

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
08 de octubre de 2020 (08.10.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/201603 A2

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/686 (2018.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2020/070220

(22) Fecha de presentación internacional:
02 de abril de 2020 (02.04.2020)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201930300 02 de abril de 2019 (02.04.2019) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES];
HOSPITAL REAL, AVDA. DEL HOSPICIO S/N, 18071
Granada (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD**
[ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **CARAZO GALLEGU, Ángel**; FIBAO, c/
Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada (ES). **RE-
DRUELLO ROMERO, Anais**; Universidad de Granada,
18071 Granada (ES). **SALMERÓN ESCOBAR, Javier**;
FIBAO, c/ Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada
(ES). **LÓPEZ-VIOTA GALLARDO, Julián**; c/ Despe-
ñaperros, 21, 18008 Granada (ES). **LEÓN LÓPEZ, Jose-
fa**; FIBAO, c/ Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Grana-

da (ES). **MORALES SANTANA, Sonia**; FIBAO, c/ Doc-
tor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada (ES). **LÓPEZ
PÉREZ, David**; Universidad de Granada, 18071 Granada
(ES).

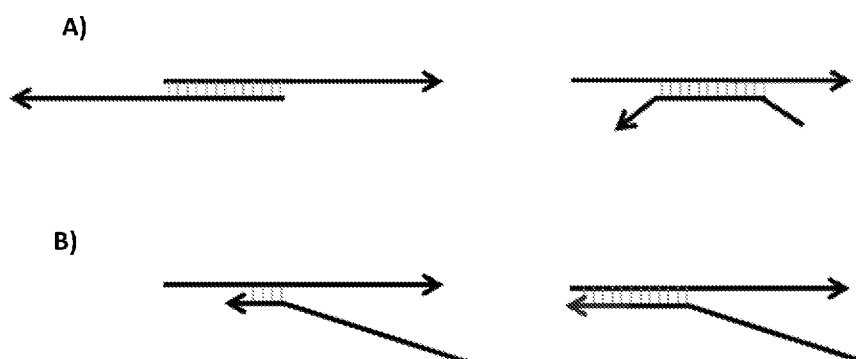
(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG,
AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM,
ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL,
ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

(54) Title: IMPROVED MULTIPLEX PCR

(54) Título: PCR MULTIPLEX MEJORADA

Fig. 1



(57) Abstract: A method is described which allows the formation of primer polymers to be avoided, makes it possible to increase the number of different primers used in the multiplex PCR and even increase their concentration, and significantly reduces amplification biases, making it possible to increase the number of PCR cycles and make amplifications of much smaller amounts of DNA possible.

(57) Resumen: Se describe un procedimiento que permite eliminar la formación de polímeros de cebadores, permite incrementar el número de cebadores diferentes utilizados en la PCR multiplex, e incluso, incrementar la concentración de los mismos y disminuye considerablemente los sesgos de amplificación, permitiendo incrementar el número de ciclos de PCR y se pueden realizar amplificaciones sobre cantidades de DNA mucho más reducidas.

[Continúa en la página siguiente]

SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

PCR MULTIPLEX MEJORADA

La presente invención está dirigida a un método de PCR multiplex mejorado que permite eliminar la formación de polímeros de cebadores, permite incrementar el número de
5 cebadores diferentes utilizados en la PCR multiplex, e incluso, incrementar la concentración de los mismos y disminuye considerablemente los sesgos de amplificación, permitiendo incrementar el número de ciclos de PCR y se pueden realizar amplificaciones sobre cantidades de DNA mucho más reducidas.

ESTADO DEL ARTE

10 En la actualidad, debido al desarrollo de la secuenciación paralela masiva, la PCR multiplex es ampliamente utilizada durante las fases iniciales de la fabricación de librerías. Mediante PCR multiplex se amplifica simultáneamente un número elevado (puede llegar a varias centenas) de moléculas de DNA para su secuenciación en diferentes plataformas de secuenciación masiva.

15 El principal inconveniente de la PCR multiplex deriva precisamente de la utilización simultánea de numerosos cebadores a concentraciones elevadas (concentraciones adecuadas para su funcionamiento en la reacción de PCR). Los cebadores hibridan entre ellos y polimerizan creando moléculas de DNA *parásitas* y no deseadas que
20 compiten (por los recursos de la PCR) con las moléculas de DNA que se desea amplificar. El riesgo de que polimericen los cebadores, así como la intensidad del fenómeno, es tanto más elevado cuanto mayor es el número de cebadores diferentes utilizados.

25 En resumen, la competencia con los polímeros de cebadores:

- Puede impedir la amplificación de la totalidad o de algunas de las moléculas de DNA deseadas.
- Puede introducir sesgos de amplificación (a veces muy grandes) que modifican la eficiencia con la que se amplifican las diferentes moléculas de DNA deseadas.

30 Las moléculas de DNA “parásitas” pueden incrementar su tamaño en cada ciclo de PCR.

Una hibridación productiva genera una molécula parásita (dímero de cebador) con un extremo 3' inédito que en el siguiente ciclo (en una nueva hibridación productiva) incrementa el tamaño de la molécula parásita y produce un extremo 3' diferente.

La gran variedad de secuencias diferentes en los cebadores de una PCR multiplex favorece el fenómeno de polimerización. Además, conforme avanza la PCR, se incrementa la concentración de amplicones (moléculas de DNA deseadas). Cebadores y amplicones ofrecen una amplia variedad de secuencias diferentes (a elevada
5 concentración) que incrementan la probabilidad de realizar nuevas hibridaciones productivas.

A su vez, la variedad de secuencias plantilla incrementa la variedad de extremos 3' generados mediante hibridaciones productivas. A lo que hay que añadir las adeninas adicionales incorporadas al extremo 3' por algunas DNA polimerasas (como la Taq
10 polimerasa). Estas adeninas se añaden en una probabilidad variable.

Tras 20 o 30 ciclos de amplificación se pueden producir moléculas parásitas de DNA de varios miles de pares de bases.

La polimerización de cebadores en PCR multiplex tiene un fuerte componente estocástico. Es debido, principalmente, a dos razones:

- 15 1. La aparición de determinados eventos de baja probabilidad (estos eventos son las hibridaciones productivas iniciales) modifica la probabilidad de los eventos siguientes (grados de libertad) dependiendo de las secuencias en los nuevos extremos 3' producidos.
2. Debido a la naturaleza de crecimiento logarítmico de la PCR, la repercusión de
20 un evento depende del ciclo en el que aparezca. Cuanto antes aparezca el evento, más ciclos de crecimiento logarítmico tendrá para incrementar su efecto.

Soluciones técnicas a la polimerización de cebadores.

Se han diseñado varios métodos para minimizar el impacto de la polimerización de cebadores. Todos ellos se basan en intervenir sobre el extremo 3' de las moléculas de
25 cebadores:

- Mediante un cuidadoso diseño de las secuencias de los cebadores.
- Especialmente, mediante modificaciones químicas del extremo 3' de las moléculas de cebadores que disminuyen la probabilidad de un evento de hibridación productiva entre cebadores.

30 Se ha conseguido minimizar considerablemente el impacto de la polimerización de cebadores y, en consecuencia, incrementar el número de cebadores diferentes que

pueden incluirse en la PCR multiplex. Sin embargo, las soluciones técnicas no son infalibles. La reducción de la probabilidad de un evento de hibridación productiva entre cebadores no impide que este se produzca. Y, cuando este evento aparece, se produce una molécula parásita de DNA con un nuevo extremo 3' sin modificaciones químicas.

- 5 Nuevamente, existe un fuerte componente estocástico. Cuanto antes aparezca el evento de hibridación productiva inicial, más repercusión tendrá.

Como se ha indicado, los métodos actuales han conseguido incrementar el número de cebadores empleados en la PCR multiplex, pero para minimizar el riesgo de polimerización (aleatoria) de cebadores se recomiendan cantidades elevadas de DNA inicial y un número reducido de ciclos (habitualmente no más de 15 ciclos). Estas recomendaciones disminuyen la eficiencia de la PCR multiplex.

Sería, por tanto, deseable impedir completamente que las moléculas resultantes de una hibridación productiva tengan nuevos ciclos de elongación.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención describe el uso de al menos un nucleótido EGC (*Expanded Genetic Code*) en un procedimiento PCR para evitar la generación de moléculas de DNA *parásita* no deseadas.

La intervención propuesta sobre el extremo 5' de las secuencias de cebadores puede ser utilizada de forma aislada o en asociación con las soluciones a la polimerización de cebadores que se basan en intervenciones sobre el extremo 3' de los cebadores.

En un segundo aspecto, la invención describe un método para realizar PCR multiplex que no genere moléculas de DNA *parásita* no deseadas que comprende incorporar a la reacción al menos un nucleótido EGC (*Expanded Genetic Code*).

25 En combinación con las técnicas que disminuyen la probabilidad de hibridación efectiva de cebadores, la presente invención permite incrementar considerablemente la eficiencia de la PCR multiplex:

- Elimina completamente la formación de polímeros de cebadores (más allá de una dimerización inicial de baja probabilidad).
- Reduce considerablemente el componente estocástico de la PCR multiplex.

- Permite incrementar el número de cebadores diferentes utilizados en la PCR multiplex, e incluso, incrementar la concentración de los mismos.
- Disminuye considerablemente los sesgos de amplificación.
- Permite focalizar los recursos de la PCR en la amplificación de las moléculas de DNA deseadas. En consecuencia, se puede incrementar el número de ciclos de PCR y se pueden realizar amplificaciones sobre cantidades de DNA mucho más reducidas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Esquema que ilustra la hibridación entre cebadores durante una PCR. Las flechas representan los oligonucleótidos. Las pequeñas líneas horizontales indican hibridaciones entre nucleótidos homólogos de hebras diferentes. La punta de las flechas representa el extremo 3' de las moléculas de oligonucleótidos. A) Representa dos ejemplos de hibridación no productiva. B) Representa dos ejemplos de hibridación productiva.

Fig. 2. Imagen que muestra una electroforesis en gel de agarosa del resultado de tres réplicas de PCR multiplex, realizadas a partir de 50 cebadores diferentes durante 30 ciclos. Se destaca el componente aleatorio del resultado (Aparición aleatoria de artefactos PCR). Además, el rendimiento ofrecido es escaso, sólo asumible con una gran cantidad de ADN inicial.

Fig. 3. Ilustración de una PCR multiplex ejemplo de la invención, donde se incorporan los nucleótidos EGC. A) representa un ejemplo de hibridación productiva entre cebadores que incorporan nucleótidos EGC en su extremo 5'. B) representa la nueva molécula generada que no tendrá posibilidad de generar más hibridaciones productivas.

Fig. 4. PCR multiplex sin modificaciones en los cebadores comparada con una PCR multiplex que utiliza los mismos cebadores modificados en el extremo 5' con dos nucleótidos EGC.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Definiciones

El término PCR multiplex (*Multiplex Polymerase Chain Reaction* en inglés) se refiere al uso de la PCR para la amplificación simultánea y específica de varias moléculas de DNA. La principal diferencia entre la PCR clásica y la PCR multiplex es que la primera utiliza dos oligonucleótidos diferentes, mientras que la segunda utiliza más de dos. Los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR se denominan cebadores (*primers* en inglés).

La PCR multiplex se describió por primera vez en 1988 para detectar deleciones en el gen codificante de la distrofina. Desde entonces, la PCR multiplex ha tenido otras aplicaciones, como el análisis de microsatélites y el genotipado de variantes SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism* en inglés).

Conceptos básicos de la reacción catalizada por las DNA polimerasas:

- La DNA polimerasa cataliza el *crecimiento* de hebras de DNA incorporando (polimerizando) nucleótidos sobre una hebra de DNA complementaria y en orientación antiparalela. Los nucleótidos (en forma trifosfato) se incorporan liberando una molécula de pirofosfato.
- El crecimiento de una molécula de DNA se realiza en dirección $5' \rightarrow 3'$.
- La DNA polimerasa requiere de un extremo $3'$ previamente hibridado. Durante la reacción de PCR, este extremo es otorgado inicialmente por los cebadores.

Los cebadores pueden hibridar entre ellos y, si la hibridación implica algunos de los extremos $3'$, este puede ser elongado mediante la DNA polimerasa, creando de esta forma una molécula *parásita* no deseada. Esta molécula es denominada **dímero de cebador** (*primer dimer* en inglés).

El término "hibridación productiva" alude al tipo de hibridación entre cebadores que permite la elongación de un extremo $3'$ y la generación de una molécula de DNA *parásita* no deseada.

La hibridación del extremo $3'$ de un oligonucleótido sobre otra molécula de oligonucleótido implica habitualmente muy pocas bases, por lo que está muy desfavorecida a las temperaturas utilizadas en PCR. Sin embargo, la elevada

concentración a la que se encuentran los cebadores compensa la baja probabilidad de elongación.

Los autores de la presente invención han actuado sobre el diseño del extremo 5' de los cebadores, impidiendo completamente que las moléculas resultantes de una hibridación productiva tengan nuevos ciclos de elongación.

Así, en su aspecto más general, la presente invención describe el uso de al menos un nucleótido EGC (*Expanded Genetic Code*) en un procedimiento PCR para evitar la generación de moléculas de DNA *parásita* no deseadas.

En particular, propone incorporar uno o más nucleótidos EGC (*Expanded Genetic Code*) en el extremo 5' de la secuencia de los cebadores. El número óptimo de nucleótidos EGC añadidos en 5' es de 2, aunque pueden incorporarse sólo uno o más de 2.

De forma preferente, se incorporan dos nucleótidos EGC (*Expanded Genetic Code*).

De forma preferente, el procedimiento PCR en el que se usa al menos un nucleótido EGC, es PCR multiplex.

El código genético natural está formado por 4 bases: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) que hibridan en dos parejas (A-T y C-G). Los nucleótidos EGC suponen una extensión del código genético natural. Son parejas sintéticas de nucleótidos que hibridan entre ellos pero no con los nucleótidos naturales. Los nucleótidos EGC se incorporan en la estructura del DNA y son reconocidos e incorporados por la DNA polimerasa.

El esquema de la Fig. 3 ilustra un ejemplo de la invención. Los cebadores incorporan en su extremo 5' dos nucleótidos EGC (en el ejemplo iso-C, 5-Methyl-Isocytosine). La PCR es realizada con los 4 monómeros naturales de nucleótidos (nucleótidos trifosfato ATP, TTP, CTP y GTP) más un quinto monómero EGC en su forma trifosfato y complementario de los EGC del extremo 5' de los cebadores (en el ejemplo iso-dGTP, 2-Hydroxy-2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate).

El fundamento de la invención se basa en que, tras una hibridación productiva entre dos cebadores, se genera una molécula de DNA con un nuevo extremo 3' formado por nucleótidos EGC. En consecuencia:

- La molécula generada no podrá hibridar su extremo 3' de forma productiva y no tendrá capacidad de polimerización.

- La molécula generada no competirá por los recursos de la PCR (no será una molécula de DNA parásita).

También es objeto de esta invención un método para realizar PCR, preferentemente PCR multiplex, que no genere moléculas de DNA *parásita* no deseadas y que
5 comprende incorporar a la reacción al menos un nucleótido EGC tal y como se ha descrito previamente.

En una realización particular, se incorporan a la reacción uno o más nucleótidos EGC (*Expanded Genetic Code*) en el extremo 5' de la secuencia de los cebadores.

El número óptimo de nucleótidos EGC añadidos en 5' es de 2, aunque pueden
10 incorporarse sólo uno o más de 2, por lo que de forma preferente, se incorporan dos nucleótidos EGC a la reacción.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

La **Fig. 4** muestra un ejemplo de utilización de la innovación. PCR multiplex sin
15 modificaciones en los cebadores comparada con una PCR multiplex que utiliza los mismos cebadores modificados en el extremo 5' con dos nucleótidos EGC. El ejemplo muestra la amplificación del receptor de antígeno TCR (*T Cell Receptor*) para cuya amplificación es necesario añadir cebadores para cada uno de los segmentos V.

20 Como se observa, la invención permite focalizar los recursos de la PCR sobre la amplificación de la molécula de DNA deseada.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de al menos un nucleótido EGC (*Expanded Genetic Code*) en un procedimiento PCR para evitar la generación de moléculas de DNA *parásita* no deseadas.

5 2.- El uso según la reivindicación anterior donde el al menos un nucleótido EGC (*Expanded Genetic Code*) se incorpora en el extremo 5' de la secuencia de los cebadores.

3.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde se incorporan dos nucleótidos EGC (*Expanded Genetic Code*).

10 4.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la PCR es una PCR multiplex.

5.- Un método para realizar PCR multiplex que no genere moléculas de DNA *parásita* no deseadas que comprende incorporar a la reacción al menos un nucleótido EGC (*Expanded Genetic Code*) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

Fig. 1

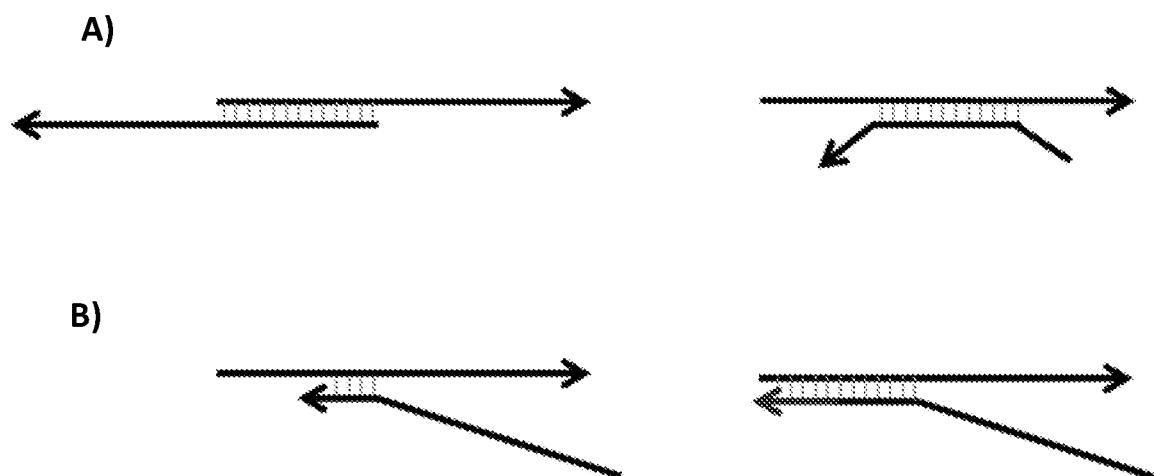


Fig. 2

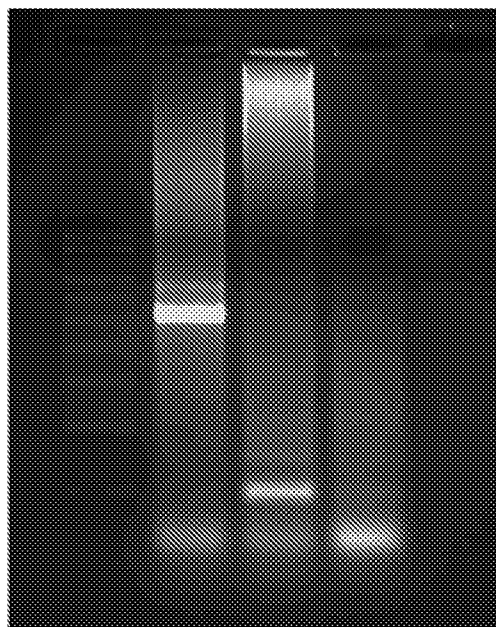


Fig. 3

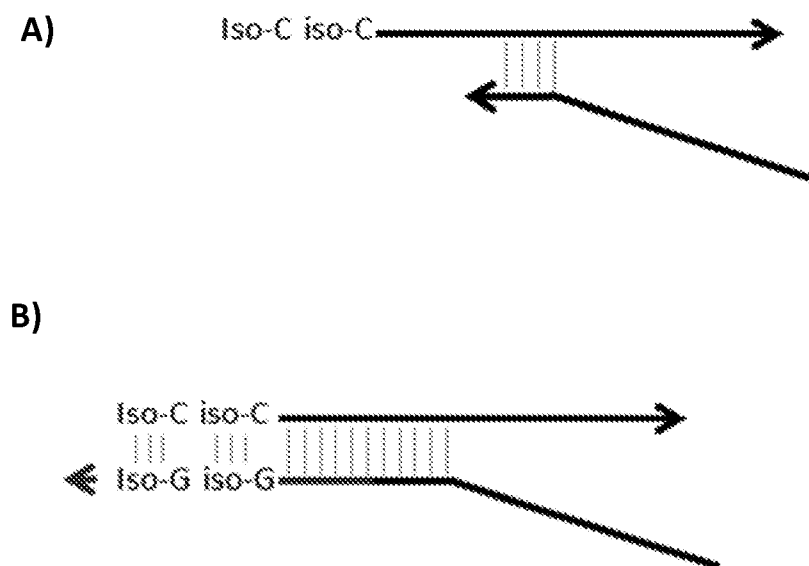


Fig. 4

