a um polinucleotídeo alvo para etiquetar ou marcar uma espécie particular para identificar todos os membros das espécies etiquetadas dentro de uma população. Consequentemente, um índice é útil como um código de barras em que membros diferentes da mesma espécie molecular podem conter o mesmo índice e em que espécies diferentes dentro de uma população de polinucleotídeos diferentes podem ter índices diferentes.

[023]Como usado no presente documento, o termo “imobilizado” quando usado em referência a um ácido nucleico se destina a significar ligação direta ou indireta a um suporte sólido através de ligação(ões) covalente(s) ou não covalente(s). Em certas modalidades da revelação, ligação covalente pode ser usada, porém, geralmente, tudo o que é necessário é que os ácidos nucleicos permaneçam estacionários ou ligados a um suporte sob condições em que se destina a usar o suporte, por exemplo, em aplicações que exigem amplificação e/ou sequenciamento de ácidos nucleicos. Tipicamente, os oligonucleotídeos que serão usados como iniciadores de captura ou iniciadores de amplificação são imobilizados de modo que uma extremidade 3' esteja disponível para extensão enzimática e pelo menos uma porção da sequência seja capaz de se hibridizar a uma sequência complementar. A imobilização pode ocorrer através de hibridização a um oligonucleotídeo ligado à superfície, nesse caso, o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo imobilizado pode estar na orientação 3'-5'. Alternativamente, a imobilização pode ocorrer por um meio diferente de hibridização por pareamento de bases, como a ligação covalente apresentada acima.

[024]Conforme usado no presente documento, o termo “suporte sólido” se destina a significar qualquer substrato insolúvel ou matriz ao qual ácidos nucleicos podem ser ligados, como, por exemplo, esferas de látex, esferas de dextrano, super-

fícies de poliestireno, superfícies de polipropileno, gel de poliacrilamida, superfícies de ouro, superfícies de vidro e pastilhas de silício. A superfície pode ter qualquer formato desejado incluindo, por exemplo, plano, esférico ou poroso adequado para uma aplicação particular. Por exemplo, o suporte sólido pode ser uma superfície de vidro plana. O suporte sólido também pode ser montado sobre a parte interna de uma célula de fluxo para permitir a interação com soluções de vários reagentes.

[025]Em determinadas modalidades, o suporte sólido pode compreender um substrato inerte ou matriz que foi quimicamente funcionalizado, por exemplo, pela aplicação de uma camada ou revestimento de um material intermediário tendo grupos reativos que permitem a ligação covalente a polinucleotídeos. O material intermediário pode ser direta ou indiretamente ligado ao suporte sólido através de ligações covalentes ou não covalentes. A título de exemplo não limitativo, para a ligação não covalente a um suporte sólido, tais suportes podem incluir camada de hidrogel de poliacrilamida sobre um substrato inerte como vidro. E tais modalidades, os polinucleotídeos podem ser covalentemente ligados diretamente à camada intermediária (por exemplo, um hidrogel), porém a própria camada intermediária pode ser não covalentemente ligada a outras camadas do substrato ou matriz (por exemplo, um substrato vítreo).

[026]A revelação fornece um método para a preparação de amplicon. O método inclui: (a) colocar uma amostra de ácido nucleico tendo uma pluralidade de polinucleotídeos alvo com pelo menos um iniciador sob condições suficientes para a hibridização, o pelo menos um iniciador contém um adaptador; (b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons; (c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados sobre um suporte sólido com a pluralidade de amplicons sob condições suficientes para a hibridização de modo a produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados, o suporte

sólido tem adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais; (d) estender a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados complementares aos polinucleotídeos alvo; (e) anelar a pluralidade de iniciadores de captura universais à pluralidade dos produtos de extensão imobilizados, e (f) amplificar por PCR a pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a dita segunda pluralidade de amplicons imobilizados compreendem uma uniformidade de 85% ou mais.

[027]O método de preparação de amplicon da revelação integra uma ou mais características que aumentam a qualidade de amostra do polinucleotídeo alvo ou produto de interrogação do mesmo para permitir um processo de múltiplas etapas rápido e eficiente para a preparação de populações clonais de polinucleotídeos alvo imobilizados. Cada procedimento de preparação resulta em uma pluralidade de polinucleotídeos alvo prontos para uso que pode ser empregada em qualquer um dos procedimentos descritos no presente documento.

[028]Um método da revelação para a preparação de amplicon inclui colocar uma amostra de ácido nucléico tendo uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com pelo menos um iniciador sob condições suficientes para hibridização. O pelo menos um iniciador pode conter um adaptador.

[029]Uma amostra de ácido nucleico pode se originar de qualquer fonte desejada que inclui fontes eucarióticas ou procarióticas bem como fontes sintéticas. Em determinadas modalidades, a amostra de ácido nucleico irá se originar de um organismo de interesse e incluem ácido desoxirribonucleico genômico (DNA). Por exemplo, a amostra pode se originar de uma fonte humana em que informações genéticas são desejadas para propósitos diagnósticos ou terapêuticos. Similarmente, a amostra pode se originar de fontes de animais domésticos ou animais de fazenda, em que as informações genéticas também são desejadas para propósitos diagnósti-

cos ou terapêuticos. Outras fontes de uma amostra de ácido nucleico incluem, por exemplo, bactérias, levedura, fungos, roedores e similares. Com as indicações e orientações fornecidas no presente documento, os versados na técnica compreenderão que qualquer fonte de ácido nucleico pode ser usada nos métodos da revelação.

[030]Um polinucleotídeo alvo inclui qualquer ácido nucleico que seja interrogado. Nesse sentido, um polinucleotídeo alvo inclui, por exemplo, DNA genômico, cDNA, DNA livre de célula (cfDNA), ESTs, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA, snRNA, DNA mitocondrial e DNA ou RNA sintético. Em modalidades particulares, os polinucleotídeos alvo são DNA genômico e a interrogação é aplicável a informações diagnósticas ou intervenção terapêutica.

[031]Consequentemente, o termo “polinucleotídeo” se refere a ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). O termo deve ser entendido por incluir, como equivalentes, análogos tanto de DNA como RNA feitos de análogos de nucleotídeo e por ser aplicável a polinucleotídeos de fita simples (como senso ou antissenso) e dupla fita.

[032]As moléculas de polinucleotídeo alvo podem se originar em forma de DNA de dupla fita (dsDNA) (por exemplo, fragmentos de DNA genômico, produtos de PCR e amplificação e similares) ou podem se originar em forma de fita simples, como DNA ou RNA, e podem ser convertidas em forma de dsDNA. A título de exemplo, as moléculas de mRNA podem ser copiadas em cDNAs de dupla fita adequados para uso no método da revelação usando técnicas-padrão bem conhecidas. A sequência precisa das moléculas de polinucleotídeo alvo pode ser conhecida ou desconhecida.

[033]A amostra de ácido nucléico pode ser uma amostra inicial de DNA genômico não enriquecido. Como um exemplo de DNA genômico como uma amostra de ácido nucléico, um genoma humano consiste em aproximadamente 3,1 bilhões de bases de sequência. As estimativas exemplificadoras de outros genomas que

podem ser usados nos métodos da revelação são cerca de 2,7 Gbp (camundongo), 2,8 Gbp (rato), 1,7 Gbp (peixe paulistinha), 165 Mbp (mosca-das-frutas), 13,5 Mbp (*S. cerevisiae*), 390 Mbp (baiacu), 278 Mbp (mosquito) ou 103 Mbp (*C. elegans*). Os versados na técnica irão reconhecer que genomas tendo tamanhos diferentes daqueles exemplificados acima incluindo, por exemplo, genomas menores ou maiores, podem ser usados em um método da revelação. Em uma modalidade particular, as moléculas de polinucleotídeo alvo são moléculas de DNA. Mais particularmente, as moléculas de polinucleotídeo alvo representam o complemento genético inteiro de um organismo, e são moléculas de DNA genômicas que incluem tanto sequências de íntrons como éxons (sequência de codificação), bem como sequências reguladoras não codificantes como sequências promotoras e intensificadoras. Os subconjuntos particulares de sequências de polinucleotídeo ou DNA genômico também podem ser usados, como cromossomos particulares. Ainda mais particularmente, a sequência das moléculas de polinucleotídeo alvo ou uma porção da mesma pode ser uma sequência alvo. Ainda mais particularmente, as moléculas de polinucleotídeo alvo são moléculas de DNA genômico, por exemplo, de DNA genômico de humanos, mamíferos, bactérias, fungos ou plantas como anteriormente exemplificado.

[034]Consequentemente, a revelação fornece um método que emprega uma pluralidade de polinucleotídeos em que a pluralidade de polinucleotídeos alvo inclui uma pluralidade de ácidos nucleicos genômicos.

[035]Em determinadas modalidades, os polinucleotídeos alvo correspondem a um DNA genômico obtido a partir de um indivíduo tendo ou suspeito de ter um distúrbio ou doença. Em outras modalidades, os polinucleotídeos alvo correspondem ao DNA genômico obtido a partir de um indivíduo suspeito de ter um distúrbio ou doença. Ainda em outras modalidades, os polinucleotídeos alvo correspondem a um DNA genômico obtido a partir de um indivíduo em que não há indicação de ter um distúrbio ou doença. Na modalidade anterior, os métodos da realização podem ser

usados, por exemplo, para confirmar a presença do distúrbio ou doença. Nas duas últimas modalidades, os métodos da revelação podem ser usados, por exemplo, para determinar a probabilidade ou prevalência de um distúrbio ou doença.

[036]O distúrbio ou doença que está sendo testado pode ser qualquer distúrbio ou doença que pode ser geneticamente determinado ou avaliado quanto à prevalência ou probabilidade. Tais distúrbios ou doenças incluem todos os distúrbios ou doenças geneticamente herdados bem como todos os distúrbios ou doenças que podem ser causados, ou correlacionados a uma alteração genética ou um alelo de gene específico. As alterações genéticas incluem, por exemplo, uma ou mais mutações de ácido nucleico. Tais doenças ou distúrbios são bem conhecidos pelos versados na técnica. Por exemplo, há mais de 19.000 genes conhecidos associados a distúrbios ou doenças genéticas (consulte, por exemplo, GENE CARDS, Weizmann Institute of Science, data de acesso em 6 de janeiro de 2014. URL: [genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full](http://genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full)). A presença ou ausência de qualquer ou todos esses genes ou mutações genéticas em um indivíduo pode ser avaliada empregando-se, por exemplo, DNA genômico daquele indivíduo nos métodos da revelação.

[037]Distúrbios ou doenças geneticamente exemplificadores incluem câncer, Fibrose Cística, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Hemofilia, neurofibromatose, Doença de Tay-Sachs, doença de Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, Acondroplasia, Deficiência de Alfa-1 Antitripsina, Síndrome Antifosfolípido, Autismo, Doença do Rim Policístico Dominante Autossômico, Charcot-Marie-Tooth, Cri du chat, Doença de Crohn, Doença de Dercum, Síndrome de Duane, Factor V de Leiden, Hipercolesterolemia Familiar, Febre Mediterrânea Familiar, Síndrome do X Frágil, Doença de Gaucher, Hemocromatose, Esferocitose Hereditária, Holoprosencefalia, síndrome de Klinefelter, síndrome de Marfan, Distrofia Miotônica, Síndrome de Noonan, Osteogênese imperfeita, Fenilcetonúria, Síndrome de Poland,

Porfíria, Doença do Rim Policístico, Discinesia Ciliar Primária, Progeria, Retinite Pigmentosa, Síndrome de Rett, Imunodeficiência Combinada Severa (SCID), doença falciforme, Atrofia Muscular Espinhal, Talassemia, Trimetilaminúria, Síndrome de Turner, Porfíria Variegata, Síndrome Velocardiofacial, Síndrome de WAGR e Doença de Wilson.

[038]Os cânceres exemplificadores incluem câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer gástrico, tumor estromal gastrointestinal, tumor miofibroblástico inflamatório, câncer de rim, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, retinoblastoma, câncer de pele incluindo melanoma, câncer de próstata, neurofibromatose, câncer ovariano, rabdomiossarcoma e câncer de tireoide.

[039]Uma fonte útil de DNA genômico de um indivíduo para determinar a presença, ausência ou predisposição de um distúrbio ou doença genética inclui cfDNA. O DNA isento de células é bem conhecido na técnica. Por exemplo, além da presença bem conhecida de ácidos nucleicos fetais na circulação materna, também é conhecido na técnica que outros ácidos nucleicos podem ser isolados e amplificados a partir de soro. Nesse sentido, Mulcahy et al, LANCET 348: 628 (1996), Cancer and Mutant DNA in Blood Plasma, analisaram, inter alia, vários relatórios que mostraram a presença de DNA circulante no plasma (Chen et al.) e soro (Narwoz et al.) de pacientes com câncer e também apontaram que a ocorrência de material genético livremente circulante com quantidades aumentadas foi descrita em indivíduos com câncer bem como doenças autoimunes. Ademais, a constatação de DNA circulante isento de células também não é exclusiva de estados de doença. Emanuel e Pestka, GATA 10(6): 144-146 (1993), Amplification of Specific Gene Products from Serum descrevem a presença de DNA livre em soro de indivíduos saudáveis e em quantidades suficientes para realizar análise genética por PCR. Ademais, Shapiro, Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease, Cancer 51(11):2116-20 (1983), relatam que a concentração de

DNA no soro é significativamente elevada em malignidade e moderadamente elevada em doença gastrointestinal benigna.

[040]Consequentemente, a revelação fornece um método para determinação da presença de um gene associado a câncer. O método inclui: (a) colocar uma amostra de ácido nucleico que inclui uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com pelo menos um iniciador sob condições suficientes para hibridização, o pelo menos um iniciador contém um adaptador; (b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons; (c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo específicos a um ou mais cânceres diferentes imobilizados sobre um suporte sólido com a pluralidade de amplicons sob condições suficientes para hibridização para produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados, o suporte sólido compreende adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais; (d) estender a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados complementares aos polinucleotídeos ; (e) anelar a pluralidade de iniciadores de captura universais à pluralidade dos produtos de extensão imobilizados; (f) amplificar por PCR a pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a população de amplicons imobilizados inclui uma uniformidade de 85% ou mais e (g) sequenciar a segunda pluralidade de produtos de extensão imobilizados para determinar a presença ou ausência de um gene associado a câncer. A pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser 10 ng ou menos ácido nucléico de entrada e o ácido nucléico de entrada pode ser cfDNA.

[041]As moléculas de polinucleotídeo alvo podem ser tratadas química ou enzimaticamente tanto antes como subsequente a qualquer um dos métodos descritos no presente documento. Nos métodos descritos no presente documento, as amostras de ácido nucléico podem ser fragmentadas ou podem ser usadas sem fra-

gmentação. As amostras podem ser submetidas a uma amplificação antes do uso, por exemplo, uma técnica de amplificação de amostra inteira como extensão de iniciador aleatório. A pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser colocada em contato com pelo menos um iniciador. A Figura 1, painel 1, ilustra uma configuração exemplificadora em que cada membro em uma pluralidade de polinucleotídeos alvo é colocada em contato e hibridizada a um par de iniciadores para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Conforme adicionalmente descrito abaixo, os polinucleotídeos alvo podem ser hibridizados a um único iniciador quando a PCR assimétrica é desejada. Como ilustrado na Figura 1, painel 1, pelo menos um iniciador também contém um adaptador que pode ser usado, por exemplo, em procedimentos a jusante. Consequentemente, a revelação fornece um método de amplificação que usa dois iniciadores e resulta em amplificação exponencial. Um ou ambos os iniciadores podem conter um adaptador. Também é fornecido um método de amplificação em que uma pluralidade de polinucleotídeos alvo é amplificada usando um iniciador, resultando em amplificação assimétrica. O um iniciador pode conter um adaptador.

[042] Geralmente, as reações de amplificação empregam dois iniciadores, geralmente denotados iniciadores direto e reverso. Os iniciadores de amplificação são tipicamente estruturas de polinucleotídeo de fita simples. Os mesmos também podem conter uma mistura de bases naturais ou não naturais e também ligações de cadeia principal naturais e não naturais, desde que, pelo menos em algumas modalidades, quaisquer modificações não naturais não excluam permanente ou irreversivelmente a função como um iniciador. Os iniciadores de amplificação têm a capacidade de se anelar a uma cadeia de polinucleotídeo modelo durante condições de uma reação de extensão ou amplificação e atuar como um ponto de iniciação da síntese enzimática de uma nova cadeia de polinucleotídeo complementar à cadeia modelo anelada.

[043] Os iniciadores podem incluir adicionalmente modificações químicas não

nucleotídicas, por exemplo, para facilitar a ligação covalente do iniciador a um suporte sólido se desejado. Certas modificações químicas podem, por si só, aprimorar a função da molécula como um iniciador ou podem fornecer outra funcionalidade útil, como fornecer um sítio de clivagem que permite que o iniciador (ou uma cadeia de polinucleotídeo estendida derivada do mesmo) seja clivado a partir de um suporte sólido. As modificações químicas úteis também podem fornecer modificações reversíveis que impedem a hibridização ou extensão do iniciador até a modificação ser removida ou revertida.

[044]Os iniciadores podem ser desenhados de modo que as extremidades 5' e as extremidades 3' transportem uma região de sequência conhecida. A sequência conhecida pode ser uma sequência universal como o termo é usado no presente documento e, portanto, tem uma sequência comum entre uma pluralidade de oligonucleotídeos. Alternativamente, por exemplo, a mesma pode ser uma sequência conhecida, porém exclusiva entre uma pluralidade de oligonucleotídeos. Uma sequência universal pode servir como um sítio conveniente para a hibridização de um iniciador para permitir a amplificação de múltiplas sequências diferentes usando um único par de iniciadores complementar à sequência universal. Ademais, uma sequência universal também pode servir como um adaptador complementar, por exemplo, a um iniciador de captura e permitir a imobilização do adaptador contendo polinucleotídeo no iniciador de captura em modalidades em que o iniciador de captura é ligado a um suporte sólido. A Figura 1, painel 1, ilustra uma sequência universal como um adaptador como a porção espessa sobre os iniciadores inferiores. Os iniciadores superiores também são ilustrados como contendo uma sequência que não se hibridiza com o polinucleotídeo alvo. Essa região pode ser uma sequência universal ou outra e pode ter uma sequência conhecida ou desconhecida se a mesma for uma sequência exceto uma sequência universal.

[045]Em uma modalidade, após a hibridização do pelo menos um iniciador, a

pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser submetida à amplificação, por exemplo, por PCR. A amplificação por PCR pode ser realizada com um iniciador direto e reverso como ilustrado na Figura 1, painel 1, para resultar em amplificação exponencial dos polinucleotídeos alvo. A amplificação por PCR também pode ser realizada com um iniciador para resultar em amplificação assimétrica ou linear dos polinucleotídeos alvo. A amplificação assimétrica é útil para produzir amplicons de fita simples da pluralidade de polinucleotídeos alvo. O produto de uma reação de amplificação descrito no presente documento é chamado de um amplicon. Conseqüentemente, a amplificação de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo irá produzir uma pluralidade de amplicons tendo a mesma seqüência de nucleotídeos que seu modelo.

[046]Embora exemplificado no presente documento com referência geral a reações de amplificação por PCR, com as indicações e orientações fornecidas no presente documento, os versados na técnica saberão que outros métodos para amplificar ácidos nucleicos, incluindo vários tipos diferentes de métodos PCR, são passíveis de serem usados nas etapas de amplificação reveladas no presente documento. Por exemplo, as reações de amplificação que empregam a hibridização de um oligonucleotídeo ao polinucleotídeo alvo são úteis nas etapas de amplificação reveladas no presente documento, pois as mesmas podem incluir um adaptador, por exemplo, para permitir a hibridização a um iniciador de captura. Tais outras reações de amplificação, incluindo tipos diferentes de métodos PCR incluem, por exemplo, PCR multiplex, PCR digital (dPCR), dial-out PCR, PCR alelo-específica, PCR assimétrica, amplificação helicase-dependente, hot start PCR, PCR mediada por ligação, miniprimer PCR, amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA), PCR aninhado, PCR quantitativa (qPCR), PCR de transcrição reversa (RT-PCR), PCR em fase sólida, reação em cadeia de ligase, amplificação de deslocamento de fitas (SDA), amplificação mediada por transcrição (TMA) e amplificação baseada em seqüência de ácido nucleico (NASBA), como descrito na Patente US nº 8.003.354.

[047]Os métodos multiplex para interrogação de polinucleotídeo são particularmente úteis para manipular e analisar pluralidades de polinucleotídeos alvo, pois os mesmos permitem a interrogação de muitas espécies diferentes de polinucleotídeos alvo em uma única reação. Os métodos multiplex incluem, por exemplo, amplificação multiplex e sequenciamento multiplex. Outros métodos de interrogação de ácido nucléico multiplex são bem conhecidos na técnica.

[048]Com referência exemplificadora à PCR multiplex, a amplificação multiplex consiste em múltiplos conjuntos de iniciadores dentro de uma única mistura de polinucleotídeos alvo para produzir amplicons de tamanhos variados que são específicos a sequências de polinucleotídeo alvo diferentes. Ao alvejar múltiplos polinucleotídeos alvo diferentes simultaneamente, as informações de sequência podem ser obtidas em uma pluralidade de polinucleotídeos alvo a partir de uma única reação de amplificação que, de outro modo, poderia exigir vários reagentes e mais tempo de execução. As temperaturas de anelamento para cada conjunto de iniciadores específico alvo podem ser otimizadas para operar corretamente dentro de uma única reação e os tamanhos de amplicon (isto é, comprimento de par de bases) podem ser iguais ou diferentes. Os kits de multiplexação para PCR estão disponíveis comercialmente e são bem conhecidos na técnica. O número de espécies de polinucleotídeo alvo diferentes pode variar dependendo da aplicação desejada. Por exemplo, a amplificação multiplex pode ser realizada em 25, 50, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ou mais espécies diferentes de polinucleotídeos alvo. A amplificação multiplex também pode ser realizada em uma pluralidade de polinucleotídeos alvo correspondentes a qualquer número inteiro dentro da faixa acima. Dessa forma, a revelação também fornece uma pluralidade de polinucleotídeos alvo tendo o número acima ou um número maior de membros diferentes de polinucleotídeos alvo, incluindo uma pluralidade de polinucleotídeos alvo tendo 200 ou mais sequências de nu-

cleotídeos diferentes.

[049]Consequentemente, a revelação fornece um método de amplificação de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em que o método inclui amplificação multiplex. A amplificação multiplex pode ser PCR multiplex. A revelação também fornece um método de amplificação multiplex tendo uma multiplexidade de 180 ou mais espécies de polinucleotídeos alvo diferentes.

[050]Outros métodos adequados para amplificação de ácidos nucleicos podem incluir extensão e ligação de oligonucleotídeo, amplificação por círculo rolante (RCA) (Lizardi et al., Nat. Genet. 19:225-232 (1998)) e tecnologias de ensaio de ligação de oligonucleotídeo (OLA) (Consulte geralmente Patente Nos. U.S. 7.582.420, 5.185.243, 5.679.524 e 5.573.907; EP 0 320 308 BI; EP 0 336 731 BI; EP 0 439 182 BI; WO 90/01069; WO 89/12696; e WO 89/09835,). Como um exemplo não limitar de extensão de iniciador e iniciadores de ligação que podem ser especificamente desenhados para amplificar um ácido nucleico de interesse, a amplificação pode incluir iniciadores usados para o ensaio GoldenGate assay (Illumina®, Inc., San Diego, CA) como exemplificado por Patente No. U.S. 7.582.420 e 7.611.869.

[051]Os métodos de amplificação isotérmica exemplificadores que podem ser usados em um método da presente revelação incluem, mas não se limitam a, Amplificação por Deslocamento Múltiplo (MDA) como exemplificado por, por exemplo Dean et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002) ou amplificação isotérmica de ácido nucleico por deslocamento de fita exemplificada por, por exemplo, Patente No. U.S. 6.214.587, cada uma dessas está integralmente incorporada no presente documento a título de referência em sua totalidade. Outros métodos não baseados em PCR que podem ser usados na presente revelação incluem, por exemplo, amplificação de deslocamento de fitas (SDA) que é descrita, por exemplo em Walker et al., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; Patente Nos. U.S. 5.455.166, e 5.130.238, e Walker et al, Nucl. Acids Res. 20: 1691-96 (1992) ou

amplificação por deslocamento de fitas hiper-ramificada que é descrita, por exemplo, em Lage et al., *Genome Research* 13:294 a 307 (2003). Os métodos de amplificação isotérmica podem ser usados com o fragmento de polimerase por deslocamento de fita Phi 29 ou o grande fragmento de DNA polimerase Bst , 5'->3' exo<"> para amplificação de iniciador aleatório de DNA genômico. O uso dessas polimerases tira vantagem de sua alta capacidade de processamento e atividade de deslocamento de fitas. A alta capacidade de processamento permite que as polimerases produzam fragmentos que têm 10 a 20 kb de comprimento. Como apresentado acima, fragmentos menores podem ser produzidos sob condições isotérmicas usando polimerases tendo baixa capacidade de processamento e atividade de deslocamento de fitas como polimerase Klenow. A descrição adicional de reações, condições e componentes de amplificação é apresentada em detalhes na revelação de Patente US nº 7.670.810, que está integralmente incorporada no presente documento a título de referência.

[052]Outro método de amplificação de ácido nucleico que é útil na presente revelação é PCR Marcada que usa uma população de iniciadores de dois domínios tendo uma região 5' constante seguido de uma região 3' aleatória conforme descrito, por exemplo, em Grothues et al. *Nucleic Acids Res.* 21(5): 1321-2 (1993). As primeiras séries de amplificação são realizadas para permitir uma grande variedade de iniciações em DNA desnaturado por calor baseado em hibridização individual da região 3' aleatoriamente sintetizada. Devido à natureza da região 3', os sítios de iniciação são contemplados para serem aleatórios ao longo do genoma. Depois disso, os iniciadores não ligados podem ser removidos e a replicação adicional pode ocorrer usando iniciadores complementares à região 5' constante.

[053]Os métodos de amplificação exemplificadores acima podem ser empregados para amplificar um ou mais polinucleotídeos alvo, incluindo uma pluralidade de polinucleotídeos alvo. Os polinucleotídeos alvo podem ser amplificados em solu-

ção ou imobilizados sobre um suporte sólido para produzir uma pluralidade de amplicons livres em solução ou uma pluralidade de amplicons imobilizados em um suporte sólido.

[054]A quantidade inserida de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em uma reação de amplificação pode variar a partir de microgramas ( $\mu\text{g}$ ) a nanogramas (ng) ou mais baixa. Em algumas modalidades, a quantidade inicial de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser, por exemplo, 100  $\mu\text{g}$  ou mais de ácido nucléico de entrada. A quantidade inicial também pode ser, por exemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90  $\mu\text{g}$  de ácido nucléico de entrada. Em outras modalidades, a quantidade inicial de ácido nucleico de entrada pode estar na faixa de nanograma, incluindo a baixa faixa em nanogramas. Em tais modalidades, a quantidade inicial de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser, por exemplo, 100 ng ou menos de ácido nucléico de entrada. A quantidade inicial também pode ser, por exemplo 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ou 10 ng ou menos de ácido nucléico de entrada. Em outras modalidades, a quantidade de partida de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser, por exemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 0,5 ng ou menos de ácido nucléico de entrada. A quantidade de partida também pode ser qualquer quantidade entre as quantidades exemplificadoras acima. Conseqüentemente, a revelação fornece um método em que uma pluralidade de polinucleotídeos alvo inclui 10 ng ou menos de ácido nucleico de entrada para uma reação de amplificação. Ademais, a pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser 1 ng de ácido nucléico de entrada ou 1 ng ou menos de ácido nucléico de entrada para uma reação de amplificação.

[055]Em algumas modalidades, uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados é colocada em contato com uma pluralidade de amplicons sob condições suficientes para a hibridização. A região específica alvo dos iniciadores de captura específicos alvo pode ser desenhada para se anelar a uma ou mais regiões de um polinucleotídeo alvo. Os iniciadores de captura de polinucleotí-

deo alvo hibridizados se tornarão imobilizados através do iniciador de captura específico alvo.

[056]A Figura 1, painel 2, exemplifica uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados em um suporte sólido. Nessa ilustração, os iniciadores de captura específicos alvo são mais longos que outros iniciadores de captura imobilizados no suporte sólido. Os versados na técnica compreenderão que é inconsequente se os iniciadores de captura específicos alvo forem mais longos, mais curtos do mesmo comprimento que outros iniciadores de captura que são imobilizados no suporte sólido. De preferência, qualquer iniciador de captura terá uma sequência necessária para realizar sua função. Os iniciadores de captura específicos alvo funcionam para se anelarem, tanto seletivamente como especificamente, a seu polinucleotídeo alvo. Outros iniciadores de captura como determinados iniciadores de captura universais se anelam a uma sequência conhecida como um adaptador, sítio de ligação de iniciadores ou outra sequência conhecida.

[057]Cada membro dentro de uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode ter a mesma sequência alvo específica ou sequências alvo específicas diferentes. Na modalidade anterior, uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo irá se anelar e capturar uma pluralidade da mesma espécie de polinucleotídeos alvo. Na última modalidade, uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo irá se anelar e capturar uma pluralidade de espécies diferentes de polinucleotídeos alvo. Geralmente, a região específica alvo de um iniciador de captura é desenhada para ser complementar à mesma região de um membro particular de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo. Entretanto, a região específica alvo também pode ser desenhada para ser complementar a sequências de nucleotídeos diferentes dentro de um polinucleotídeo alvo particular. Conseqüentemente, com as indicações e orientações fornecidas no presente documento, os versados na técnica compreenderão qual composição de membros que serão incluídos em uma

pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo são necessários para uma aplicação particular.

[058]Uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode ser grande ou pequena. Os versados na técnica irão entender que uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo irá conter pelo menos um iniciador de captura específico alvo para cada polinucleotídeo alvo que se deseja capturar. Uma pluralidade também pode incluir múltiplos iniciadores de captura específicos alvo para a mesma espécie de polinucleotídeo alvo, incluindo múltiplos iniciadores de captura específicos alvo para algumas ou todas as espécies de polinucleotídeos alvo dentro de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo. Conseqüentemente, a revelação fornece uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo que inclui 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou 200 ou mais membros diferentes da população. Uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo também pode incluir, por exemplo, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 50000,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^7$ , ou mais membros diferentes. Uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo também pode incluir todos os números inteiros entre os números de populações exemplificadores acima. Conseqüentemente, a revelação fornece uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo tendo 200 ou mais seqüências de nucleotídeos diferentes.

[059]A pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode ser imobilizada em um suporte sólido como ilustrado na Figura 1, painel 2. A pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo também pode ser usada livre em solução e subsequentemente imobilizada em um suporte sólido, por exemplo, por hibridização a um iniciador de captura tendo uma seqüência universal complementar a uma segunda região sobre o iniciador de captura específico alvo.

[060]Na modalidade específica em que a pluralidade de iniciadores de captu-

ra específicos alvo é, primeiramente, imobilizada em um suporte sólido como exemplificado na Figura 1, painel 2, os iniciadores de captura específicos alvo podem ser diretamente ligados ao suporte sólido como ilustrado. Alternativamente, os iniciadores de captura específicos alvo podem ser gerados sobre o suporte sólido a partir de iniciadores de captura universais. Nesse sentido, a porção mais espessa dos iniciadores de captura representa uma sequência universal que é pré-inoculada em um suporte sólido. Um iniciador de captura específico alvo ou uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo tendo uma região complementar ao iniciador universal pode ser, por exemplo, anelado ao iniciador de captura universal e, então, estendido para produzir o iniciador de captura específico alvo de comprimento total ou uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo como ilustrado na Figura 1, painel 2.

[061]As modalidades que empregam iniciadores de captura específicos alvo imobilizados são úteis, pois as mesmas permitem a normalização de uma pluralidade de amplicons. Por exemplo, o suporte sólido pode ser gerado de modo que o mesmo contenha um número de cópias padrão de cada espécie de iniciadores de captura específicos alvo, dessa forma, permitindo a captura de um número de cópias padrão de polinucleotídeos alvo ou amplicons dos mesmos. O número de cópias padrão de iniciadores de captura específicos alvo pode variar e pode ser desenhado de modo que um número de cópias padrão tanto de espécies de polinucleotídeo alvo abundantes como raras seja capturado em frequência igual. Em outras modalidades, as espécies diferentes de iniciadores de captura específicos alvo não são padronizadas e podem ser imobilizadas em qualquer razão desejada, incluindo aleatória. Com as indicações e orientações fornecidas no presente documento, os versados na técnica saberão se um número de cópias padronizado, incluindo um número de cópias de número igual, ou outra razão de espécies diferentes de iniciadores de captura específicos alvo é desejado para um uso específico.

[062] Além de ter uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo, um suporte sólido também pode incluir uma pluralidade de outros tipos de iniciadores de captura como ilustrado na Figura 1, painel 2. A pluralidade de iniciadores de captura pode ter sequências iguais ou diferentes. A Figura 1, painel 2, ilustra duas pluralidades de iniciadores de captura universais (seções espessas preenchidas e pontilhadas de oligonucleotídeo vertical). Nessa modalidade exemplificadora, uma pluralidade de iniciadores de captura universais é complementar ao adaptador adicionado à pluralidade de polinucleotídeos alvo. Os iniciadores de captura universais são úteis para capturar, por exemplo, uma pluralidade de polinucleotídeos alvo ou amplicons dos mesmos contendo o adaptador. Os iniciadores de captura universais também são úteis, por exemplo, para realizar a amplificação em ponte como ilustrado na Figura 1, painel 3, e descrito adicionalmente abaixo. Um suporte sólido pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais pluralidades diferentes de iniciadores de captura universais.

[063] Dessa forma, a revelação fornece uma pluralidade de polinucleotídeos alvo e/ou amplicons dos mesmos tendo um adaptador que é complementar a uma pluralidade de iniciadores de captura universais. O suporte sólido pode incluir um primeiro, segundo número ou número maior de pluralidades diferentes de iniciadores de captura universais. Também proporciona-se uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo tendo adicionalmente uma região de iniciador de captura universal. A região de iniciador de captura universal pode ter uma sequência de nucleotídeos correspondente a uma primeira ou segunda pluralidade de iniciadores de captura universais.

[064] Consequentemente, em algumas modalidades, os métodos desta revelação incluem fornecer um suporte sólido tendo uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados. Em algumas modalidades, fornecer um suporte sólido inclui imobilizar o iniciador de captura específico alvo sobre o suporte sólido.

do. Em algumas modalidades, a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo é imobilizada diretamente sobre o suporte sólido.

[065]Em algumas modalidades, o iniciador de captura específico alvo é montado sobre o suporte sólido em uma ou mais etapas. Em algumas modalidades, a imobilização de um iniciador de captura específico alvo inclui imobilizar um iniciador de captura universal sobre o suporte sólido. Em determinadas modalidades, a imobilização do iniciador de captura específico alvo inclui adicionalmente converter o iniciador de captura universal imobilizado no iniciador de captura específico alvo. Em determinadas modalidades a imobilização do iniciador de captura específico alvo inclui adicionalmente anelar um oligonucleotídeo imobilizador com o iniciador de captura universal, em que o oligonucleotídeo imobilizador inclui uma região universal complementar a uma região universal de um iniciador de captura específico alvo e uma região específica alvo complementar a uma região específica alvo em um nucleotídeo alvo. Em determinadas modalidades, a imobilização do iniciador de captura específico alvo inclui adicionalmente estender o iniciador de captura universal para produzir um iniciador de captura específico alvo.

[066]Em algumas modalidades, o iniciador de captura específico alvo é imobilizado em combinação com outros iniciadores de captura específicos alvo. Em algumas modalidades, o iniciador de captura específico alvo inclui uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo. Em algumas modalidades, a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo inclui apenas dois tipos de iniciadores de captura específicos alvo. Por exemplo, os iniciadores de captura específicos alvo incluem cada uma das duas regiões de captura universais, como regiões P5 ou P7 e uma região específica alvo. Uma região P5 inclui a sequência de nucleotídeos 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'. Uma região P7 inclui a sequência de nucleotídeos 5'-CAAGCAGAAGACGGCATA CGA-3'. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo é o complemento reverso do iniciador de captura de sequência de região P5

("anti-P5": 5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3 ') ou de sequência de região P7 ("anti-P7": 5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'). Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo pode se hibridizar com iniciadores de captura P5 Illumina® (extremidade pareada) (5'-0AATGATACGGCGACCACCGAGAUCTACAC-3') ou P7 (extremidade pareada) (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA(8-oxo-G)AT-3'). Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo pode se hibridizar com o complemento reverso do iniciador de captura P5 Illumina® (extremidade pareada) ("anti-P5 (extremidade pareada)": 5'-GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT-3') ou P7(extremidade pareada) ("anti-P7 (extremidade pareada)": 5'-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3').

[067]Em outras modalidades, a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo inclui uma população de membros diferentes. Em determinadas modalidades, a população de iniciadores de captura específicos alvo pode incluir mais de 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 de membros diferentes. Em determinadas modalidades, os iniciadores de captura específicos alvo se diferem nas sequências incluídas nas regiões de captura específicas alvo. Em determinadas modalidades, os iniciadores de captura específicos alvo alvejam polinucleotídeos alvo diferentes.

[068]Em algumas modalidades desta revelação, o iniciador de captura específico alvo imobilizado inclui uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados e o polinucleotídeo alvo inclui uma pluralidade de polinucleotídeos alvo.

[069]Em algumas modalidades, essencialmente todos os iniciadores de captura imobilizados são iniciadores de captura específicos alvo. Em outras modalidades, o iniciador de captura específico alvo é imobilizado em combinação com iniciadores de captura universais. Em determinadas modalidades, um excesso de iniciadores de captura específicos alvo é imobilizado. Em determinadas modalidades, o excesso de iniciadores de captura específicos alvo sobre iniciadores de captura uni-

versais é maior que 2: 1, 3: 1, 5: 1, 10: 1, 50: 1, 100:1, 500: 1, 1.000:1, 10.000: 1, 50:000: 1 ou 100.000: 1. Em determinadas modalidades, um excesso de iniciadores de captura universais é imobilizado. Em determinadas modalidades, o excesso de iniciadores de captura universais sobre iniciadores de captura específicos alvo é maior que 2: 1, 3: 1, 5: 1, 10: 1, 50:1, 100: 1, 500: 1, 1.000:1, 10.000: 1, 50:000: 1 ou 100.000: 1.

[070]Em determinadas modalidades voltadas para a determinação da presença, ausência ou suscetibilidade de um distúrbio ou doença genética, a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode ser referida a um ou mais genes associadas a tais distúrbios ou doenças. Tais distúrbios ou doenças incluem qualquer um daqueles exemplificados anteriormente ou bem conhecidos na técnica. Por exemplo, uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode ser referida a dois ou mais distúrbios para detectar a presença, ausência ou suscetibilidade de múltiplos distúrbios ou doenças diferentes. Dessa forma, um painel de iniciadores de captura específicos alvo pode ser utilizado para detectar múltiplas doenças diferentes. O painel pode incluir membros dentro de uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo que são específicos para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou 200 ou mais genes associados ao mesmo distúrbio ou doença ou um diferente.

[071]A título de exemplificação com referência a um painel de genes associados a câncer, uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode incluir qualquer combinação dos seguintes genes associados a câncer, incluindo todas as combinações e/ou permutações: AKT1, CTNNB1, FLT3, KRAS, PTPN11, SRC, ALK, EGFR, GNAS, MLH1, RBI, STK11, ATM, ERBB2, HNF1A, MPL, RAD50, TP53, BRAF, ERBB4, IDH1, NRAS, RET, VHL, BRCA1, FBXW7, JAK3, PIK3CA, SMAD4, CDHI, FGFR2, KIT, PTEN, SMARCB1, ABL1, CSF1R, GNA11, JAK2, NOTCH1, SMO, APC, FGFR1, GNAQ, KDR, NPM1, CDKN2, FGFR3, HRAS, MET e/ou

PDGFRA.

[072]Conseqüentemente, a revelação fornece um método para a determinação da presença de um gene associado a câncer, em que uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo inclui duas ou mais seqüências de nucleotídeos diferentes selecionadas dentre os seguintes genes: AKT1, CTNNB1, FLT3, KRAS, PTPN11, SRC, ALK, EGFR, GNAS, MLH1, RBI, STK11, ATM, ERBB2, HNF1A, MPL, RAD50, TP53, BRAF, ERBB4, IDH1, NRAS, RET, VHL, BRCA1, FBXW7, JAK3, PIK3CA, SMAD4, CDHI, FGFR2, KIT, PTEN, SMARCB1, ABL1, CSF1R, GNA11, JAK2, NOTCH1, SMO, APC, FGFR1, GNAQ, KDR, NPM1, CDKN2, FGFR3, HRAS, MET e PDGFRA. A pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode ser seqüências de nucleotídeos para cada um dos seguintes genes: AKT1, CTNNB1, FLT3, KRAS, PTPN11, SRC, ALK, EGFR, GNAS, MLH1, RB1, STK11, ATM, ERBB2, HNF1A, MPL, RAD50, TP53, BRAF, ERBB4, IDH1, NRAS, RET, VHL, BRCA1, FBXW7, JAK3, PIK3CA, SMAD4, CDHI, FGFR2, KIT, PTEN, SMARCB1, ABL1, CSF1R, GNA11, JAK2, NOTCH1, SMO, APC, FGFR1, GNAQ, KDR, NPM1, CDKN2, FGFR3, HRAS, MET e PDGFRA.

[073]Em algumas modalidades, uma pluralidade de amplicons é diretamente aplicada ou colocada em contato com uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo seguindo um procedimento de amplificação que inclui, por exemplo, colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados com um suporte sólido. Conseqüentemente, a pluralidade de amplicons pode ser aplicada a uma pluralidade de iniciadores de captura sem uma etapa de purificação interveniente significativa e pode ser uma pluralidade de amplicons parcial ou substancialmente não purificada. Nessa modalidade, a pluralidade de amplicons pode incluir, portanto, na mistura de componentes celulares, incluindo uma alta razão de componentes celulares, iniciadores, enzimas de amplificação e polinucleotídeos não amplificados ou incorretamente amplificados.

[074]Em outras modalidades, uma pluralidade de amplicons pode ser purificada, tanto parcial como completamente, antes de entrar em contato com uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo. Tais procedimentos de purificação de ácido nucleico são bem conhecidos para os versados na técnica e incluem, por exemplo, precipitação, filtração e cromatografia para remover componentes celulares como macromoléculas, sais e similares.

[075]As condições suficientes para a hibridização de uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo incluindo, por exemplo, uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados sobre um suporte sólido, podem ter um período de incubação ou anelamento que varia a partir de minutos a uma hora ou mais. Tempos de hibridização mais curtos são úteis para prosseguir de forma eficiente para qualquer etapa ou etapas subsequentes em um procedimento integrado. Em algumas modalidades, o tempo de hibridização pode ser, por exemplo, 60 minutos ou menos. O tempo de hibridização também pode ser, por exemplo, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ou 10 minutos ou menos. A hibridização também pode ser, por exemplo, mais curta do que 10 minutos incluindo 9, 8, 7, 6 ou 5 minutos, por exemplo. O tempo de hibridização pode ser adicionalmente qualquer período entre os períodos de tempo exemplificadores acima. Conseqüentemente, a revelação fornece um método em que condições suficientes para hibridização incluem tempo de incubação ou anelamento de iniciadores de captura específicos alvo para amplicons ou outros polinucleotídeos durante 10 minutos ou menos.

[076]Em algumas modalidades, uma pluralidade de amplicons pode ser de dupla fita antes de entrar em contato com uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo. Para permitir o anelamento e captura pelos iniciadores de captura específicos alvo, a pluralidade de amplicons pode ser desnaturada, por exemplo, por alta temperatura ou reagentes químicos que reduzem  $T_m$  para separar as duas cadeias de um polinucleotídeo de dupla fita. A separação de cadeia, incluindo separa-

ção de cadeia parcial, pode ser realizada, por exemplo, antes ou simultaneamente com o contato de uma pluralidade iniciadores de captura específicos alvo. Em outras modalidades, a pluralidade de amplicons pode ser de fita simples. Em tais modalidades de fita simples, uma etapa de separação de cadeia é desnecessária, porém pode ser utilmente empregada para remover estruturas secundárias dentro da cadeia simples.

[077]Após a captura de por anelamento a um iniciador de captura específico alvo imobilizado sobre um suporte sólido para produzir uma pluralidade de amplicons imobilizados, por exemplo, a pluralidade de amplicons imobilizados pode ser parcialmente de dupla fita e parcialmente de fita simples. Como ilustrado na Figura 1, painel 3, o amplicon imobilizado mais à esquerda é hibridizado a uma sonda de captura específica alvo e as regiões não complementares permanecem de fita simples. Um amplicon imobilizado que inclui uma pluralidade de amplicons imobilizados pode se tornar de dupla fita por extensão enzimática a partir do iniciador de captura específico alvo. Tal produto de extensão de dupla fita é ilustrado no amplicon imobilizado intermediário da Figura 3, painel 3. As reações de extensão são bem conhecidas na técnica e são exemplificadas adicionalmente abaixo e nos Exemplos.

[078]Em uma etapa seguinte de acordo com uma modalidade particular da presente revelação, a pluralidade de amplicons imobilizados pode ser submetida a procedimentos adicionais. Tais procedimentos adicionais incluem amplificação ou sequenciamento, por exemplo. Em determinadas modalidades, a primeira pluralidade de amplicons imobilizados é amplificada usando qualquer um dos métodos anteriormente descritos ou outros métodos bem conhecidos na técnica para gerar uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados. Quando imobilizado sobre um suporte sólido, um procedimento de amplificação particularmente útil inclui amplificação em ponte. Como ilustrado na Figura 1, painel 3, os amplicons de dupla fita ou cadeia parcialmente dupla produzidos a partir de uma reação de extensão, por exemplo,

são desnaturados e a cadeia imobilizada anelada a um iniciador de captura universal através de hibridização a um adaptador como exemplificado. A estrutura resultante é imobilizada em ambas as extremidades para criar uma ponte e o iniciador de captura universal pode ser estendido e, então, amplificado usando, por exemplo, uma região de iniciador universal contida no iniciador de captura específico alvo. Esse segundo iniciador de captura universal pode ser diferente do primeiro iniciador universal complementar à sequência de adaptador. A cadeia que não é imobilizada pode ser, por exemplo, lavada. Conseqüentemente, o método da revelação fornece um método de amplificação que inclui amplificação em ponte.

[079]Os métodos de amplificação em ponte descritos no presente documento resultam em um aglomerado uniforme ou número de colônias de amplicons dentro de uma pluralidade. A uniformidade de aglomerado é ilustrada nas Figuras 2 e 3, e descrita adicionalmente abaixo nos Exemplos. Conseqüentemente, a revelação fornece um método de amplificação de polinucleotídeos imobilizados em que a uniformidade inclui 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 ou 95 ou mais em média de 0,1.

[080]Em amplificação em ponte, por exemplo, condições adequadas são aplicadas ao produto de extensão de cadeia única imobilizado, incluindo uma pluralidade de produtos de extensão de fita simples imobilizados, de modo que o produto de extensão de fita simples se anele a um iniciador de captura universal imobilizado para formar um complexo sob a forma de uma estrutura de ponte. As condições adequadas como tampões neutralizantes e/ou hibridizantes são bem conhecidas na técnica (Consulte Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley e Sons, Baltimore, Md. (1998)). O tampão neutralizante e/ou hibridizante pode ser, então, removido.

[081]Então, aplicando-se condições adequadas para a extensão, uma rea-

ção de extensão é realizada. O oligonucleotídeo de amplificação do complexo é estendido por adição sequencial de nucleotídeos para gerar um produto de extensão complementar à molécula de polinucleotídeo de fita simples. O dúplex resultante é imobilizado em ambas as extremidades de modo que cada cadeia seja imobilizada.

[082]As condições adequadas como tampões/soluções de extensão que compreendem uma enzima com atividade de polimerase são bem conhecidas na técnica (Consulte Sambrook et al, supra; Ausubel et al. supra). Essa técnica de amplificação em ponte pode ser realizada conforme descrito, por exemplo, no documento US 7.115.400 e US 2005/0100900 AI, cujos conteúdos estão incorporados no presente documento a título de referência.

[083]Exemplos de enzimas com atividade de polimerase que podem ser usados na presente revelação são DNA polimerase (fragmento Klenow, T4 DNA polimerase), DNA polimerases termoestáveis a partir de uma variedade de bactérias termoestáveis (como Taq, VENT, Pfu, ou Tfl DNA polimerases) bem como seus derivados geneticamente modificados (TaqGold, VENTexo, ou Pfu exo). Uma combinação de RNA polimerase e transcriptase reversa também pode ser usada para gerar os produtos de extensão. Particularmente, a enzima pode, nessas e em modalidades relacionadas, ter atividade de deslocamento de cadeia, mais particularmente, a enzima pode ser ativa em um pH de cerca de 7 a cerca de 9, particularmente pH 7,9 a pH 8,8, ainda mais particularmente, as enzimas são em determinadas modalidades exemplificadoras, Bst ou Klenow.

[084]As moléculas nucleosídeo trifosfato usadas são tipicamente desoxirribonucleotídeo trifosfatos, por exemplo, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ou são ribonucleosídeo trifosfatos, por exemplo, ATP, UTP, CTP, GTP. As moléculas nucleosídeo trifosfato podem ser de ocorrência natural ou não natural.

[085]Após as etapas de hibridização e extensão, o suporte e ácidos nucleicos ligados podem ser submetidos a condições de desnaturação. Uma célula de flu-

xo pode ser usada de modo que o tampão de extensão seja geralmente removido pelo influxo do tampão desnaturante. Os tampões desnaturantes apropriados são bem conhecidos na técnica (Consulte Sambrook et al, supra; Ausubel et al. supra). A título de exemplo, sabe-se que alterações em pH e soluções de baixa resistência iônica podem desnaturar ácidos nucleicos a temperaturas substancialmente isotérmicas. Formamida e ureia formam novas ligações de hidrogênio com as bases de ácidos nucleicos que rompem as ligações de hidrogênio que resultam em pareamento de bases de Watson-Crick. Em uma modalidade particular, a concentração de formamida é 50% ou mais. Esses resultam em moléculas de ácido nucleico de fita simples. Se desejado, as cadeias podem ser separadas por tratamento com uma solução de teor de sal muito baixo (por exemplo, menos que 0,01 M de condições catiônicas) e alto pH (>12) ou usando um sal caotrópico (por exemplo, cloridrato de guanidínio). Em uma modalidade particular, uma base forte é usada. Uma base forte é um composto químico básico que é capaz de desprotonar ácidos muito fracos em uma reação ácido/base. A intensidade de uma base é indicada por seu valor pK<sub>b</sub>, compostos com um valor pK<sub>b</sub> menor que cerca de 1 são chamados de bases fortes e são bem conhecidos pelo versado na técnica. Em uma modalidade particular, a base forte é uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) usada em uma concentração a partir de 0,05 M a 0,25 M, particularmente 0,1 M.

[086]Após as etapas de hibridização, extensão e desnaturação exemplificadas acima, dois ácidos nucleicos imobilizados estarão presentes, o primeiro contendo uma sequência igual à primeira molécula de polinucleotídeo de fita simples padrão (que foi inicialmente imobilizada) e o segundo sendo um ácido nucleico complementar ao mesmo, estendendo-se a partir de um dos oligonucleotídeos de captura imobilizados. Ambas as cadeias imobilizadas são, então, capazes de iniciar séries adicionais de amplificação submetendo o suporte a ciclos adicionais de hibridização, extensão e desnaturação. Dessa forma, a amplificação prossegue a partir de uma

cadeia simples para um dúplex, um dúplex a dois dúplexes, dois dúplexes a quatro dúplexes etc. ao longo dos ciclos de anelamento, extensão e desnaturação.

[087]Pode ser útil realizar etapas de lavagem opcionais entre cada etapa do método de amplificação. Por exemplo, um tampão de extensão sem enzima polimerase com ou sem dNTP's poderia ser aplicado ao suporte sólido antes de ser removido e substituído pelo tampão de extensão total.

[088]Tais séries adicionais de amplificação podem ser usadas para produzir uma colônia ou aglomerado de ácidos nucleicos tendo múltiplas cópias imobilizadas da sequência de polinucleotídeos de fita simples e sua sequência complementar.

[089]A imobilizado inicial de um amplicon significa que o produto de extensão pode se hibridizar com iniciadores de captura universais localizados em uma distância dentro do comprimento total da molécula de polinucleotídeo padrão. Uma vez que mais cópias dos produtos de extensão imobilizados e seu complemento foram sintetizadas realizando séries adicionais de amplificação, isto é, séries adicionais de hibridização, extensão e desnaturação, então, o limite da colônia ou aglomerado de ácidos nucleicos que é gerado será capaz de ser adicionalmente estendido.

[090]Conseqüentemente, um método da presente revelação permite a geração de uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados ou colônias de polinucleotídeo a partir de uma primeira pluralidade de múltiplos amplicons de fita simples imobilizados e que a densidade dessas colônias pode ser controlada alterando as proporções de iniciadores de captura universais imobilizados sobre um suporte sólido.

[091]Em um aspecto particular, um método da revelação é usado para preparar arranjos aglomerados de colônias de ácidos nucleicos, análogos àqueles descritos no documento US 7.115.400, US 2005/0100900 AI, WO 00/18957 e WO 98/44151, por amplificação em fase sólida.

[092]Os arranjos aglomerados formados pelos métodos da revelação são

adequados ao uso em aplicações geralmente realizadas em arranjos ordenados como microarranjos. Tais aplicações a título de exemplo não limitador incluem análise de hibridização, análise de expressão de genes, análise de ligação à proteína, sequenciamento, genotipagem, análise de metilação de ácido nucleico e similares. O arranjo aglomerado pode ser sequenciado antes de ser usado para aplicações a jusante como, por exemplo, hibridização com RNA fluorescente ou estudos de ligação usando proteínas marcadas fluorescentes.

[093]Como ilustrado na Figura 1, painel 4, a revelação também abrange métodos de sequenciamento de ácidos nucleicos gerados por amplificação em fase sólida. Dessa forma, a revelação fornece um método de sequência de ácidos nucleicos que inclui amplificar uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados usando amplificação em fase sólida como descrito acima e realizando uma reação de sequência de ácidos nucleicos para determinar a sequência de toda ou uma parte de pelo menos uma cadeia de ácido nucléico amplificada produzida na reação de amplificação em fase sólida.

[094]Em determinadas modalidades, os métodos apresentados no presente documento para obter as sequências de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo diferentes podem ser realizados de uma maneira sequencial ou integrada que resulta em tempos de início ao fim curtos. Por exemplo, usando os métodos descritos no presente documento, a sequência de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser determinada em 3 horas ou menos durante 50 ciclos de sequenciamento. Os tempos de início ao fim também podem ser, por exemplo, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6 ou 2,5, horas ou menos durante 50 ciclos de sequenciamento. O método integrado inclui, por exemplo, começar com 10 ng ou menos de ácido nucleico de entrada; amplificar uma pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons; capturar a pluralidade de amplicons para produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados; amplificar a primeira pluralidade de amplicons imobilizados

para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados e sequenciar os amplicons durante pelo menos 50 ciclos de sequenciamento. Os versados na técnica irão entender que o tempo de início ao fim para obter as sequências para uma pluralidade de polinucleotídeos alvo será similarmente eficiente, porém mais longo quando mais ciclos de sequenciamento são realizados. Por exemplo, 50 ciclos de sequenciamento duram cerca de 2 horas e podem resultar em um tempo de início ao fim de cerca de 2 horas 50 minutos enquanto 150 ciclos de sequenciamento duram cerca de 4,5 horas e podem resultar em um tempo de início ao fim entre cerca de 5 a 6 horas.

[095]O sequenciamento pode ser realizado usando qualquer técnica de sequenciamento adequada. Um método particularmente útil é um em que os nucleotídeos são adicionados sucessivamente a um grupo hidroxila 3' livre, resultando em síntese de uma cadeia de polinucleotídeo na direção 5' a 3'. A natureza do nucleotídeo adicionado pode ser determinada após cada adição de nucleotídeo ou no final do processo de sequenciamento. As técnicas de sequenciamento que usam sequenciamento por ligação, em que nem toda base contígua é sequenciada e técnicas como sequenciamento de assinatura massivamente paralelo (MPSS) em que bases são removidas, em vez de adicionadas às cadeias sobre a superfície também estão dentro do escopo da revelação.

[096]Por exemplo, um método de sequenciamento útil é sequenciamento por síntese (SBS). Em SBS, a extensão de iniciador de ácido nucleico ao longo de um modelo de ácido nucleico (por exemplo, um ácido nucleico alvo ou amplicon do mesmo) é monitorada para determinar a sequência de nucleotídeos no modelo. O processo químico subjacente pode ser polimerização (por exemplo, como catalisado por uma enzima polimerase). Em uma modalidade particular de SBS baseada em polimerase, nucleotídeos fluorescentemente marcados são adicionados a um iniciador (dessa forma, estendendo o iniciador) de uma maneira dependente de modelo

de modo que a detecção da ordem e tipo de nucleotídeos adicionados ao iniciador possa ser usada para determinar a sequência do modelo.

[097]Conforme descrito adicionalmente abaixo, as células de fluxo fornecem um suporte sólido conveniente para alojar fragmentos de DNA amplificados produzidos pelos métodos da presente revelação. Um ou mais amplicons em tal formato podem ser submetidos a um SBS ou outra técnica de detecção que envolve a entrega repetida de reagentes em ciclos. Por exemplo, para iniciar um primeiro ciclo SBS, um ou mais nucleotídeos marcados, DNA polimerase, etc., podem ser escoados para dentro/através de uma célula de fluxo que aloja uma ou mais moléculas de ácido nucleico amplificadas. Os sítios onde a extensão de iniciador faz com que um nucleotídeo marcado seja incorporado podem ser detectados. Opcionalmente, os nucleotídeos podem incluir adicionalmente uma propriedade de terminação reversível que termina a extensão de iniciador adicional uma vez que um nucleotídeo foi adicionado a um iniciador. Por exemplo, um análogo de nucleotídeo tendo uma porção de terminador reversível pode ser adicionado a um iniciador de modo que a extensão subsequente não possa ocorrer até um agente de desbloqueio ser distribuído para remover a porção. Dessa forma, para modalidades que usam terminação reversível, um reagente de desbloqueio pode ser distribuído para a célula de fluxo (antes ou após ocorrer a detecção). As lavagens podem ser realizadas entre as várias etapas de entrega. O ciclo pode ser, então, repetido  $n$  vezes para estender o iniciador por  $n$  nucleotídeos, dessa forma, detectando uma sequência de comprimento  $n$ . Os procedimentos SBS exemplificadores, sistemas fluídicos e plataformas de detecção que podem ser prontamente adaptados para uso com amplicons produzidos pelos métodos da presente revelação são descritos, por exemplo, em Bentley et al, Nature 456:53-59 (2008), WO 04/018497; US 7.057.026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7.329.492; US 7.211.414; US 7.315.019; US 7.405.281 e US 2008/0108082, cada um está incorporado no presente documento a título de referência.

[098]Outros procedimentos de sequenciamento que usam reações cíclicas podem ser usados, como pirosequenciamento. O pirosequenciamento detecta a liberação de pirofosfato inorgânico (PPi) à medida que nucleotídeos particulares são incorporados em uma cadeia de ácido nucleico nascente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281(5375), 363 (1998); US 6.210.891; US 6.258.568 e US 6.274.320, cada um está incorporado no presente documento a título de referência). Em pirosequenciamento, o PPi liberado pode ser detectado ao ser imediatamente convertido em adenosina trifosfato (ATP) por ATP sulfúrilase, e o nível de ATP gerado pode ser detectado através de fótons produzidos por luciferase. Dessa forma, a reação de sequenciamento pode ser monitorada através de um sistema de detecção de luminescência. As fontes de radiação por excitação usadas para sistemas de detecção baseados em fluorescência não são necessárias para procedimentos de pirosequenciamento. Sistemas fluídicos, detectores e procedimentos úteis que podem ser adaptados para a aplicação de pirosequenciamento a amplicons produzidos de acordo com a presente revelação são descritos, por exemplo, no Pedido de Patente WIPO. No. de Série PCT/US11/57111, US 2005/0191698 A1, US 7.595.883 e US 7.244.559, cada um desses está incorporado no presente documento a título de referência.

[099]Algumas modalidades podem utilizar métodos que envolvem o monitoramento em tempo real de atividade de DNA polimerase. Por exemplo, as incorporações de nucleotídeo podem ser detectadas através de interações de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) entre uma polimerase contendo fluoróforo e nucleotídeos marcados com  $\gamma$ -fosfato ou com guias de onda modo zero (ZMWs). As técnicas e reagentes para sequenciamento baseado em FRET são descritas, por exemplo, em Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-

1181 (2008), estando as descrições das mesmas incorporadas no presente documento a título de referência.

[0100]Algumas modalidades de SBS incluem a detecção de um próton liberado mediante a incorporação de um nucleotídeo em um produto de extensão. Por exemplo, o sequenciamento baseado em detecção de prótons liberados pode usar um detector elétrico e técnicas associadas que são comercialmente disponíveis junto à Ion Torrent (Guilford, CT, a Life Technologies subsidiary) ou métodos e sistemas de sequenciamento descritos no documento US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; ou US 2010/0282617 A1, cada um desses está incorporado no presente documento a título de referência. Os métodos apresentados no presente documento para amplificar ácidos nucleicos alvo usando exclusão cinética podem ser prontamente aplicados a substratos usados para detectar prótons. Mais especificamente, os métodos apresentados no presente documento podem ser usados para produzir populações clonais de amplicons que são usadas para detectar prótons.

[0101]Outra técnica de sequenciamento útil é o sequenciamento de nanoporo (consulte, por exemplo, Deamer et al. Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer et al. Acc. Chem. Res. 35:817- 825 (2002); Li et al. Nat. Mater. 2:611-615 (2003), estando as descrições das mesmas incorporadas no presente documento a título de referência). Em algumas modalidades de nanoporo, o ácido nucleico alvo ou nucleotídeos individuais removidos de um ácido nucleico passam através de um nanoporo. À medida que o ácido nucléico ou nucleotídeo passa através do nanoporo, cada tipo de nucleotídeo pode ser identificado medindo-se flutuações na condutância elétrica do poro. (Patente US nº 7.001.792; Soni et al. Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, Nanomed. 2, 459-481 (2007); Cockroft et al. J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 (2008), estando as descrições das mesmas incorporadas no presente documento a título de referência).

[0102]Os métodos exemplificadores para expressão baseado em arranjo e

análise de genotipagem que podem ser aplicados para detecção de acordo com a presente revelação são descritos na Patente Nos. US 7.582.420; 6.890.741; 6.913.884 ou 6.355.431 ou Publicação de Patente Nos. US 2005/0053980 AI; 2009/0186349 AI ou US 2005/0181440 AI, cada uma dessas está incorporada no presente documento a título de referência.

[0103]Os produtos de reações de amplificação em fase sólida em que tanto oligonucleotídeos de amplificação direta como reversa são covalentemente imobilizados sobre a superfície sólida são chamados de estruturas em ponte como descrito acima. Para fornecer modelos mais adequados de procedimentos de interrogação de ácido nucleico como sequenciamento, por exemplo, pode ser útil remover ou deslocar substancialmente toda ou pelo menos uma porção de uma das cadeias imobilizadas na estrutura em ponte para gerar um modelo em que é pelo menos parcialmente de fita simples. A porção do modelo que é de fita simples estará, dessa forma, disponível para hibridização a um iniciador de sequenciamento. O processo de remover toda ou uma porção de uma cadeia imobilizado em uma estrutura de ácido nucleico de dupla fita pode ser chamado no presente documento de linearização, e está descrito em mais detalhes no documento WO07010251 e US20090118128, estando os conteúdos dos mesmos incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0104]As estruturas de modelo em ponte podem ser linearizadas por clivagem de uma ou ambas as cadeias com uma endonuclease de restrição ou por clivagem de uma cadeia com uma endonuclease de cruzamento. Outros métodos de clivagem podem ser usados como uma alternativa para enzimas de restrição ou enzimas de cruzamento, incluindo inter alia clivagem química (por exemplo, clivagem de uma ligação diol com periodato), clivagem de sítios abásicos por clivagem com endonuclease (por exemplo, USER, como fornecido por NEB, Ipswich, MA, USA, número de peça M5505S), ou por exposição a calor ou álcali, clivagem de ribonucleotí-

deos incorporados em produtos de amplificação, de outro modo, compreendidos de desoxirribonucleotídeos, clivagem fotoquímica ou clivagem de um ligante peptídico.

[0105]Após a etapa de clivagem, independentemente do método usado para clivagem, o produto da reação de clivagem pode ser submetido a condições desnaturantes para remover a(s) porção(ões) da(s) cadeia(s) clivada(s) que é/são ligada(s) ao suporte sólido. As condições desnaturantes adequadas, por exemplo, solução de hidróxido de sódio, solução de formamida ou calor, serão evidentes para o leitor especialista com referência a protocolos de biologia molecular padrão (Sambrook et al., supra; Ausubel et al. supra). Os resultados de desnaturação na produção de um modelo de sequenciamento que é parcial ou substancialmente de fita simples. Uma reação de sequenciamento pode ser, então, iniciada por hibridização de um iniciador de sequenciamento à porção de fita simples do modelo.

[0106]Uma variedade de suportes sólidos está disponível para uso nos métodos dessa revelação. Por exemplo, algumas modalidades, o suporte sólido compreende uma superfície conformada adequada para imobilização de iniciadores de captura em um padrão organizado. Uma “superfície conformada” se refere a uma disposição de regiões diferentes em ou sobre uma camada exposta de um suporte sólido. Por exemplo, uma ou mais regiões podem ser características em que um ou mais iniciadores de captura estão presentes. As características podem ser separadas por regiões intersticiais em que iniciadores de captura não estão presentes. Em algumas modalidades, o padrão pode ser um formato x-y de características que estão linhas e colunas. Em algumas modalidades, o padrão pode ser uma disposição repetida de características e/ou regiões intersticiais. Em algumas modalidades, o padrão pode ser uma disposição aleatória de características e/ou regiões intersticiais. Em algumas modalidades, os iniciadores de captura são distribuídos de modo aleatório sobre o suporte sólido. Em algumas modalidades, os iniciadores de captura são distribuídos sobre uma superfície conformada. A superfícies conformadas exem-

plificadoras que podem ser usadas nos métodos e composições apresentados no presente documento são descritas na Publicação de Patente No. US Ser.13/661.524 ou N° US 2012/0316086 A1, cada um estando incorporada no presente documento a título de referência.

[0107]Em algumas modalidades, o suporte sólido compreende um arranjo de poços ou depressões em uma superfície. O mesmo pode ser fabricado como é geralmente conhecido na técnica usando uma variedade de técnicas, incluindo, mas não se limitando a, fotolitografia, técnicas de estampagem, técnicas de moldagem e técnicas de microjateamento. Conforme será avaliado pelos versados na técnica, a técnica usada dependerá da composição e formato do substrato de arranjo.

[0108]A composição e geometria do suporte sólido podem variar com seu uso. Em algumas modalidades, o suporte sólido é uma estrutura plana como uma lâmina, chip, microchip e/ou arranjo. Com tal, a superfície de um substrato pode estar sob a forma de uma camada plana. Em algumas modalidades, o suporte sólido compreende uma ou mais superfícies de uma célula de fluxo. O termo “célula de fluxo” como usado no presente documento, refere-se a uma câmara que compreende uma superfície sólida através da qual um ou mais reagentes fluidos podem ser escoados. Exemplos de células de fluxo e sistemas fluídicos relacionados e plataformas de detecção que podem ser prontamente usadas nos métodos da presente revelação são descritos, por exemplo, em Bentley et al, Nature 456:53-59 (2008), WO 04/018497; US 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7.329.492; US 7.211.414; US 7.315.019; US 7.405.281 e US 2008/0108082, estando cada um incorporado no presente documento a título de referência.

[0109]Em algumas modalidades, o suporte sólido ou sua superfície é não plana, como a superfície interna ou externa de um tubo ou vaso. Em algumas modalidades, o suporte sólido compreende microesferas ou cápsulas. Por “microesferas” ou “cápsulas” ou “partículas” ou equivalentes gramáticos no presente documento

entende-se pequenas partículas distintas. As composições de cápsula adequadas incluem, mas não se limitam a, plásticos, cerâmicas, vidro, poliestireno, metil estireno, polímeros acrílicos, materiais paramagnéticos, tória sol, grafita de carbono, dióxido de titânio, látex ou dextranos reticulados como Sefarose, celulose, náilon, micelas reticuladas e teflon, bem como quaisquer outros materiais descritos no presente documento para suportes sólidos podem ser usados. "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers Ind. é um guia útil. Em determinadas modalidades, as microesferas são microesferas ou cápsulas magnéticas.

[0110]As cápsulas não precisam ser esféricas; partículas irregulares podem ser usadas. Alternativa ou adicionalmente, as cápsulas podem ser porosas. Os tamanhos de cápsulas variam a partir de nanômetros, isto é, 100 nm, a milímetros, isto é, 1 mm, com cápsulas a partir de cerca de 0,2 micron a cerca de 200 microns sendo preferidas, e a partir de cerca de 0,5 a cerca de 5 microns sendo particularmente preferidas, embora em algumas modalidades cápsulas menores ou maiores possam ser usadas.

[0111]A revelação também fornece em certas modalidades, uma célula de fluxo tendo uma ou mais pluralidades de iniciadores de captura imobilizados na mesma. Uma pluralidade pode ser um iniciador de captura específico alvo. O iniciador de captura específico alvo pode incluir uma região de iniciador universal. Outra pluralidade pode ser um iniciador de captura universal. Uma ou ambas as pluralidades exemplificadoras acima de iniciadores de captura podem ser imobilizadas na célula de fluxo.

[0112]Consequentemente, a revelação também se refere a células de fluxo para a preparação de uma pluralidade de aglomerados de amplicon em que as células de fluxo contêm um revestimento de uma ou mais pluralidades de iniciadores de captura imobilizados. Dessa forma, um suporte sólido conforme descrito no presente documento pode ocorrer dentro ou como uma parte de uma célula de fluxo e os mé-

todos apresentados no presente documento podem ser realizados em uma célula de fluxo. A uma ou mais pluralidades de iniciadores de captura podem ser revestidas sobre toda a superfície de célula de fluxo em vez de em locais distintos que compreendem sequências diferentes em cada pequeno local. A célula de fluxo pode ter um tamanho de 1 cm<sup>2</sup> ou maior de modo que 1 cm<sup>2</sup> total ou maior inclui um revestimento de múltiplas cópias de iniciadores de captura para cada uma ou mais pluralidades de iniciadores de captura. Uma célula de fluxo pode ser distinguida, por exemplo, de um arranjo maculado ou arranjo fotolitograficamente sintetizado devido ao fato que os oligonucleotídeos são ligados a cada e toda superfície; superior, inferior, paredes e extremidades da câmara de célula de fluxo, em vez de ser um arranjo sobre uma única superfície plana. Entretanto, se desejado, uma célula de fluxo que é usada em um método apresentado no presente documento pode ter superfícies com reatividade diferente para oligonucleotídeos de modo que os oligonucleotídeos sejam apenas ligados a um ou um subconjunto das superfícies supracitadas ou ainda a apenas um subconjunto de regiões dentro dessas superfícies.

[0113]A célula de fluxo pode, em certas modalidades, ser revestida com três pluralidades de espécies de iniciadores de captura de composição de sequência diferente, isto é, duas espécies de iniciador de captura e um iniciador de captura específico alvo como ilustrado na Figura 1, painel 3. Ademais, o iniciador de captura específico alvo pode incluir uma região de iniciador universal tendo a mesma sequência que uma das duas pluralidades de iniciadores de captura como ilustrado na Figura 1, painel 3. A célula de fluxo pode, em certas modalidades, ser revestida com não mais que as três pluralidades de espécies de iniciador de captura. Entretanto, em outras modalidades particulares, a célula de fluxo pode incluir adicionalmente uma ou mais outras pluralidades de espécies de iniciador de captura seja um iniciador de captura universal, iniciador de captura específico alvo ou outra espécie de iniciador de captura. O iniciador de captura específico alvo pode estar presente em

uma concentração mais baixa que o iniciador de captura universal, por exemplo, pelo menos uma concentração relativa 100, 1000 ou 100.000 vezes mais baixa. As duas pluralidades de iniciadores de captura universais podem estar presentes em razões similares uma à outra, por exemplo, variando em menos que um fator de dois. Com as indicações e orientações fornecidas no presente documento, os versados na técnica saberão qual configuração de iniciadores de captura universais e iniciadores de captura específicos alvo será imobilizada sobre uma célula de fluxo para obter um resultado desejado.

[0114]A revelação também fornece um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos. O método inclui: (a) colocar uma amostra de ácido nucleico que inclui uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com iniciadores diretos e reversos gene-específicos sob condições suficientes para hibridização, sendo que cada espécie do iniciador direto gene-específico inclui um índice de sequência exclusivo e um adaptador; (b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons; (c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados sobre um suporte sólido com a pluralidade de amplicons sob condições suficientes para hibridização de modo a produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados, sendo que o suporte sólido inclui adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais; (d) estender a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados complementares aos polinucleotídeos alvo; (e) anelar a pluralidade de iniciadores de captura universais à pluralidade dos produtos de extensão imobilizados; (f) amplificar por PCR a pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a segunda pluralidade de amplicons imobilizados compreende uma uniformidade de 85% ou mais; (g) sequenciar a se-

gunda pluralidade de amplicons imobilizados, e (h) eliminar erros de sequência aleatórios para um ou mais polinucleotídeos alvo comparando-se três ou mais sequências de nucleotídeos em uma posição variante para uma espécie de polinucleotídeo alvo, em que as espécies de polinucleotídeo alvo são identificadas pelo índice de sequência exclusivo para, desse modo, determinar uma variante de sequência de nucleotídeos real no um ou mais polinucleotídeos alvo.

[0115]Os métodos descritos anteriormente também podem ser empregados para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos. Em amplificação e sequenciamento de ácido nucleico é importante distinguir erros de sequenciamento resultantes de infidelidade de polimerase nesses procedimentos, por exemplo, da sequência autêntica. Essa distinção é especialmente importante para identificar sequências variantes que são de ocorrência natural em uma amostra. A distinção de variantes de sequência verdadeiras sobre erros de sequência de nucleotídeos aleatórios pode ser realizada associando-se um código de barras ou índice de sequência exclusivo a cada espécie de polinucleotídeo dentro de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo.

[0116]A Figura 5 ilustra a associação de um índice exclusivo para cada espécie de polinucleotídeo alvo. A Figura 5 mostra uma pluralidade de polinucleotídeos alvo (identificada na mesma como “Modelo”). Para propósitos de ilustração, a pluralidade consiste em três membros em que um membro é uma variante de nucleotídeo verdadeira (estrela clara). Um código de barras exclusivo é adicionado a cada membro e a pluralidade é amplificada para resultar em três pluralidades de amplicons, cada uma derivada do membro original com código de barras exclusivo. A origem das três pluralidades pode ser identificada por sequenciamento e identificação do código de barras. Uma comparação dos membros dentro de cada pluralidade mostra a variante que corre em cada ou na maioria dos membros. Em contrapartida, uma pluralidade de amplicons contém um membro tendo uma diferença de sequência

(estrela escura) em comparação com os membros restantes da pluralidade de amplicons. Devido ao fato de a maioria dos membros dentro dessa pluralidade não conter alteração de nucleotídeo sua incorporação ocorreu por erro aleatório.

[0117]O desenho acima também é aplicável para identificar variantes verdadeiras dentro de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo diferentes. Como revelado no presente documento, uma espécie de polinucleotídeo alvo se refere a membros de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo tendo a mesma sequência. Nessa modalidade, cada espécie de polinucleotídeo alvo é identificada com o mesmo índice exclusivo que distingue aquela espécie de polinucleotídeo alvo de outra espécie de polinucleotídeo alvo (e vice-versa). Dessa forma, os polinucleotídeos alvo tendo a mesma sequência (isto é, membros de espécie) têm o mesmo índice. Após a amplificação e sequenciamento, membros de espécies podem ser identificadas por terem o mesmo índice e a ocorrência de uma variante verdadeira em comparação com erro aleatório pode ser determinada com base na comparação de sequência com outros membros dentro da pluralidade de membros de espécies.

[0118]Dessa forma, os métodos descritos anteriormente podem incluir adicionalmente uma sequência de índice dentro de um iniciador gene-específico usado para amplificar um polinucleotídeo alvo. Cada iniciador gene-específico irá conter, portanto, um índice exclusivo que identifica seu polinucleotídeo alvo correspondente. Consequentemente, uma pluralidade de iniciadores gene-específicos que corresponde a uma pluralidade de polinucleotídeos alvo diferentes pode ser empregada para amplificar a pluralidade de polinucleotídeos alvo diferentes e resultar em incorporação do índice de identificação exclusivo dentro de cada espécie de amplicon resultante dentro da pluralidade de amplicons produzidos dessa forma.

[0119]O índice pode ser uma sequência de nucleotídeos exclusiva que é distinguível de outros índices. A mesmo também pode ser distinguível de outras sequências de nucleotídeos dentro da pluralidade de polinucleotídeos por sequência

ou localização dentro do polinucleotídeo alvo. Um índice de nucleotídeo pode ser uma sequência de nucleotídeos aleatória ou uma especificamente desenhada. Um índice de qualquer comprimento de sequência desejado desde que tenha comprimento suficiente para ser uma sequência de nucleotídeos exclusiva dentro de uma pluralidade de índices em uma população e/ou dentro de uma pluralidade de polinucleotídeos que estão sendo analisados ou interrogados. Em algumas modalidades, um índice é um polinucleotídeo ou região dentro de um polinucleotídeo que varia a partir de cerca de 8 a 30 nucleotídeos. Um índice pode ser, por exemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos ou mais longo. Por exemplo, um índice pode ser 35, 40, 45 ou 50 nucleotídeos ou mais longo.

[0120]A Figura 7 ilustra um desenho de iniciador gene-específico para incorporar um índice em um polinucleotídeo alvo. Nessa modalidade, o índice corresponde à região cinza sólida sobre o iniciador direto gene-específico (GSF). A amplificação com um par de iniciadores que corresponde aos iniciadores diretos gene-específicos, contendo o índice, e iniciadores reversos gene-específicos como ilustrado na mesma incorpora o índice no amplicon. A Figura 7 ilustra adicionalmente a incorporação de índice de amplificação continuada por amplificação assimétrica e amplificação em ponte subsequente e sequenciamento usando um iniciador de sequenciamento específico a um sítio de ligação de iniciador também introduzido pelo GSF.

[0121]A Figura 8 ilustra outro desenho de iniciador gene-específico exemplificador para incorporar um índice em um polinucleotídeo alvo. Nessa modalidade, o índice é incorporado em uma segunda etapa de amplificação. Por exemplo, a amplificação inicial é realizada com um par de iniciadores direto (GSF) e reverso (GSR) gene-específicos. Um ou ambos os iniciadores podem conter uma região de sequência universal como um sítio de ligação de iniciador para séries de amplificação

subsequentes. Nessa modalidade, o índice também corresponde à região cinza sólida e, embora o mesmo possa ser incluído em cada um dos iniciadores de série subsequentes, o mesmo é ilustrado para estar no iniciador que se liga ao sítio de ligação de iniciador incorporado pelo GSF (iniciador de sequenciamento SBS3). A amplificação com um par de iniciadores correspondente ao iniciador contendo o índice e um iniciador reverso como ilustrado na mesma incorpora o índice no amplicon. A Figura 8 ilustra adicionalmente a incorporação de índice de acompanhamento de amplificação continuada por amplificação assimétrica e amplificação em ponte subsequente e sequenciamento usando um iniciador de sequenciamento específico a um sítio de ligação de iniciador também introduzido pelo iniciador usado na série de amplificação subsequente. Esse iniciador também pode conter um segundo sítio de ligação de iniciador de modo que fique a montante do índice para sequenciamento em conjunto com o polinucleotídeo alvo.

[0122]Com as indicações e orientações fornecidas no presente documento, os versados na técnica saberão que os métodos apresentados no presente documento também podem ser realizados com índices exclusivos incorporados em um iniciador de captura específico alvo para aumentar a sensibilidade para detecção de variantes de sequência de ácidos nucleicos.

[0123]Consequentemente, os métodos da revelação fornecem um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, em que a pluralidade de polinucleotídeos alvo inclui 10 ng ou menos de ácido nucléico de entrada. O método pode ter condições suficientes para hibridização de modo a incluir incubação durante 10 minutos ou menos. O método inclui adicionalmente detectar uma taxa de incompatibilidade de 0,3% ou menos para uma posição de nucleotídeo variante.

[0124]Também é fornecido um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, em que a etapa de

contato de uma amostra de ácido nucleico tendo uma pluralidade de polinucleotídeos alvo inclui uma primeira série de amplificação por PCR com um primeiro iniciador direto e um iniciador reverso gene-específico e uma segunda série de amplificação por PCR com um segundo iniciador direto complementar a uma porção do primeiro iniciador direto gene-específico, sendo que o segundo iniciador direto inclui o índice de sequência exclusivo e o adaptador. O adaptador pode ser complementar a uma pluralidade de iniciadores de captura universais. Os iniciadores de captura universais podem ser imobilizados em um suporte sólido.

[0125]É adicionalmente fornecido um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, em que a amplificação da pluralidade de polinucleotídeos alvo inclui PCR assimétrica. A amplificação da pluralidade de polinucleotídeos alvo também pode incluir amplificação multiplex. A amplificação multiplex inclui uma multiplexidade de 180 ou mais.

[0126]Ainda é adicionalmente fornecido um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, em que o suporte sólido inclui adicionalmente uma segunda pluralidade de iniciadores de captura universais. Ademais, a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo pode incluir, ainda, uma região de iniciador de captura universal. A região de iniciador de captura universal pode ter uma sequência de nucleotídeos correspondente ou complementar à segunda pluralidade de iniciadores de captura universais.

[0127]Também é fornecido um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, em que a pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo inclui 200 ou mais sequências de nucleotídeos diferentes. O método inclui detecção de variante de sequência dentro de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo que inclui 200 ou mais sequências de nucleotídeos diferentes. A pluralidade de polinucleotídeos alvo pode ser uma pluralidade de ácidos nucleicos genômicos.

[0128]É adicionalmente fornecido um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, a amplificação de produtos de extensão imobilizados inclui amplificação em ponte. O método inclui um suporte sólido em que o suporte sólido pode ser uma célula de fluxo.

[0129]É adicionalmente fornecido um método para aumentar a sensibilidade para detecção de uma variante de sequência de ácidos nucleicos, em que o sequenciamento de uma pluralidade de amplicons produzidos a partir de uma pluralidade de polinucleotídeos alvo amplificados inclui 50 ciclos de sequenciamento. O método inclui um tempo de início ao fim de 3 horas ou menos.

[0130]É entendido que modificações que não afetam substancialmente a atividade das várias modalidades dessa revelação também são incluídas dentro da definição da revelação fornecida no presente documento. Conseqüentemente, os seguintes exemplos destinam-se a ilustrar, porém não limitar a presente revelação.

#### EXEMPLO I

#### PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS

[0131]Esse Exemplo descreve um procedimento integrado para a preparação de amplicon e sequenciamento de polinucleotídeo alvo.

[0132]Brevemente, o DNA genômico de amostra foi adicionado a uma mistura de reação PCR em um volume total de 100 µl contendo 50 µl de tampão PCR multiplex KAPA 2X 2G (Kapa Biosystems, Wilmington, MA), 0,5 µM de mistura de iniciador direto (F), 0,02 µM de mistura de iniciador reverso (R), 20 unidades de tampão KAPA 2G Hot Start Enzyme (buffer (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) e água. A amplificação foi realizada usando o seguinte programa de PCR: incubação a 95°C por 1 minuto (min.) seguido de 30 ciclos das seguintes incubações: (1) 97°C por 5 segundos (seg.); (2) 58°C por 45 segundos; (3) 72°C por 1 minuto e (4) mantido a 4°C. Os produtos de PCR foram subseqüentemente sequenciados após a imobiliza-

ção e aglomeração a uma célula de fluxo conforme descrito abaixo.

[0133]A extensão de sonda de captura, aglomeração alvejada dos produtos de PCR acima e sequenciamento foram realizados usando um sequenciador de bancada MiSeq (Illumina, San Diego, CA).

[0134]Para esse procedimento, um cartucho de kit MiSeq (Illumina, San Diego, CA) foi descongelado em água aproximadamente 30 minutos antes do MiSeq automatizado ser executado e o bloco de calor foi ligado a 95°C. Adicionalmente, um tubo HFE (600 µl (Illumina, San Diego, CA)) foi descongelado em gelo e uma solução de 0,1N de NaOH 1 ml foi preparada. O produto de PCR (100 µl) foi diluído com tampão de 400ul HT1 (Illumina, San Diego, CA) em um tubo eppendorf. Similarmen- te, os modelos de sonda de captura foram preparados em 600 µl de tampão HT1 em um tubo separado. Água deionizada foi adicionada aos poços de bloco de calor e os dois tubos acima foram inseridos em poços com agitação lenta (aproximadamente 100 rpm) durante 5 minutos. Após a incubação de bloco de calor durante 5 minutos, os tubos foram colocados no gelo durante pelo menos 2 minutos. O cartucho MiSeq descongelado foi invertido várias vezes para dispersar e reassentar os reagentes no fundo. Os reagentes foram carregados no cartucho MiSeq da seguinte forma: O produto de PCR foi transferido para o tubo #17 no cartucho; as sondas de captura foram transferidas para o tubo #18, HFE foi carregado no tubo #19 e 0,1N de NaOH foi adicionado ao tubo #20. O cartucho MiSeq, MiSeq FC (Illumina, San Diego, CA) e a garrafa PR2 (Illumina, San Diego, CA) para MiSeq foram ajustados no sequenciador MiSeq e o processo de execução de sequenciamento foi iniciado de acordo com a recomendação do fabricante. A folha de amostra preparada foi carregada (Javelin v.51 chemistry) e a extensão, aglomeração alvejada e execução de sequenciamento foram iniciadas após a etapa de verificação de fluxo de acordo com as recomendações do fabricante.

[0135]A extensão de sonda de captura, aglomeração alvejada dos produtos

de PCR acima e sequenciamento foram realizados usando um analisador Genome Analyzer (Illumina, San Diego, CA).

[0136]Para esse procedimento, o modelo de aglomeração e sequenciamento foi preparado misturando-se o tampão HT1 com o produto de PCR em uma tira de 8 tubos (1 a 10  $\mu$ l de produto de PCR com 19 a 10  $\mu$ l de tampão HT1, respectivamente). As sondas de captura (3 a 500 pM) foram preparadas em outra tira de 8 tubos. Uma placa descongelada cBOT Paired End Cluster Plate v3 (Illumina, San Diego, CA) foi colocada em um sistema de aglomeração automatizado cBOT e o procedimento para extensão de sonda de captura e amplificação foi iniciado usando o comando de execução (Run <Capture\_Probe\_Extension\_Amp\_LBH\_v#> recipe). Um conjunto de reagentes de sequenciamento padrão Genome Analyzer (GA) (Illumina, San Diego, CA) foi descongelado (IMX, LFN, CLM, SMX) e um conteúdo de tubo total do LFN foi adicionado ao tubo IMX, seguido de adição de HDP36 no mesmo tubo IMX. Os conteúdos foram bem misturados. Todos os reagentes e tampões, incluindo PR1, PR2, PR3 (Illumina, San Diego, CA), foram colocados em GA em suas posições designadas seguido de preparação de todas as linhas com reagentes usando o comando GA <Prime\_v#>recipe. A célula de fluxo e prisma foram limpos com um pano com etanol e lenço de papel, respectivamente e o prisma reinserido na máquina. O absorvedor de feixe foi reduzido. A célula de fluxo foi adequadamente posicionada sobre o prisma e o cano de tubo de distribuição foi lentamente reduzido. O fluxo apropriado de reagente na célula de fluxo foi confirmado bombeando-se manualmente 100  $\mu$ l de solução 5 (PR2) em uma taxa de aspiração de 60  $\mu$ l/min e uma taxa de dispensa de 2000  $\mu$ l/min. Óleo de imersão (135  $\mu$ l) foi aplicado entre o prisma e a célula de fluxo. A porta de instrumento foi fechada e a execução de sequenciamento foi iniciada com o comando GA Run <GA2\_40cycle\_10rows\_SR\_v8.3>recipe.

## EXEMPLO II

## QUALIDADE DE SEQUÊNCIA RESULTANTE DA PREPARAÇÃO INTEGRADA E PROCEDIMENTO DE SEQUENCIAMENTO

[0137]Esse Exemplo descreve uma comparação entre a uniformidade de sequência e a profundidade de sequência usando várias concentrações e tipos de ácido nucléico de entrada.

[0138]Os procedimentos descritos no Exemplo I foram empregados para preparar amplicons a partir de populações de polinucleotídeos alvo e determinar sua sequência por sequenciamento multiplex. São mostrados na Figura 2 os resultados que usam 1 ng e 10 ng de DNA genômico de entrada.

[0139]A uniformidade foi calculada com base nos aglomerados de cada amplicon a partir de MiSeqReporter. O número de amplicons com aglomerados maiores que 0,1 de média, 0,2 de média, 0,3 de média, 0,5 de média foi contado. Por exemplo, em 0,2 de média, mais de 80% de amplicons tinham número maior que 0,2 de média de aglomerados.

[0140]Para profundidade de sequenciamento, o número de amplicons com mais de 10/100/250/500 aglomerados foi contado. Por exemplo, mais de 80% dos amplicons tinham uma cobertura de pelo menos 500x. A uniformidade e cobertura são métricas típicas usadas para medir a qualidade de sequenciamento. Os resultados mostrados na Figura 2 demonstrou que uma alta qualidade de sequenciamento pode ser obtida usando 1 ng e 10 ng de DNA genômico.

[0141]São mostrados na Figura 3 os resultados usando quatro quantidades diferentes de DNA obtido a partir de tecido fixado em formalina, embebido em parafina. As quatro concentrações diferentes variaram a partir de 1 ng a 50 ng conforme mostrado na figura.

[0142]Os resultados de uniformidade e profundidade de sequenciamento mostrados na Figura 3 demonstraram adicionalmente que uma alta qualidade de sequenciamento pode ser obtida para uma ampla gama de DNAs obtidos a partir de

Tecidos fixados em formalina, embebidos em parafina. A densidade de PF de aglomerado (Filtro Passador), que indica o número de aglomerados tendo uma qualidade especificada, é muito satisfatória. A especificidade é uma medição de quantas leituras são precisas. Mais de 90% de especificidade foram obtidos nesse estudo.

[0143]Estudos adicionais foram realizados usando DNA isento de células (cfDNA) extraído de plasma de pessoas normais bem como de paciente com câncer e obtiveram resultados similares. São mostrados na Figura 4 os resultados usando 10 ng de cfDNA isolados de 1 ml de plasma.

[0144]Conforme com as Figuras 2 e 3, a uniformidade foi similarmente calculada com base nos aglomerados de cada amplicon a partir de MiSeqReporter. O número de amplicons com aglomerados maiores que 0,1 de média, 0,2 de média, 0,3 de média, 0,5 de média foi contado. Em 0,2 de média, mais de 80% de amplicons tinham um número maior que 0,2 de média de aglomerados.

[0145]Similarmente, para profundidade de sequenciamento, o número de amplicons com mais de 10/100/250/500 aglomerados foi contado. Todos os amplicons tinham uma cobertura de pelo menos 500x. Adicionalmente, a densidade de aglomerado de PF e outros parâmetros mostrados na tabela também se adaptam muito bem. Os resultados mostram que uma especificidade de 93% foi obtida, indicando que 93% dos aglomerados se alinham com os alvos corretos. Esses resultados demonstram adicionalmente que uma alta qualidade de sequenciamento pode ser obtida diretamente a partir de DNA isento de células isolado de plasma.

### EXEMPLO III

#### SENSIBILIDADE PARA DETECÇÃO RESULTANTE DO PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO INTEGRADA E SEQUENCIAMENTO

[0146]Esse Exemplo mostra a precisão de detecção de mutações únicas dentro de uma população de polinucleotídeos alvo.

[0147]Uma biblioteca foi preparada e sequenciada seguindo os métodos

descritos no presente documento usando 1,65ng de DNA obtido a partir de Horizon Diagnostics em um formato 201 multiplex (201 plex). As mutações mencionadas na tabela a seguir foram identificadas com a frequência indicada mencionada. Esse DNA foi verificado por ter certa frequência de mutações por Horizon Diagnostics usando PCR digital. 1,65Ng é aproximadamente 500 cópias de genoma haploide. Em 1% de taxa, aproximadamente 5 cópias de mutante estão presentes. Portanto, esse método é sensível o suficiente para detectar 5 cópias de um mutante em uma população de diversas sequências.

#### DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE MÚLTIPLOS MUTANTES\*

Nome de Gene	Mutação	Tipo de Mutante	Frequência verificada por PCR digital	Frequência por Javelin**
BRAF	V600E	A->T	10,5%	10%, 11%
PI3KCA	E545K	G->A	9%	9%,9%
KRAS	G12D	C->T	6%	6%,8%
EGFR	L858R	T->G	3%	3%,4%
EGFR	T790M	C->T	1%	1%,1%

\*DNA genômico de referência com mutações é obtido a partir de Horizon Diagnostics.

\*\*Resultados de dois experimentos independentes.

#### EXEMPLO IV

#### ÍNDICES MOLECULARES EXCLUSIVOS PARA DETERMINAR VARIANTES DE SEQUÊNCIA VERDADEIRAS A PARTIR DE ERROS

[0148]Esse Exemplo descreve o uso de índices de nucleotídeo exclusivos para distinguir erros de sequenciamento a partir de variantes autênticas em uma sequência de polinucleotídeos alvo.

[0149]Códigos de barras Moleculares Exclusivos (UMB) ou índices de nucleotídeos aleatórios (10 a 15N) foram inseridos entre a região de iniciador de sequenciamento e a região de sequência de gene-específica no inserido direto PCR. UMBs

foram introduzidos no DNA modelo realizando-se 2 a 4 ciclos de PCR com iniciadores PCR com UMBs inseridos. Após 2 a 4 ciclos, iniciadores UMB residuais foram removidos usando tratamento com exonuclease 1 e limpeza de cápsulas SPRI. 30 a 35 ciclos adicionais de PCR foram realizados usando iniciadores compostos de sequência de adaptadores universal. A análise de dados foi realizada comparando-se a sequência de leituras com UMBs idênticos. Uma chamada de base é determinada pela sequência de mais de 70% dos UMBs. Apenas UMBs com mais de 2 cópias foram consideradas na análise de dados. Como mostrado abaixo, sem considerar as informações de UMB em análise de dados, o ruído apresentado por PCR e erro de sequenciamento podem ser tão altos quanto 0,24%. Se as informações de UMB forem consideradas na análise de dados, todo o ruído pode ser removido. E a frequência observada do mutante real está muito mais próxima à frequência esperada de 0,05%>.

#### USO DE UMB PARA DISTINGUIR SINAL DE RUÍDO

	Sem correção de UMB (frequência)	Após correção de UMB (frequência)
A*	99,718%	99,978%
C	0,024%	0,000%
T	0,001%	0,000%
G*	0,254%	0,032%
N	0,002%	0,000%
D	0,001%	0,000%

\*DNA modelo obtido por adição padrão em tipo selvagem (A) com DNA genômico de mutante PIK3CA H1045KR (G). 0,05% de frequência de variante ~10 moléculas (G) foi esperado.

[0150]Nesse sentido, a Figura 6 mostra uma comparação entre taxas de incompatibilidade de nucleotídeo com (direita) e sem (esquerda) o uso de correção de código de barras molecular exclusiva. Brevemente, a taxa de incompatibilidade de 20 posições em torno do sítio de mutação esperado foi mostrada com e sem consi-

deração de informações de UMB em análise de dados. Como mostrado na Figura 6, sem UMB os resultados incluíram ruído não específico significativo. O ruído pode ser tão alto quanto 0,15%. Após considerar as informações de UMB em análise de dados, todo o ruído foi removido.

[0151]Ao longo deste pedido, várias publicações foram citadas entre parênteses. As revelações dessas publicações em sua totalidade, incluindo quaisquer publicações GenBank e número GI, são incorporadas no presente documento a título de referência para descrever de forma mais completa o estado da técnica ao qual essa revelação pertence.

[0152]Embora a revelação tenha sido descrita com referência às modalidades reveladas, os versados na técnica compreenderão prontamente que os exemplos específicos e estudos detalhados acima são apenas ilustrativos da revelação. Deve-se compreender que várias modificações podem ser feitas sem que se afaste do espírito da revelação. Consequentemente, a revelação é limitada apenas pelas reivindicações em anexo.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparação de amplicon, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) colocar em contato uma amostra de ácido nucléico que compreende uma pluralidade de polinucleotídeos alvo com pelo menos um iniciador sob condições suficientes para hibridização, o dito pelo menos um iniciador contendo um adaptador;

(b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a dita pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons;

(c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo immobilizados sobre um suporte sólido com a dita pluralidade de amplicons sob condições suficientes para hibridização para produzir uma primeira pluralidade de amplicons immobilizados, sendo que o dito suporte sólido compreende adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais, em que o dito adaptador é complementar à referida pluralidade de iniciadores de captura universais;

(d) estender a dita pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão immobilizados complementares aos ditos polinucleotídeos alvo;

(e) anelar a dita pluralidade de iniciadores de captura universais à dita pluralidade de produtos de extensão immobilizados, e

(f) amplificar por PCR a dita pluralidade de produtos de extensão immobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons immobilizados, em que a dita população de amplicons immobilizados compreende uma uniformidade de 85% ou mais.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pluralidade de polinucleotídeos alvo compreende 10 ng ou menos de áci-

do nucléico de entrada.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas condições suficientes para hibridização compreendem incubação durante 10 minutos ou menos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita etapa de colocar diretamente em contato (c) compreende uma primeira pluralidade de amplicons substancialmente não purificados.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita amplificação da dita pluralidade de polinucleotídeos alvo compreende PCR assimétrica.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito pelo menos um iniciador compreende dois iniciadores e pelo menos um dos ditos dois iniciadores contém o dito adaptador.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita amplificação da dita pluralidade de polinucleotídeos alvo compreende amplificação multiplex.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita amplificação multiplex compreende uma multiplexidade de 180 ou mais.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito suporte sólido compreende adicionalmente uma segunda pluralidade de iniciadores de captura universais.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo compreende adicionalmente uma região de iniciador de captura universal.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita região de iniciador de captura universal tem uma sequência de nucleotídeos correspondente à dita segunda pluralidade de iniciadores de captura univer-

sais.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo compreende 200 ou mais sequências de nucleotídeos diferentes.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pluralidade de polinucleotídeos alvo compreende 200 ou mais sequências de nucleotídeos diferentes.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pluralidade de polinucleotídeos alvo compreende uma pluralidade de ácidos nucleicos genômicos.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita amplificação dos ditos produtos de extensão imobilizados compreende amplificação em ponte.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito suporte sólido compreende uma célula de fluxo.

17. Método para determinação da presença de um gene associado a câncer, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) colocar uma amostra de ácido nucléico que compreende uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com pelo menos um iniciador sob condições suficientes para hibridização, sendo que o dito pelo menos um iniciador contém um adaptador;

(b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a dita pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons;

(c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo específicos a um ou mais cânceres diferentes imobilizados sobre um suporte sólido com a dita pluralidade de amplicons sob condições suficientes para hibridização de modo a produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobili-

zados, sendo que o dito suporte sólido compreende adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais, em que o dito adaptador é complementar à dita pluralidade de iniciadores de captura universais;

(d) estender a dita pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados complementares aos ditos polinucleotídeos alvo;

(e) anelar a dita pluralidade de iniciadores de captura universais à dita pluralidade de produtos de extensão imobilizados;

(f) amplificar por PCR a dita pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a dita população de amplicons imobilizados compreende uma uniformidade de 85% ou mais, e

(g) sequenciar a dita segunda pluralidade de produtos de extensão imobilizados para determinar a presença ou ausência de um gene associado a câncer.

18. Método para determinação de uma variante de sequência de ácidos nucleicos verdadeira, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) colocar uma amostra de ácido nucléico que compreende uma pluralidade de polinucleotídeos alvo em contato com iniciadores diretos e reversos gene-específicos sob condições suficientes para hibridização, sendo que cada espécie do dito iniciador direto gene-específico compreende um índice de sequência exclusivo e um adaptador;

(b) amplificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a dita pluralidade de polinucleotídeos alvo para produzir uma pluralidade de amplicons;

(c) colocar diretamente em contato uma pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo imobilizados sobre um suporte sólido com a dita pluralidade de amplicons sob condições suficientes para hibridização para produzir uma primeira pluralidade de amplicons imobilizados, sendo que o dito suporte sólido compreende

adicionalmente uma pluralidade de iniciadores de captura universais, em que o dito adaptador é complementar à referida pluralidade de iniciadores de captura universais;

(d) estender a dita pluralidade de iniciadores de captura específicos alvo para produzir uma pluralidade de produtos de extensão imobilizados complementares aos ditos polinucleotídeos alvo;

(e) anelar a dita pluralidade de iniciadores de captura universais à dita pluralidade de produtos de extensão imobilizados;

(f) amplificar por PCR a dita pluralidade de produtos de extensão imobilizados para produzir uma segunda pluralidade de amplicons imobilizados, em que a dita segunda pluralidade de amplicons imobilizados compreende uma uniformidade de 85% ou mais;

(g) sequenciar a dita segunda pluralidade de amplicons imobilizados, e

(h) eliminar erros de sequência aleatórios de um ou mais polinucleotídeos alvo comparando-se três ou mais sequências de nucleotídeos em uma posição de variante para uma espécie de polinucleotídeo alvo, em que as ditas espécies de polinucleotídeo alvo são identificadas pelo dito índice de sequência exclusivo para, desse modo, determinar uma variante de sequência de nucleotídeos verdadeira no dito um ou mais polinucleotídeo alvo.

Figura 1

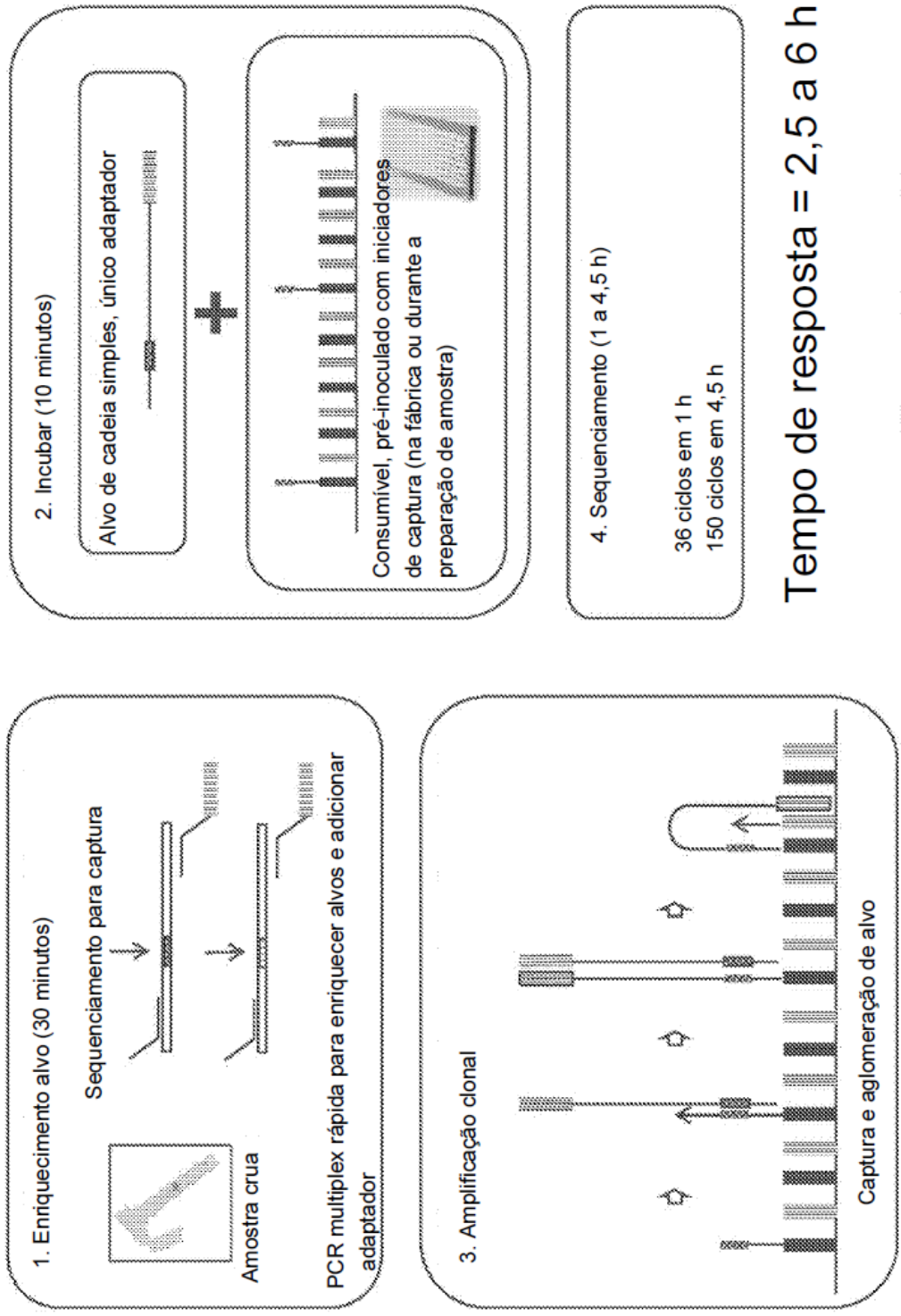


Figura 2

## Execução de 100 ciclos em Miseq para 305 plex

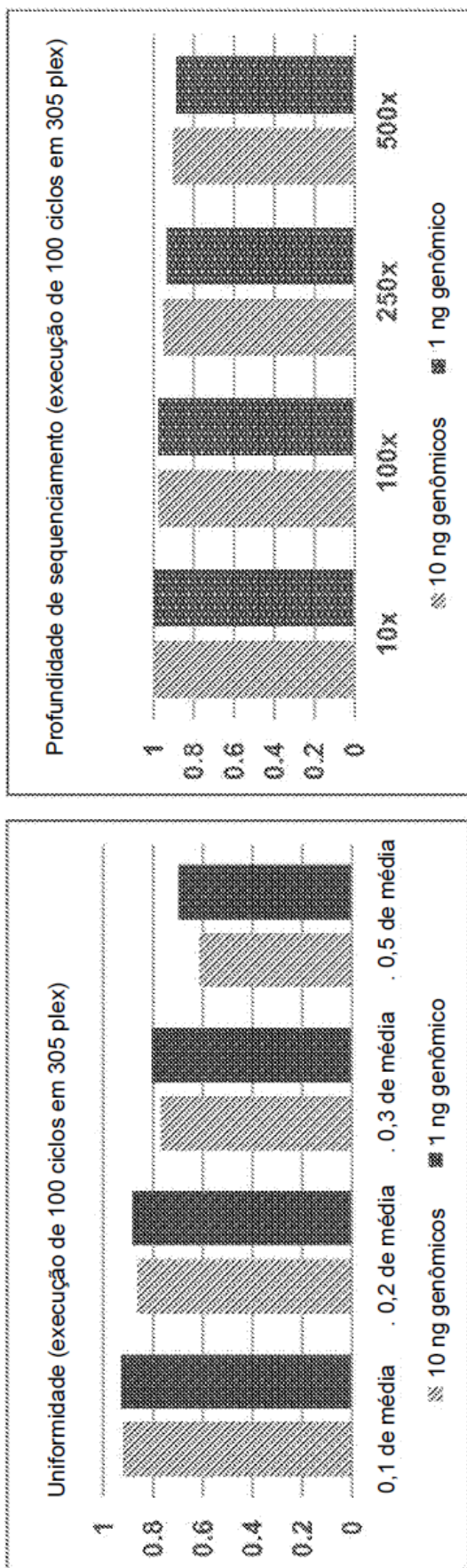
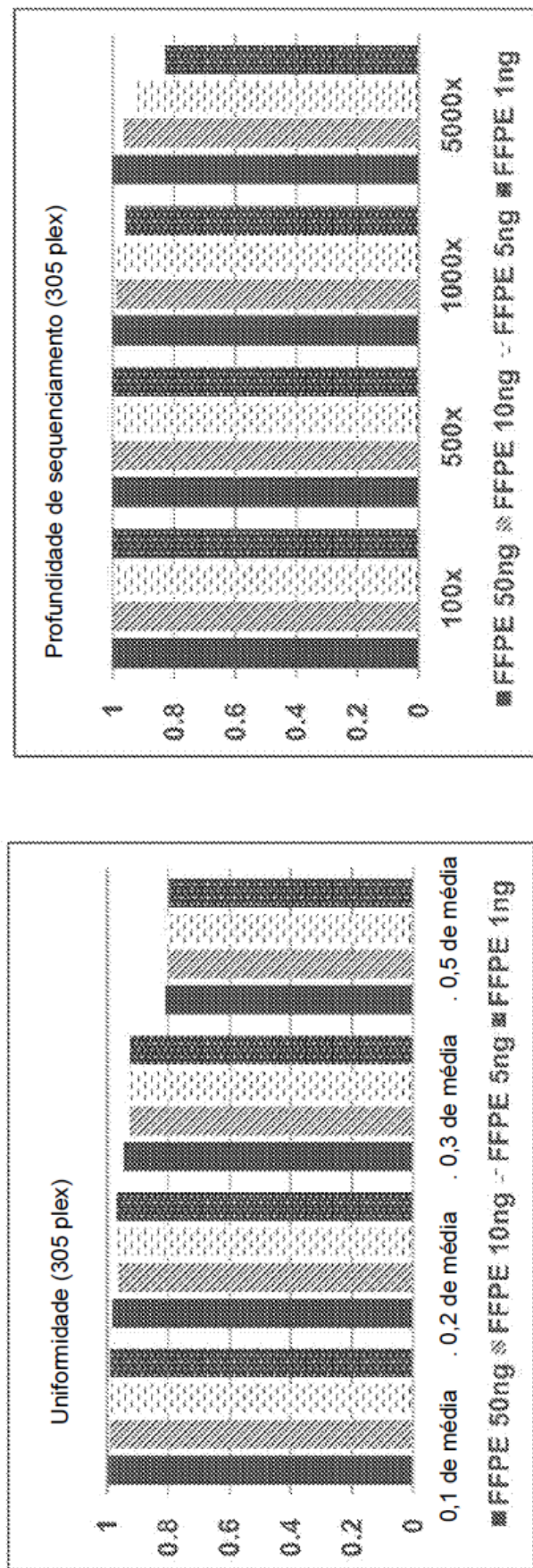


Figura 3

## Desempenho de 305 plex em humanos sobre DNA\* FFPE



\*Representação de dois ou mais experimentos.

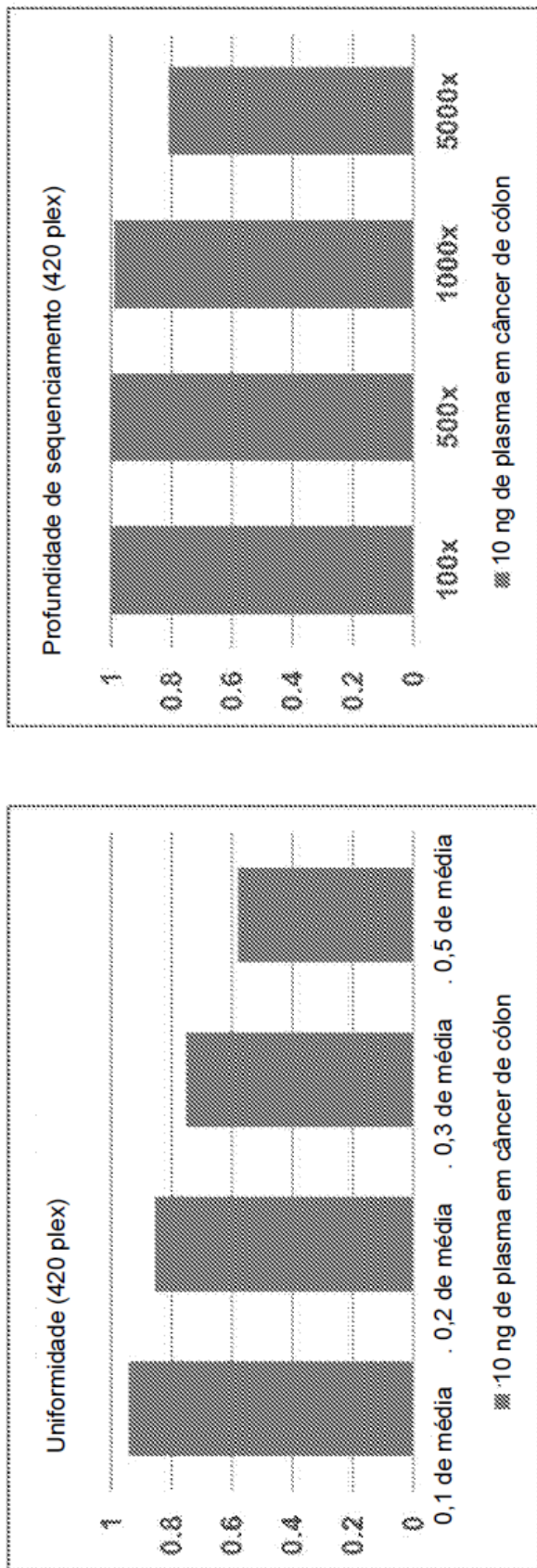
\*Aglomerado PF varia a partir de 300 a 800k/mm<sup>2</sup>

\*Especificidade é maior que 90%

\*Com base em execução de 50 ciclos

Figura 4

Desempenho de 420 plex em humanos sobre DNA isento de células de câncer de cólon



	Leituras totais	PF%	Especificidade (%)
10 ng de cfDNA em câncer de cólon	10.9M	94.5	93%

Figura 5

### Uso de UMB para distinguir uma variante verdadeira de ruído

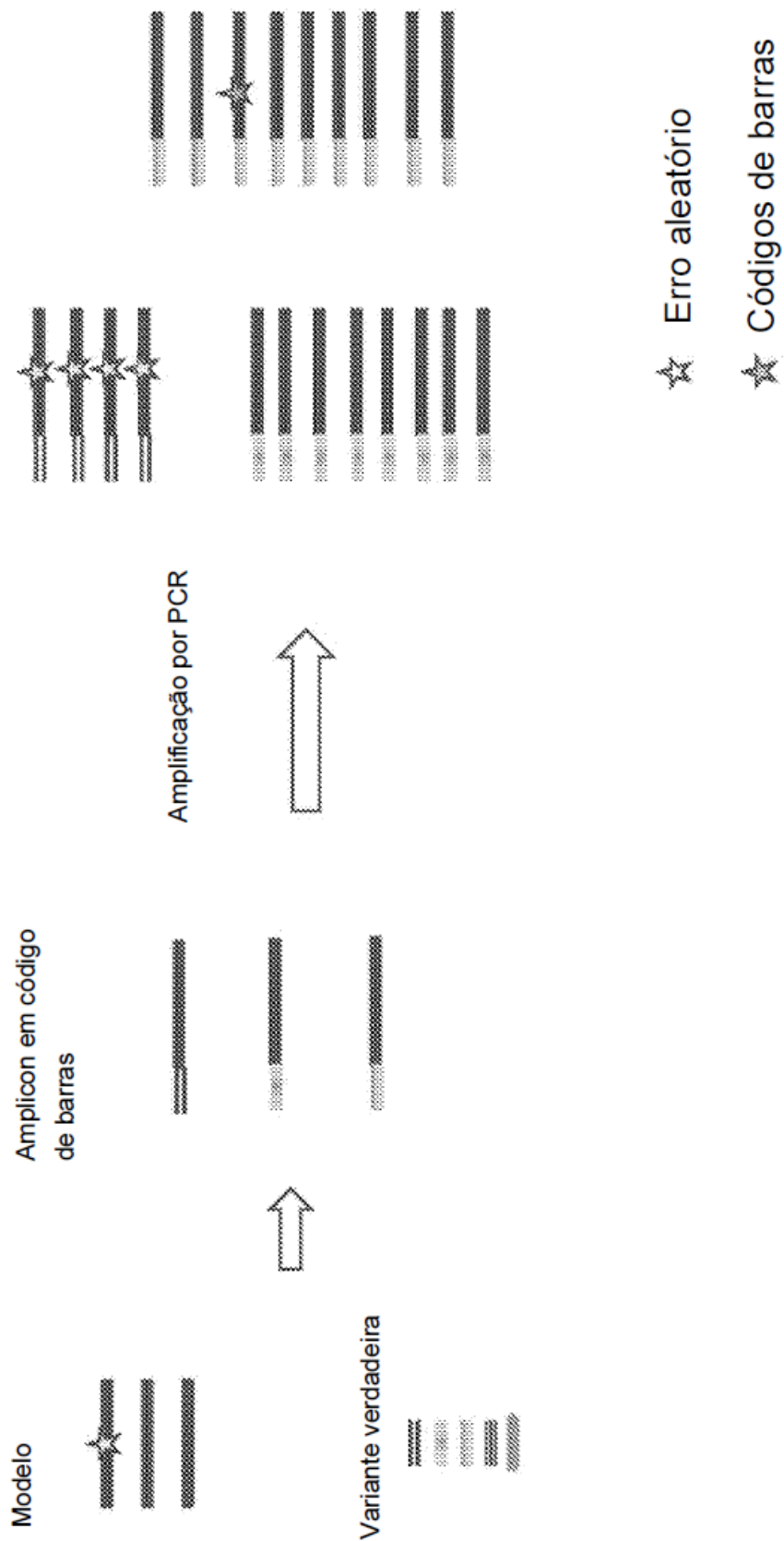
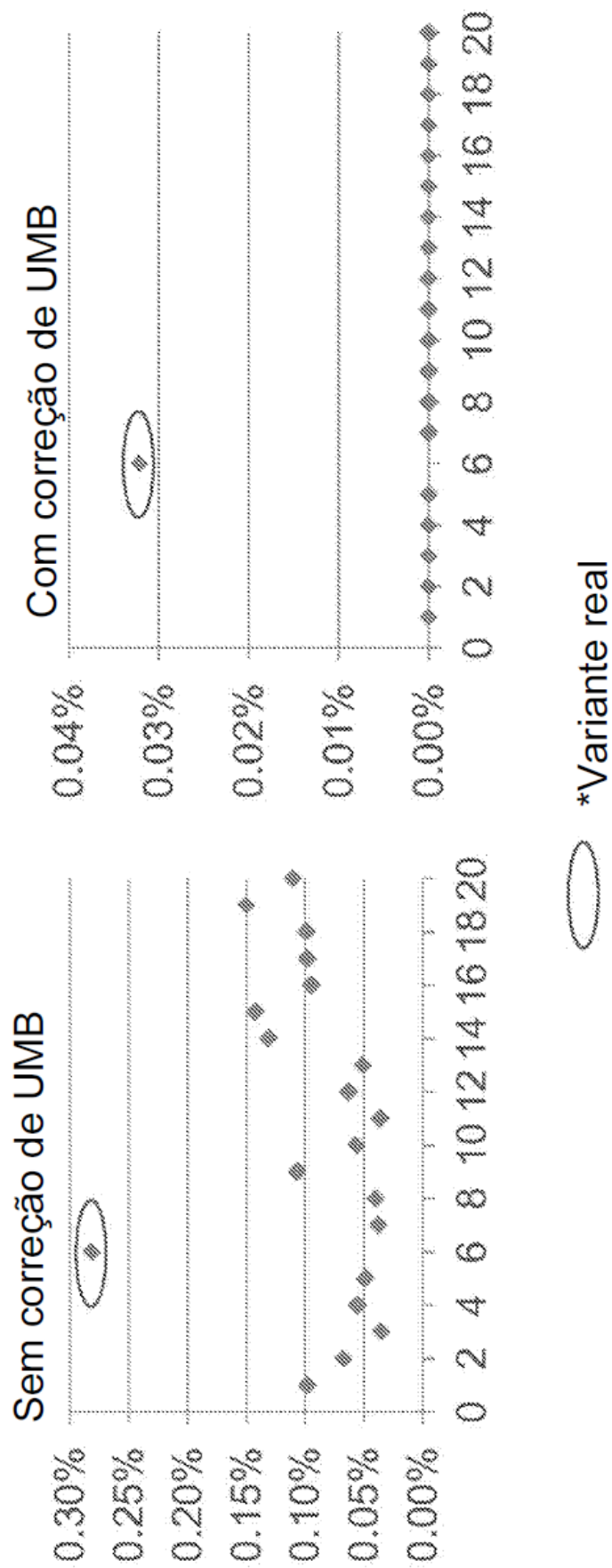


Figura 6

UMB pode reduzir significativamente o nível de ruído e aprimorar a quantificação



\*DNA modelo obtido por adição padrão em tipo selvagem (A) com DNA genômico mutante PIK3CA H1047R (G). 0,05% (~10 moléculas) de frequência de mutante (G) foi esperado.

Figura 7

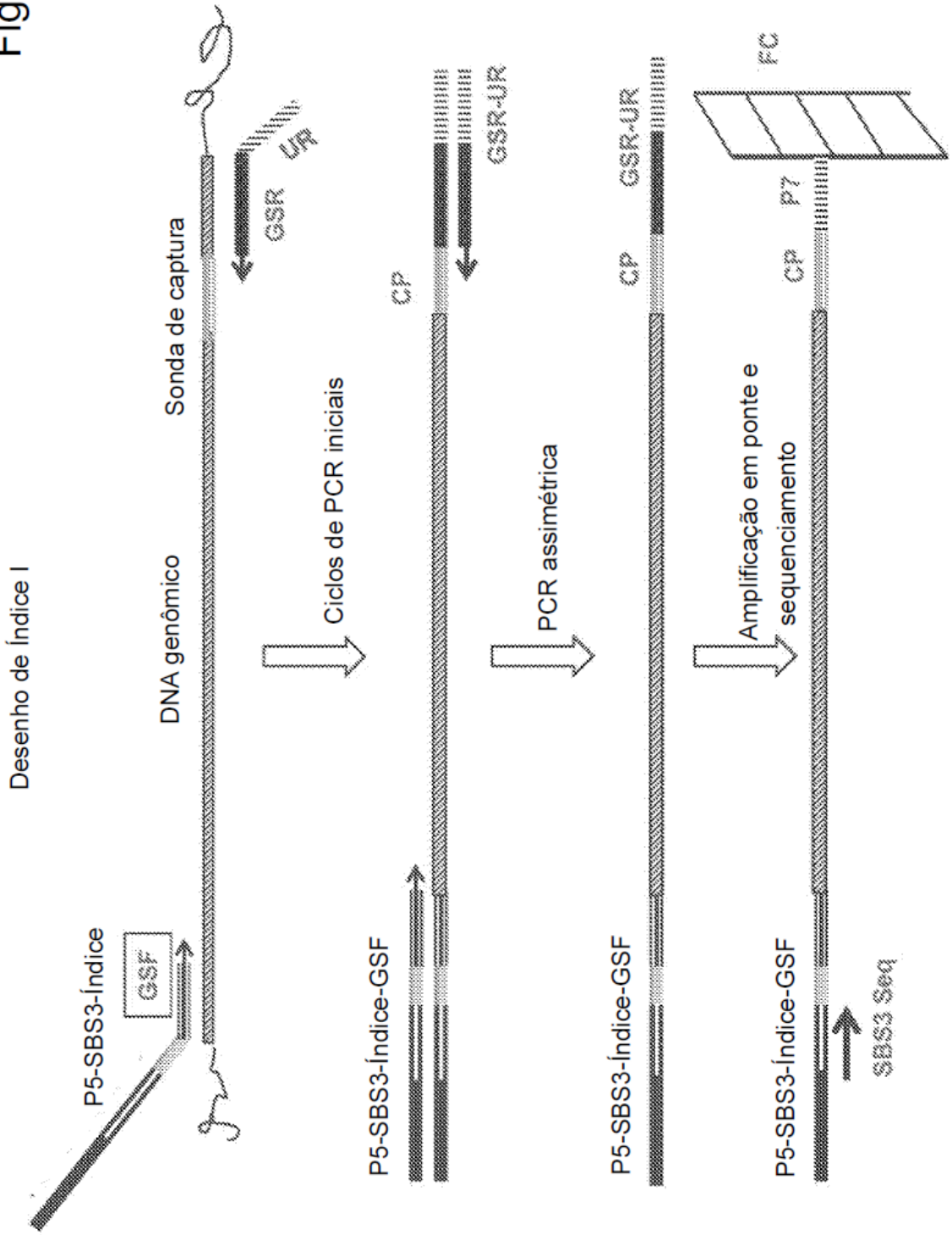


Figura 8

Desenho de Índice II

