

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 993 028**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/6855 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2018 PCT/EP2018/081219**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019 WO19101596**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2018 E 18811727 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 3714064**

(54) Título: **Métodos y kits para la amplificación de ADN bicatenario**

(30) Prioridad:

21.11.2017 US 201762589074 P

(73) Titular/es:

4BASEBIO UK LTD (100.0%)

**25 Norman Way
Over, Cambridge CB24 5QE, GB**

(72) Inventor/es:

**SERANTES, ANGEL JOAQUIN PICHÉR y
BUDEUS, BETTINA**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 028 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y kits para la amplificación de ADN biciatenario

5 Antecedentes

Los últimos 10 años han visto un enorme progreso tanto en la comprensión de la enfermedad del cáncer como en el desarrollo de terapias dirigidas. Un número sin precedentes de nuevos fármacos ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer por la FDA y la EMA durante los últimos 10 años¹. Algunos de los fármacos más conocidos incluyen Trastuzumab (Herceptin) para el tratamiento del cáncer de mama que se dirige al receptor de EGFR (HER2), Cetuximab (Erbitux) para el tratamiento del adenocarcinoma colorrectal que se dirige al receptor de EGFR (HER1), Imatinib (Gleevec) para los trastornos mieloproliferativos y la CML que se dirige a la proteína de fusión Bcr-Abl, Sorafenib (Nexavar) para el cáncer de hígado y riñón que se dirige a varias tirosina cinasas, Crizotinib (Xalkori) para el tratamiento del carcinoma de pulmón de células no pequeñas mediante la inhibición de las proteínas de fusión ALK-EML, o Vemurafenib (Zelboraf) para el tratamiento del melanoma mediante la inhibición de la cinasa Brat V600E mutada. La disponibilidad de un gran conjunto de terapias dirigidas ha creado la necesidad de un perfilado molecular eficiente de los pacientes.

"Biopsia líquida" es un término acuñado para describir los procedimientos de diagnóstico realizados sobre los ácidos nucleicos en la sangre o en otros fluidos corporales (por ejemplo, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR)) de los pacientes^{2,3,4}. Las células que mueren por apoptosis o necrosis en una variedad de enfermedades (cáncer, infarto de miocardio, rechazo de trasplante) liberan ADN de sus genomas fragmentados en el torrente sanguíneo. Además, el ADN de un feto puede detectarse en la sangre de la madre. Un caso específico son los exosomas, microvesículas de 30-100 nm, que junto con el ADN o el ARN también contienen proteínas y lípidos de la célula de origen^{5,6,7}. Estos ácidos nucleicos en la sangre pueden detectarse y analizarse mediante el uso de métodos basados en PCR, secuenciación de próxima generación (NGS) o tecnologías de matriz. Los datos que se han generado a partir del análisis de biopsias líquidas (por ejemplo, ácidos nucleicos obtenidos de fluidos corporales en lugar de masas tumorales) han demostrado el enorme potencial de este enfoque que podría tener un impacto revolucionario en el diagnóstico médico, tal vez similar solo al impacto de la introducción de la imagen por resonancia magnética (IRM). Las aplicaciones clínicas que parecen particularmente prometedoras para el enfoque de biopsia líquida son el diagnóstico de anomalías cromosómicas en el feto (en particular la trisomía) mediante el análisis de la sangre de la madre (también denominada cribado prenatal no invasivo (NIPT) basado en ADNcf)^{8,9,10,11,12,13,14,15}, el diagnóstico y monitoreo del rechazo del injerto en los pacientes de trasplante (se puede detectar en la sangre del paciente)^{16,17,18,19,20}, y el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad cancerosa^{2,4,21,22,23,24,25}. Las áreas con datos limitados hasta ahora son otras enfermedades con necrosis o apoptosis tisular, tales como el infarto de miocardio²⁶. El uso de "biopsia líquida" está más avanzado en la detección de anomalías cromosómicas fetales (en particular las trisomías) donde el diagnóstico genómico desafía la combinación tradicional de medición del grosor de la nuca mediante ultrasonido y la prueba triple (AFP, hCG y estriol)¹¹. Sin embargo, el campo con la promesa de mayor impacto médico es claramente la oncología, donde los datos generados durante los últimos años han demostrado que las mutaciones clave del cáncer pueden detectarse principalmente mediante biopsia líquida que refleja las presentes en las biopsias tumorales tradicionales^{3,27,28}.

Las biopsias líquidas pueden ser superiores a las biopsias estándar, ya que todas las partes de un tumor y todas las metástasis se muestran potencialmente. Los datos recientes indican que, en la mayoría de los casos, el análisis del ADN tumoral circulante refleja fielmente las mutaciones que se encuentran en todas las metástasis conocidas de un cáncer, o incluso es superior a tal enfoque (por ejemplo, detección de mutaciones si las biopsias estándar no tienen éxito, o muestra más mutaciones que las biopsias de tejidos estándar)²⁹, lo que sugiere que la secuenciación del ADN tumoral circulante puede proporcionar una imagen molecular mucho más completa de la enfermedad cancerosa sistémica que las biopsias estándar. Además, el acceso a la sangre de un paciente no es problemático. Las biopsias líquidas seriadas pueden tomarse fácilmente para monitorear los efectos de la terapia contra el cáncer o para detectar la reaparición del cáncer siempre que el volumen de sangre necesario para el análisis respectivo sea pequeño (por ejemplo, unos pocos mililitros). La sensibilidad del método puede ser superior para detectar el cáncer en una etapa muy temprana, por ejemplo, en casos de recidiva de la enfermedad cancerosa después de una cirugía curativa, o en un programa de detección basado en la población. Si la biopsia líquida puede mejorar la detección temprana de los tumores en los programas de cribado preventivo, se traducirá en una mayor tasa de enfermedad cancerosa curada, especialmente para los tipos de tumor en los que los medios de detección temprana y los cribados preventivos son limitados o inexistentes.

Varios estudios de enfoques de biopsia líquida en pacientes con cáncer han revelado que la tasa de éxito de este enfoque se relaciona con la carga de la masa tumoral y el estadio del tumor de un paciente en el momento de la biopsia líquida, y el enfoque no es muy exitoso en los casos en que la masa tumoral es baja, porque no hay tantas células tumorales que mueren y liberan ADN en la sangre^{27,30}. Además, el enfoque funciona bien en algunos tipos de tumores (por ejemplo, carcinoma de colon), pero no en otros (por ejemplo, glioblastoma) presumiblemente también debido a problemas de sensibilidad²⁷. Las limitaciones debidas a cantidades muy pequeñas de ADNcf son probablemente más relevantes en los casos en los que el ADNcf se analiza mediante secuenciación de exoma completo o de genoma completo a diferencia de enfoques muy sensibles basados en PCR tales como BEAMing³¹.

La secuenciación del exoma es ventajosa en comparación con los enfoques basados en PCR dirigida, ya que prácticamente todo el paisaje de mutaciones de un solo nucleótido basado en el exoma puede analizarse en lugar de solo unas pocas mutaciones ya conocidas que pueden evaluarse mediante enfoques dirigidos. Por lo tanto, la secuenciación del exoma tiene mucha más utilidad para la detección temprana del cáncer con alta sensibilidad y para los análisis seriados del paisaje clonal cambiante de un tumor después del tratamiento. A menudo, en los laboratorios de investigación que tienen acceso solo a la infraestructura estándar de preparación y secuenciación de bibliotecas, se requieren cantidades de ADN libre circulante de 100 ng para la construcción de bibliotecas³². Con enfoques más especializados, la secuenciación del exoma se ha realizado a partir de cantidades de ADNcf de un mínimo de 2,3 ng³³. Newman y sus colegas han realizado la secuenciación del exoma ("CAPP-seq") a partir de hasta 7 ng de ADNcf³⁴. De Mattos-Arruda usó hasta 22 ng de entrada de ADNcf en la construcción de la biblioteca³⁵.

Un segundo problema que puede disminuir el poder de detección de los enfoques de biopsia líquida es la "contaminación" del ADN libre circulante con ADN que proviene de procesos no relacionados (por ejemplo, lisis de células sanguíneas nucleadas durante el aislamiento del plasma). El ADN libre circulante presente en el plasma sanguíneo o en otros fluidos corporales (LCR, orina, ascitis) puede dividirse en fragmentos de tamaño más pequeño (140 - 160 y 2-3x múltiplos de este) que se originan de la ruptura apoptótica del ADN genómico dentro de una célula, y fragmentos de tamaño mayor que se originan principalmente de la muerte celular necrótica (necrosis), pero también de la liberación de exosomas y de otros procesos menos comprendidos. Los fragmentos de ADN de origen apoptótico también pueden detectarse en personas sanas y pueden aumentar después de los deportes o de un resfriado, por ejemplo. Las técnicas actuales para el análisis de ADN libre circulante se componen de dos tipos principales de metodologías: A) Secuenciación de próxima generación (NGS): secuenciación del exoma de próxima generación^{33,36}, dirigido (TAmseq³⁷; CAPPseq³⁴), FastSeqS³⁸, mFAST-SeqS³⁹, Safe- SeqS⁴⁰), o secuenciación del genoma completo²⁸. También se han usado algunos kits comerciales en esto (por ejemplo, Thermo Fisher Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2). B) PCR digital (BEAMing: perlas, emulsiones, amplificación y magnetismo^{31,41}, 42,43,44, ensayo de ligazón de PCR digital⁴⁵; ddPCR a base de emulsión con tecnología de RainDance o Bio-Rad).

El documento WO 2014/140,309 se refiere a métodos para replicar, amplificar y secuenciar ácidos nucleicos mediante el uso de la replicasa bifuncional, termoestable "TthPrimPol" de *Thermus thermophilus* HB27. Se ha encontrado que la TthPrimPol purificada mostró una fuerte actividad de la primasa del ADN en un oligonucleótido monocatenario en el que una posible secuencia de reconocimiento de la primasa (GTCC) está flanqueada por residuos de timina. Se ha demostrado que tal tramo de pirimidinas es el contexto de la plantilla preferido para la iniciación de la reacción de cebado por varias primasas virales, procariotas y eucariotas. Se ha encontrado que la activación se produjo solo delante de la secuencia "TC", y que no hubo activación opuesta a las pistas de poldT. Un análisis adicional de los requisitos de la secuencia de la plantilla reveló un efecto del nucleótido que precede al sitio de iniciación de la plantilla sobre la actividad de la primasa de TthPrimPol-C se prefiere sobre A, G o T. Incluso si TthPrimPol prefiere CTC como sitio de iniciación de la plantilla, es en general capaz de actuar como una primasa en cualquier secuencia de la forma genérica XTC, donde X representa cualquiera de A, C, G, o T. El requisito de secuencia modesta forma una excelente base para la cebado aleatorio de casi todas las plantillas naturales. El documento WO2015/157747 describe sistemas y métodos para la replicación y amplificación clonal de moléculas de ácido nucleico para aplicaciones genómicas y terapéuticas. El documento US2011/269193 se refiere a un método para amplificar un ácido nucleico diana mediante amplificación de círculo rodante. El documento US2003/108902 se refiere a la generación de un ADN circular monocatenario a partir de segmentos lineales de autoempalme.

Por lo tanto, las limitaciones de sensibilidad y especificidad de los enfoques actuales de biopsia líquida son un área que necesita una mejora técnica.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes, que se incorporan en la presente descripción y forman parte de la descripción, ilustran modalidades ilustrativas y, junto con la descripción, sirven además para permitir a un experto en la técnica pertinente realizar y usar estas modalidades y otras que serán evidentes para los expertos en la técnica. La invención se describirá más particularmente junto con los siguientes dibujos en donde:

La Figura 1 muestra el pretratamiento de ADN libre circulante para eliminar los extremos sobresalientes, restaurar los fosfatos en 5' y los grupos hidroxilo en 3', y añadir salientes de 3' dA.

La Figura 2 muestra un mecanismo de un kit de amplificación para el ADN libre circulante apoptótico.

La Figura 3 muestra evidencia de que la tecnología TruePrime requiere la adición de adaptadores en horquilla para amplificar eficientemente moléculas de ADN cortas (200 pb) mediante amplificación por desplazamiento múltiple iniciada por primasa. "NTC" se refiere a "control sin plantilla" (no se añade ADN como entrada para la reacción). "ADNHg" significa ADN genómico humano.

La Figura 4 muestra ADN amplificados (3 réplicas independientes) de la Figura 3 (ADN 1) que se cortaron con la enzima de restricción EcoRI para obtener el tamaño de unidad esperado (200 pb del fragmento de ADN original +

36 pb del adaptador en horquilla).

Las Figuras 5A y 5B muestran los rendimientos de amplificación (5A, parte superior) en dependencia del método usado para iniciar la amplificación (TthPrimPol o cebadores aleatorios) y el resultado de la digestión con una enzima de restricción de cada ADN amplificado (5B, parte inferior).

La Figura 6 muestra los rendimientos de amplificación de moléculas cortas de ADN (de 50 a 1250 pb), que requieren la adición de adaptadores en horquilla, mediante amplificación por desplazamiento múltiple iniciada por primasa.

10 La Figura 7 muestra adaptadores usados para probar la actividad de la primasa del ADN de TthPrimPol.

La Figura 8 muestra la actividad de la primasa de ADN de TthPrimPol observada en cada adaptador en horquilla.

15 La Figura 9 muestra los rendimientos de amplificación de ADN obtenidos a partir de muestras de ADNcf de 48 pacientes con cáncer, así como también el protocolo detallado del proceso de amplificación.

La Figura 10 muestra los rendimientos de amplificación en microgramos obtenidos a partir de diferentes cantidades de ADNcf de un paciente con cáncer.

20 La Figura 11 muestra la alta correlación de los fragmentos separados por la secuencia del adaptador en horquilla [SEQ ID NO:1] con respecto a la longitud de la lectura de MinION (Oxford Nanopore).

La Figura 12 muestra la cobertura del genoma y la detección de variantes del número de copias a partir de dos muestras de ADNcf amplificadas del mismo paciente con cáncer de colon.

25 La Figura 13 muestra el gráfico de cobertura de las dos muestras de ADNcf amplificadas del mismo paciente con cáncer de colon en diferentes resoluciones. Este gráfico refleja la distribución de lecturas a lo largo del cromosoma 4 a partir de dos muestras de ADNcf del mismo paciente con cáncer de colon amplificado con el método descrito en la presente descripción. Se llevó a cabo la secuenciación de todo el genoma y las lecturas obtenidas se alinearon con el genoma de referencia humano. Se observa una distribución muy uniforme y homogénea de lecturas en reacciones de amplificación independientes a diferentes resoluciones. El gráfico se acerca para mostrar cuán similar es el patrón de distribución en ambas muestras.

30 La Figura 14 muestra el número de variantes anotadas y no anotadas detectadas en cada uno de los tres pacientes al comparar las muestras de ADNcf amplificadas y no amplificadas en cada caso.

35 La Figura 15 muestra los resultados de identificación de variantes obtenidos para el primer paciente a dos frecuencias de alelos diferentes (1 % y 35 %) y la correlación entre las muestras de ADNcf amplificadas y no amplificadas.

40 La Figura 16 muestra los resultados de identificación de variantes obtenidos para el segundo paciente a dos frecuencias de alelos diferentes (1 % y 35 %) y la correlación entre las muestras de ADNcf amplificadas y no amplificadas.

45 La Figura 17 muestra los resultados de identificación de variantes obtenidos para el tercer paciente a dos frecuencias de alelos diferentes (1 % y 35 %) y la correlación entre las muestras de ADNcf amplificadas y no amplificadas.

La Figura 18 muestra una secuencia de aminoácidos para TthPrimPol [SEQ ID NO: 10].

50 Resumen

El análisis de ADN libre circulante en oncología y en otros campos ofrece enormes oportunidades para mejorar el diagnóstico y el tratamiento en los pacientes. Un problema clave es la dificultad de obtener resultados de fluidos biológicos tales como muestras de plasma, orina o LCR con un contenido de ADN libre circulante muy bajo. Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan una solución para este problema al amplificar fragmentos polinucleotídicos cortos bicatenarios, que incluyen ADN bicatenario. Esto incluye, sin limitación, las moléculas que se encuentran en el ADN libre circulante. La amplificación se basa en una tecnología de amplificación llamada "amplificación por desplazamiento múltiple iniciada por primasa" ("PI-MDA", también denominada "TruePrime") combinada con un conjunto novedoso de tratamientos de preamplificación de muestras que permite su amplificación eficiente mediante etapas posteriores tales como la amplificación de ADN de círculo rodante. Como se usa en la presente descripción, "amplificación por desplazamiento múltiple iniciada por primasa" o "TruePrime" se refiere a una forma de amplificación por desplazamiento múltiple ("MDA") que usa una primasa/polimerasa para proporcionar cebadores para la extensión de cebadores por una ADN polimerasa. Típicamente, la polimerasa tiene una capacidad de desplazamiento muy fuerte y una buena fidelidad de síntesis para evitar cambios de secuencia durante el proceso. Una de tales polimerasas es la ADN polimerasa Phi29. Mientras que la MDA estándar de oro actual

necesita piezas cortas de ADN ("oligonucleótidos") para iniciar la amplificación, la amplificación por desplazamiento múltiple iniciada por primasa no necesita ningún cebador aleatorio sintético.

Los métodos descritos actualmente abordan, entre otros problemas, este problema de sensibilidad y especificidad de la biopsia líquida mediante una amplificación adaptada de ADN libre circulante apoptótico en base a la tecnología PI-MDA ("TruePrime"), que es un método de amplificación de ADN mediante etapas iterativas de cebado, copia y desplazamiento.⁴⁶ Los kits y protocolos TruePrime están disponibles comercialmente de Expedeon AG y sus afiliados. Esta descripción proporciona una combinación de TruePrime existente con las etapas añadidas de un tratamiento previo de la muestra, que comprende una reparación de extremos, una adición de cola de dA y la ligazón de adaptadores en horquilla (véase la Figura 1). Individualmente, estas etapas pueden llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen mediante el uso del kit de preparación de biblioteca de ADN NEBNext Ultra II de New England Biolabs y productos y métodos similares, y/o por ejemplo: (a) para la reparación de extremos se usan comúnmente polinucleótido cinasa T4 (PNK) + fragmento Klenow de la ADN polimerasa T4 y fragmento grande de la ADN polimerasa T4 (b) para la adición de cola de dA se usa comúnmente la Taq polimerasa. Esta combinación novedosa de métodos proporciona un proceso eficiente para lo que de cualquier otra manera sería ineficaz o ineficaz: la amplificación de fragmentos pequeños de ADN mediante métodos tradicionales TruePrime u otros. Las etapas del método pueden seguirse opcionalmente por el método de amplificación de ADN de círculo enrollado (ver Figura 2). Por lo tanto, proporcionamos un método novedoso para amplificar cortas moléculas de ADN, por ejemplo, pero sin limitarse a, ADN libre circulante apoptótico sin ligazón, lo que permite un aumento en el ADN disponible para cualquier tecnología analítica, con una sensibilidad y especificidad superiores. Mientras que los métodos descritos en la presente descripción proporcionan una ventaja particular para fragmentos cortos de ADN, también funcionan bien con muestras de ADN de cualquier longitud.

Descripción detallada

I. Introducción

PrimPol es una enzima obtenida a partir de la bacteria termófila *Thermus thermophilus*. PrimPol combina dos actividades distintas y complementarias en una única proteína termostable: primasa y polimerasa. Las polimerasas convencionales requieren pequeñas estirpes de nucleótidos (cebadores) hibridados con una molécula de plantilla para sintetizar la secuencia complementaria. PrimPol, por el contrario, crea su propia secuencia de cebador, ofreciendo de esta manera aplicaciones completamente novedosas.

Además, PrimPol es capaz de copiar tanto el ADN como el ARN. El ARN refleja qué información genética se expresa realmente en una célula, mientras que el ADN se refiere a la información genética general presente en cada célula del cuerpo y a menudo solo refleja una predisposición de una persona a desarrollar una enfermedad. El desarrollo de PrimPol ayudará a simplificar los aspectos técnicos de los procedimientos de amplificación de ADN y ARN.

PrimPol también muestra una gran tolerancia al ADN dañado. El ADN está sujeto a modificaciones químicas dentro de las células. Además, durante los procesos necesarios para purificar el material genético y el almacenamiento de muestras forenses y clínicas (por ejemplo, tejidos fijos en formalina e incrustados en parafina) se desencadenan tales modificaciones. Se ha demostrado que las modificaciones químicas desempeñan un papel cada vez más importante en varios procesos biológicos, tales como el envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Por lo tanto, existe un gran interés en desarrollar métodos para interrogar el ADN dañado en el contexto de la secuenciación. Por lo tanto, una enzima capaz de manejar plantillas modificadas es de particular interés, ya que las aplicaciones de amplificación actuales, así como también las tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación no están optimizadas para usar muestras dañadas.

PrimPol también es adecuado para usarse en diferentes tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación debido a su capacidad de introducir una variedad de nucleótidos de sustrato (por ejemplo, nucleótidos fluorescentes) en moléculas plantilla de ADN y ARN.

Finalmente, PrimPol tiene un papel en las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), generando cebadores para su uso posterior por la ADN polimerasa Phi29, lo que hace innecesario el uso de cebadores sintéticos aleatorios y posiblemente da como resultado una amplificación más uniforme del ADN.

II. Métodos para amplificar polinucleótidos bicatenarios lineales

En la presente descripción, se proporcionan, entre otras cosas, métodos para amplificar polinucleótidos bicatenarios lineales (por ejemplo, moléculas de ADN) y, en particular, ADN libre circulante (mononucleosómico) apoptótico. Los métodos para amplificar ADN bicatenario lineal que incluyen unir adaptadores en horquilla monocatenarios que comprenden una secuencia cebadora XTC, en donde X es adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T), a ambos extremos de las moléculas de ADN para producir moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, que comprenden secuencias internas complementarias, y en donde la secuencia cebadora XTC se ubica en la porción no complementaria de los adaptadores; y amplificar las moléculas de ADN monocatenarias

cerradas covalentemente, mediante amplificación de círculo rodante mediante el uso de una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena y amplificación por desplazamiento múltiple, por ejemplo, amplificación por desplazamiento múltiple iniciada por la primasa mediante el uso de TthPrimPol.

5 A. ADN biciatenario lineal

El ADN biciatenario lineal para su uso en los métodos de amplificación descritos en la presente descripción puede proporcionarse de cualquier fuente. Esto incluye, por ejemplo, ADN de eucariotas, eubacterias, arqueobacterias y virus. Las fuentes eucariotas de ADN pueden incluir plantas, animales, vertebrados, mamíferos y seres humanos. 10 Las fuentes microbianas de ADN pueden incluir microbios obtenidos de un microbioma de un individuo o del medio ambiente.

El ADN biciatenario lineal usado en los métodos de amplificación descritos en la presente descripción puede ser de cualquier longitud. En ciertas modalidades, el ADN biciatenario lineal tiene una longitud de no más de 5000 nucleótidos, no más de 1000 nucleótidos, no más de 500 nucleótidos o no más de 200 nucleótidos. En otras modalidades, la población de moléculas de ADN biciatenarias lineales que se van a amplificar puede tener una longitud promedio de no más de 5000 nucleótidos, no más de 1000 nucleótidos, no más de 500 nucleótidos, no más de 200 nucleótidos, no más de 100 nucleótidos, no más de 50 nucleótidos, no más de 20 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 168 nucleótidos. Las moléculas de ADN que se van a amplificar pueden incluir moléculas que tienen una longitud de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 220 nucleótidos. El ADN biciatenario lineal 20 puede comprender ADN cromosómico fragmentado. Tales fragmentos de ADN pueden tener una longitud mayor que 5000 nucleótidos.

25 Los ácidos nucleicos típicamente se aíslan de otros componentes mediante métodos de aislamiento bien conocidos en la técnica que incluyen, sin limitación, la captura en partículas que tienen actividad de unión a ADN o ARN, tales como partículas de sílice; precipitación de polietilenglicol y perlas de SPRI (inmovilización reversible de fase sólida).

1. Polinucleótidos libres

30 El ADN biciatenario lineal usado en los métodos descritos en la presente descripción puede comprender ADN libre circulante ("ADNcf"). El ADN libre circulante se refiere al ADN que no está encapsulado dentro de una célula. El ADN libre circulante puede ser ADN libre circulante apoptótico. (Figura 1, "ADN libre circulante apoptótico".) El ADNcf apoptótico se refiere al ADN liberado de células muertas o moribundas, por ejemplo, a través del mecanismo de muerte celular por apoptosis, en el que el ADN se corta entre los nucleosomas, lo que produce fragmentos de 35 ADN de 160- 170 pb, o múltiplos de los mismos, cuando el corte en el ADN no se produce entre cada nucleosoma. Esto incluye el ADN liberado de células normales, por ejemplo, que tienen un genoma de línea germinal. También incluye el ADN liberado de las células cancerosas (por ejemplo, células malignas), también denominado ADN tumoral circulante o "ADNtc". Este ADN típicamente lleva mutaciones somáticas asociadas con el cáncer, por ejemplo, en oncogenes o genes supresores de tumores. El ADNcf apoptótico incluye además ADN fetal en la 40 circulación materna. El ADN libre circulante puede obtenerse de cualquiera de una serie de diferentes fluidos corporales que incluyen, sin limitación, sangre, plasma, suero, LCR, orina, saliva, lágrimas, leche, semen y líquido sinovial. El ADNcf apoptótico típicamente tiene una distribución de tamaños con dos picos; un primer pico mononucleosómico de aproximadamente 110 a aproximadamente 230 nucleótidos, con un modo de 45 aproximadamente 168 nucleótidos, y un segundo pico dinucleosómico menor de aproximadamente 240 a 440 nucleótidos.

55 Las moléculas de ADN libre circulante pueden prepararse a partir de fluidos corporales, tales como la sangre, mediante métodos convencionales. Los kits comerciales para este propósito están disponibles en, por ejemplo, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.), Active Motif (Carlsbad, CA, EE. UU.) y Qiagen (North Rhine-Westphalia, Alemania). En general, las células se eliminan de una muestra, por ejemplo, por centrifugación. Las partículas de sílice, por ejemplo, perlas de sílice magnéticas, se añaden a la muestra de la que se han eliminado las células. Las partículas de sílice se unen al ADN. Las partículas se aíslan del sobrenadante, por ejemplo, mediante centrifugación y/o aplicación de fuerza magnética. Se elimina el sobrenadante y se lavan las partículas. El ADN libre circulante se aísla de las partículas por dilución con etanol.

55 2. Otros polinucleótidos

En otras modalidades, las moléculas de ADN biciatenarias comprenden ADN genómico fragmentado, por ejemplo, aislado de células o moléculas de ADNc biciatenario producidas a partir de la transcripción inversa de moléculas de ARN, tales como moléculas de ARNm, ARNr o ARNt.

60 3. Reparación de extremos

65 La reparación de extremos se refiere a un proceso para proporcionar moléculas de ADN biciatenarias que tienen salientes monocatenarios de 3' y/o 5' con extremos cohesivos o extremos romos. La reparación de extremos hace que las moléculas de ADN biciatenarias sean más adecuadas para unirse a los adaptadores polinucleotídicos. La

5 unión puede ser por ligazón de extremos cohesivos o ligazón de extremos romos. "Ligazón de extremos cohesivos" se refiere al enlazamiento de dos polinucleótidos bicatenarios, cada uno de los cuales tiene un saliente 3' complementario al otro saliente 3'. Un extremo cohesivo puede ser, por ejemplo, un saliente de un solo nucleótido, tal como 3' dA y 3' dT, o un extremo cohesivo más largo, tal como un saliente producido por la digestión con enzimas de restricción. "Ligazón de extremos romos" se refiere a la ligazón de un polinucleótido bicatenario al extremo romo de otro polinucleótido bicatenario.

10 En cualquier caso, la modificación del polinucleótido típicamente implica inicialmente cortar de manera romo las moléculas. Típicamente, esto implica usar una polimerasa para llenar un saliente 5' y una molécula que tiene actividad de exonucleasa para masticar un saliente 3'. El extremo romo puede realizarse mediante el uso de una mezcla de T4 polimerasa y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El fragmento Klenow posee actividad de polimerasa de 5' - 3' para llenar los salientes de 5' y actividad de exonucleasa de 3' - 5' para eliminar los salientes de 3'. La ADN polimerasa T4 posee una actividad menos eficiente de la actividad de polimerasa 5' 3' y una actividad de exonucleasa 3' - 5' más eficiente. La nucleasa de frijol mungo también 15 puede usarse para eliminar salientes 5' y 3'. El polinucleótido cinasa T4 ("T4 PNK") se usa para fosforilar la cadena de 5' de una molécula y desfosforilar la cadena de 3'. Los kits para realizar el extremo romo de las moléculas de ADN están disponibles de una variedad de fuentes comerciales que incluyen Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.) y New England Biolabs (Ipswich, MA, EE. UU.).

20 En ciertas modalidades, puede añadirse una cola de dA a un polinucleótido con extremo romo mediante un proceso de adición de un nucleótido de desoxiadenosina terminal 3' a una molécula de ADN. Esta acción puede realizarse mediante el uso de la Taq polimerasa. (Figura 1, "ADNcf con extremos reparados (salientes 3'-dA").)

25 Las moléculas de extremo romo o moléculas con dA pueden usarse en los métodos descritos en la presente descripción mediante la unión de adaptadores monocatenarios.

B. Unión de adaptadores monocatenarios

30 Los polinucleótidos con extremos reparados y, opcionalmente, adición de cola de dA pueden ligarse a adaptadores. Los adaptadores son moléculas de polinucleótidos adaptadas para unirse a moléculas diana. Típicamente, los adaptadores incluyen secuencias de nucleótidos para la cebadura de la extensión de la cadena de ADN. En ciertos métodos de esta descripción, el adaptador es un adaptador en horquilla. Como se usa en la presente descripción, el término "adaptador en horquilla" se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenaria (por ejemplo, ADN) que incluye una segunda región flanqueada por una primera y tercera región. La primera y tercera regiones tienen 35 suficiente complementariedad para hibridar entre sí (por ejemplo, 95 %, 99 % o 100 % complementarias). La segunda región no es complementaria a la primera ni a la tercera región. El adaptador puede tener una longitud de entre 25 y 100 nucleótidos de largo. La segunda región puede ser, por ejemplo, de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o menos de 25 nucleótidos de longitud. Como consecuencia, una molécula adaptadora de horquilla puede doblarse sobre sí misma formando una estructura de tallo y lazo que comprende un extremo bicatenario y un 40 segmento interno monocatenario que no se hibrida. Los adaptadores en horquilla pueden incluir un saliente dA 3' o ser de extremo romo, en dependencia de la aplicación. Ver, por ejemplo, la Figura 7 y la Figura 8.

45 Los adaptadores incluyen además secuencias de nucleótidos internas compatibles con una primasa de ADN y/o extensión de cebador. El adaptador en horquilla incluye una secuencia de reconocimiento de primasa/polimerasa, por ejemplo, XTC, donde X representa nucleótidos adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T) por ejemplo, CTC, GTC o GTCC. La secuencia de reconocimiento de primasa/polimerasa se ubica en la porción del lazo (no complementaria) del adaptador, que es reconocida por TthPrimPol. En otras modalidades, el adaptador en horquilla comprende un sitio de unión del cebador de amplificación.

50 Los polinucleótidos bicatenarios con reparación de extremos y adición de cola de dA pueden unirse en uno o ambos extremos a adaptadores en horquilla. El extremo del adaptador es preferentemente compatible con el extremo del polinucleótido bicatenario. Por lo tanto, por ejemplo, un polinucleótido bicatenario con cola de dA se une a un adaptador en horquilla con cola de dT, o un polinucleótido bicatenario con extremos romos se une a un adaptador en horquilla con extremos romos. La unión se realiza típicamente con una ligasa de ADN, tal como la ligasa de ADN T4. 55 En ciertas modalidades, los adaptadores en horquilla tienen una secuencia como se representa en la Figura 7, es decir, [SEQ ID NO:1], [SEQ ID NO:2], [SEQ ID NO:3] o [SEQ ID NO:4].

60 El producto de ligazón entre los adaptadores en horquilla y los polinucleótidos bicatenarios es un polinucleótido monocatenario cerrado covalentemente. Ver, por ejemplo, la Figura 1 ("Ligazón del adaptador"). Dicho polinucleótido también puede describirse como un polinucleótido circular monocatenario. Como se usa en la presente descripción, el término "molécula de ADN cerrada covalentemente" se refiere a una molécula de ADN que no tiene extremo libre 5' o 3'. Tales moléculas también se denominan "ADN circular". Debido a que tienen secuencias internas complementarias, tales moléculas pueden asumir una forma de "mancuerna". Un inserto polinucleotídico flanqueado en uno o ambos extremos por adaptadores en horquilla se denomina "polinucleótido etiquetado con adaptador".

65 Una colección de polinucleótidos etiquetados con adaptador se denomina "biblioteca de ácido nucleico".

Típicamente, en el caso del ADNcf, una biblioteca de ácido nucleico que comprende una población de moléculas de ADN reparadas por el extremo incluye inserciones de polinucleótidos que tienen diferentes secuencias de nucleótidos.

- 5 Los polinucleótidos monocatenarios cerrados covalentemente, pueden amplificarse por los métodos descritos en la presente descripción.

C. Amplificación

- 10 En ciertas modalidades, la amplificación de polinucleótidos monocatenarios cerrados covalentemente implica el uso de una primasa/polimerasa dirigida por ADN, tal como TthPrimPol; una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena, tal como Phi29; y desoxirribonucleótidos modificados o no modificados. En combinación, estos reactivos producen la amplificación de círculo rodante cebada por la primasa/polimerasa y extendida por la ADN polimerasa. Además, la combinación de primasa/polimerasa y ADN polimerasa puede afectar la amplificación de desplazamiento de múltiples cadenas a través de la activación de moléculas amplificadas con la primasa/polimerasa y/o cebadores de oligonucleótidos aleatorios y extensión de cebador por la ADN polimerasa. La amplificación por desplazamiento de múltiples cadenas produce una estructura ramificada a medida que la síntesis de ADN se inicia y se extiende desde muchas posiciones en las moléculas amplificadas.
- 15 20 Además, la amplificación puede lograrse sin el uso de moléculas de cebadores de oligonucleótidos mediante el uso de adaptadores en horquilla que comprenden uno o más sitios de reconocimiento de primasa junto con una primasa que tiene actividad de cebado de ADN en ADN monocatenario, tal como TthPrimPol, y una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena, tal como Phi29 y trifosfatos de desoxirribonucleótidos. Mediante el uso de estos reactivos, se produce una estructura altamente ramificada durante la amplificación de desplazamiento de múltiples cadenas.

1. Primasa/Polimerasa

- 30 Como se usa en la presente descripción, el término "activación" se refiere a la generación de un cebador de oligonucleótido en una plantilla de polinucleótido.

Para la amplificación del ADN, la primasa/polimerasa es una primasa/polimerasa dirigida por ADN, y es una enzima PrimPol. TthPrimPol. A diferencia de la mayoría de las primasas, PrimPol es capaz de iniciar exclusivamente las cadenas de ADN con dNTP. La enzima TthPrimPol es una primasa/polimerasa de *Thermus thermophilus* ("TthPrimPol").

40 La primasa/polimerasa HB27 de *Thermus thermophilus* se describe, por ejemplo, en el documento WO 2014/140309, publicado el 18 de septiembre de 2014 ("Methods for amplification and sequencing using thermostable TthPrimPol"). Tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 18 [SEQ ID NO: 10]. Lleva la ID de gen: NC_005835 en la base de datos Entrez del NCBI, proteína WP_011173100.1 TthPrimPol puede obtenerse comercialmente en kits de Expedeon (Cambridge, Reino Unido).

45 La PrimPol humana se conoce también como MYP22; CCDC111 y Primpol1, y se describe en la presente descripción, pero no es parte de la invención. Lleva la ID de gen: 201973 en la base de datos Entrez del NCBI.

50 Las PrimPol descritas en la presente descripción pueden ser un parente de cualquier PrimPol descrita en la presente descripción, que incluye lo siguiente: Una variante alélica (una variación de origen natural de un gen), una variante artificial (un gen o proteína que comprende una o más modificaciones genéticas de un gen o proteína de origen natural mientras mantiene la función natural), un homólogo (un gen de origen natural de otro género o especie que el definido, o un gen distinto en la misma cepa o especie que codifica una proteína que tiene un plegado y una función casi idénticos); un ortólogo (un homólogo que se produce en otro género o especie que el que se analiza) o un parálogo (un homólogo que se produce en la misma cepa o especie que el que se analiza, por ejemplo, como resultado de la duplicación de genes). Una enzima PrimPol descrita en la presente descripción puede tener al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de homología de secuencia de aminoácidos con la proteína de la SEQ ID NO: 10.

2. ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena

60 Los métodos de amplificación pueden emplear una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, por ejemplo, una polimerasa con fuerte unión al ADN monocatenario, por ejemplo, en preferencia al ADN bicatenario. La actividad de desplazamiento de cadena puede ser útil para desplazar las cadenas hibridadas de una molécula de ADN mientras se extiende una posición de cebador, por ejemplo, en el área de lazo de una estructura en horquilla.

65 Las ADN polimerasas con actividad de desplazamiento de cadena útiles en los métodos descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo, Phi29. La ADN polimerasa Phi29 puede obtenerse comercialmente de, por ejemplo, New England Biolabs (Ipswich, MA, EE. UU.), ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.) y Expedeon

(Cambridge, Reino Unido). La polimerasa Phi29 puede generar fragmentos de ADN de hasta 100 kb. La enzima tiene una extrema actividad de corrección de errores de exonucleasa 3' 5' y proporciona hasta 1000 veces mayor fidelidad en comparación con los métodos basados en la Taq ADN polimerasa. La polimerasa Phi29 puede funcionar sobre un ADN que comprende estructuras secundarias tales como bucles de horquilla.

- 5 En otra modalidad, la ADN polimerasa puede ser la polimerasa de *Bacillus steatothermophilus* (Bst).
- 10 3. Trifosfatos de desoxirribonucleótidos
- 15 10 La creación de cebadores y la extensión de cebadores se pueden lograr al proporcionar enzimas primasa/polimerasa y ADN polimerasas con sustratos de desoxirribonucleótidos, por ejemplo, trifosfatos de desoxirribonucleótidos. Típicamente, estos incluyen las cuatro bases estándar, A, T, G y C. Sin embargo, en ciertas modalidades pueden incluirse nucleótidos no naturales, tales como la inosina. En ciertas modalidades, los nucleótidos pueden portar una etiqueta para la detección o captura de polinucleótidos en los que se incorporan.
- 20 15 4. Amplificación de círculo rodante
- 25 La amplificación de círculo rodante es un método para amplificar una molécula de ADN cerrada covalentemente tal como una molécula de ADN bicatenaria cerrada covalentemente. La molécula de ADN plantilla se activa con un cebador, por ejemplo, un cebador proporcionado por una primasa/polimerasa. Una ADN polimerasa realiza la extensión del cebador en el cebador alrededor de la molécula de ADN cerrada. La polimerasa desplaza la copia hibridada y continúa la extensión del polinucleótido alrededor de la plantilla para producir un producto de amplificación concatenado.
- 30 25 5. Amplificación por desplazamiento múltiple
- 35 La amplificación por desplazamiento múltiple es un método de amplificación de ADN no basado en PCR isotérmico en el que la extensión del cebador a partir de una molécula de plantilla produce moléculas que se priman y copian mediante la extensión del cebador para producir una estructura en forma de rama. Las ramas se desplazan entre sí a medida que los cebadores se extienden desde una plantilla de molécula de ADN hacia el área de ramificación. En ciertas modalidades, MDA emplea hexámeros aleatorios como cebadores para iniciar la amplificación en múltiples sitios en una plantilla original y copias amplificadas de la misma. La amplificación de múltiples cadenas se describe adicionalmente en, por ejemplo, el documento WO2011/047307A1, publicado el 21 de abril de 2011 ("Amplificación por desplazamiento múltiple"). Polimerización que extiende los cebadores en múltiples sitios de cebado.
- 40 35 En los métodos descritos, la cebadura se lleva a cabo con TthPrimPol. En este caso, la cebadura incluye la provisión de trifosfatos de desoxirribonucleótidos como reactivo. En ciertas modalidades, los desoxirribonucleótidos no se modifican. En otras modalidades, los desoxirribonucleótidos pueden modificarse mediante uniones a una etiqueta, por ejemplo, una molécula fluorescente. Como se usa en la presente descripción, el término "etiqueta" se refiere a una porción química unida a una molécula, tal como una molécula de ácido nucleico. Las etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas enzimáticas, etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas y etiquetas radiactivas.
- 45 Con referencia a la Figura 2, en los métodos descritos en la presente descripción, se proporciona una plantilla de molécula de ácido nucleico monocatenario cerrado covalentemente ("ADNcf tratado previamente para añadir adaptadores en horquilla en ambos extremos"). TthPrimPol se proporciona y reconoce los sitios de reconocimiento en el adaptador en horquilla y comienza la polimerización mediante la síntesis de cebadores. ("Reconocimiento de horquilla por TthPrimPol y síntesis del cebador".) Una ADN polimerasa con preferencia por unirse a moléculas de ácido nucleico monocatenarias y actividad de desplazamiento de cadena amplifica la plantilla a través de una combinación de amplificación de círculo rodante y amplificación por desplazamiento múltiple. La amplificación de círculo rodante proporciona una molécula concatenada que se dobla sobre sí misma formando segmentos bicatenarios en base a las secuencias complementarias. Estos dobleces incluyen además las secuencias del adaptador que comprenden los sitios de reconocimiento de primasa/polimerasa. La primasa/polimerasa sintetiza cebadores en la molécula concatenada que, a su vez, se extienden por la ADN polimerasa. El resultado es una amplificación exponencial de la molécula de plantilla original, típicamente de forma ramificada. ("Desplazamiento de cadena y amplificación de círculo rodante exponencial mediante nuevos eventos de cebado".)
- 50 55 6. Otros métodos de amplificación
- 60 En la presente descripción se describen otros métodos para amplificar moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente.
- 65 En un método descrito en la presente descripción, en lugar de iniciar la polimerización con una primasa/polimerasa, la amplificación se inicia con cebadores de secuencia aleatoria. Por ejemplo, los cebadores de secuencia aleatoria pueden ser hexámeros que comprenden un conjunto redundante de secuencias. La amplificación puede continuar mediante una amplificación por desplazamiento múltiple.

En otro método descrito en la presente descripción, la amplificación de las moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, se realiza mediante la PCR con cebadores de oligonucleótidos redundantes (DOP). La (DOP)-PCR usa un único cebador para la PCR (en lugar de un cebador directo e inverso). Este cebador es generalmente un oligómero que tiene aproximadamente 22 bases con una región redundante de seis nucleótidos en el centro, por ejemplo, CGACTCGAGNNNNNATGTGG [SEQ ID NO: 9]. Esta región redundante es una secuencia aleatoria compuesta por cualquiera de los cuatro nucleótidos de ADN. Las primeras cinco etapas del procedimiento DOP-PCR son una etapa de amplificación no específica. El cebador redundante junto con las bajas temperaturas de hibridación provocará un apareamiento aleatorio en ubicaciones a través de todo el genoma. Durante la PCR, la extensión se producirá a partir de estos cebadores y creará fragmentos largos.

En otro método descrito en la presente descripción, la amplificación de las moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, se realiza por amplificación de preamplificación de cebador (PEP). La preamplificación de extensión del cebador (PEP) utiliza cebadores aleatorios/redundantes y una temperatura de hibridación de PCR baja. Los cebadores pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud.

En otro método descrito en la presente descripción, la amplificación de las moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, se realiza mediante PCR con adaptador y enlazador (LA-PCR). En LA-PCR, el ADN bicatenario se digiere con MseI, dejando un saliente TA para el apareamiento del adaptador y la posterior ligazón. Un único cebador, complementario al adaptador, se usa para amplificar toda la muestra por PCR.

En otro método descrito en la presente descripción, la amplificación de las moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, se realiza mediante el uso de cualquier combinación de una ADN polimerasa termostable (por ejemplo, Taq polimerasa) y una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena altamente procesativa (por ejemplo, polimerasa Phi29 o polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)). Uno de tales métodos son los ciclos de amplificación basados en múltiples ciclos de recocido y lazo (MALBAC). MALBAC es un método de amplificación del genoma completo no exponencial. Los cebadores usados en MALBAC permiten que los amplicones tengan extremos complementarios que forman bucles, lo que inhibe la copia exponencial.

D. Secuenciación de ADN

Como se usa en la presente descripción, el término "secuenciación de alto rendimiento" se refiere a la secuenciación simultánea o casi simultánea de miles de moléculas de ácido nucleico. La secuenciación de alto rendimiento a veces se denomina "secuenciación de próxima generación" o "secuenciación masivamente paralela". Las plataformas para la secuenciación de alto rendimiento incluyen, sin limitación, la secuenciación de firmas masivamente paralelas (MPSS), la secuenciación de Polony, la secuenciación por pirosecuenciación 454, la secuenciación de Illumina (Solexa), la secuenciación de SOLiD, la secuenciación de semiconductores de Ion Torrent, la secuenciación de nanobola de ADN, la secuenciación de molécula única de Heliscope, la secuenciación de tiempo real de molécula única (SMRT) (PacBio) y la secuenciación de ADN de nanoporo (por ejemplo, Oxford Nanopore).

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para, sin limitarse a, la secuenciación de genoma completo, la secuenciación de exoma y la secuenciación de amplicón. En la medida en que el ADNcf apoptótico comprende secuencias de todo el genoma, el producto de amplificación de los métodos descritos en la presente descripción representa una amplificación de todo el genoma. Sin embargo, las propias moléculas amplificadas, pueden estar sujetas a la amplificación de amplicones específicos. La captura de secuencias mediante el uso de cebadores dirigidos a secuencias de genes en el genoma puede usarse para aislar las moléculas amplificadas que representan el exoma. Al transcribir de forma inversa el ARNm en ADNc bícatenario, se puede producir un transcriptoma amplificado para la secuenciación.

El ADN amplificado mediante los métodos descritos en la presente descripción tiene propiedades del ADN bícatenario. Esto se debe, al menos en parte, a la complementariedad dentro de las cadenas que se doblan sobre sí mismas. En consecuencia, el ADN amplificado puede prepararse para la secuenciación como se podría hacer con el ADN bícatenario nativo. Los métodos de preparación de bibliotecas dependen tanto de la plataforma de secuenciación como del enfoque de secuenciación. Por ejemplo, la plataforma de secuenciación puede adaptarse para lecturas cortas, tales como Illumina o Ion Torrent, o para lecturas largas, tales como PacBio u Oxford Nanopore. Los enfoques de secuenciación incluyen la secuenciación dirigida, del exoma completo o del genoma completo. Por ejemplo, para realizar la secuenciación de todo el genoma mediante el uso de Illumina, se puede cortar el ADN (enzimáticamente o mecánicamente) a una longitud adecuada a las especificaciones de secuenciación (por ejemplo, lecturas de un solo extremo o de extremo emparejado y longitudes elegidas (150 nucleótidos, 250 nucleótidos, etc.). Después del corte, las bibliotecas se preparan mediante el uso de kits que incluyen los adaptadores adecuados para que se produzca la secuenciación. Por el contrario, cuando se usa la secuenciación de genoma completo de lectura larga, por ejemplo, PacBio y Oxford Nanopore, se recomienda una primera etapa con endonucleasa T7 para eliminar la estructura de ADN de múltiples ramas derivada del mecanismo de amplificación por desplazamiento múltiple producido por todos los métodos de MDA. De lo contrario, se siguen diferentes métodos de preparación de la biblioteca en dependencia de la plataforma de secuenciación. En los enfoques dirigidos, la PCR se usa para amplificar ciertas regiones de interés, que serán las únicas secuenciadas después.

III. Kits

En la presente descripción se proporcionan, además, kits para su uso en la realización de los métodos descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, el término "kit" se refiere a una colección de elementos destinados a usarse juntos.

Ciertos kits descritos en la presente descripción incluyen 2, 3, 4, 5, 6, 7, elementos seleccionados de: (1) una enzima de PrimPol (por ejemplo, TthPrimPol); (2) una ADN polimerasa (por ejemplo, Phi29); (3) un adaptador en horquilla monocatenario; (4) una o más enzimas para la reparación de extremos de ADNds (por ejemplo, T4 ADN polimerasa, fragmento Klenow y/o Taq polimerasa); (5) una o más enzimas para la ligazón de ADN; (6) dNTP; (7) un potenciador, por ejemplo, para aumentar la eficiencia de la ligazón de ADN, por ejemplo, polietilenglicol; (8) tampón de reacción y (9) un tampón para su uso con cualquiera de los elementos mencionados anteriormente. En particular, la invención proporciona un kit en donde el kit puede realizar RCA y MDA en una única operación, que comprende: (a) TthPrimPol; (b) una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena adecuada para la amplificación de círculo rodante (RCA) de ADN circular; (c) trifosfatos de desoxirribonucleótidos; y (d) un adaptador en horquilla monocatenario adecuado para la unión a moléculas de ADN bicatenarias lineales, en donde el adaptador comprende una secuencia cebadora XTC, en donde X es adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T). La polimerasa puede ser la polimerasa Phi29. El kit puede comprender además una o más enzimas para la reparación de extremos de ADNds, tales como la ADN polimerasa T4, el fragmento Klenow y/o la Taq polimerasa. Los kits pueden comprender contenedores para contener estos reactivos. Los kits pueden incluir contenedores para contener los reactivos. Los contenedores, por sí mismos, pueden colocarse en un contenedor de envío. El contenedor puede transmitirse por entrega manual o por un transportista común, tal como un sistema postal nacional o un servicio de entrega tal como FedEx. Los kits también pueden contener un contenedor para enviar la sangre recolectada a una instalación central, tal como una caja o una bolsa. Los kits también pueden incluir típicamente instrucciones de uso, así como también y software para el análisis e interpretación de datos.

Ejemplos

Ejemplo 1: La adición de horquilla en ambos extremos del ADN de acuerdo con la descripción permite la amplificación eficiente de moléculas de ADN cortas mediante amplificación por desplazamiento múltiple TruePrime

En la Figura 3 se muestra la amplificación de moléculas de ADN cortas (200 pb) obtenidas por amplificación por PCR. La reparación de extremos y la reacción de adición de cola de dA, y la adición de los adaptadores en horquilla permiten la amplificación eficiente de la entrada de ADN corto por TruePrime.

La presencia en el ADN 1 de un único sitio de reconocimiento de restricción para la enzima EcoRI nos permitió obtener unidades únicas del material amplificado (ver la Figura 4), lo que demuestra el mecanismo de amplificación ilustrado en la Figura 2.

Ejemplo 2: La amplificación de círculo rodante de TruePrime muestra una amplificación más específica de la molécula diana que los métodos de MDA basados en cebadores sintéticos aleatorios

En la Figura 5 se muestra la amplificación de moléculas de ADN cortas (200 pb) obtenidas por amplificación por PCR y sometidas al procedimiento de la descripción: reparación de extremos, adición de cola de dA, ligazón de adaptador en horquilla y amplificación de círculo rodante. La amplificación de círculo rodante puede llevarse a cabo tanto con TthPrimPol (TruePrime) como con cebadores sintéticos aleatorios (RP) para activar la amplificación, mediante el uso de dos muestras de ADN preparadas independientemente como sustrato (Preparación 1 y Preparación 2). El rendimiento de amplificación es mucho mayor cuando se usan cebadores aleatorios (ver la Figura 5, parte superior). Sin embargo, el análisis de la misma cantidad de ADN amplificado (500 ng) mediante digestión con enzima de restricción revela que TruePrime (basado en TthPrimPol) produce más moléculas diana (236 pb) que los cebadores aleatorios, probablemente debido a la amplificación de dímeros de cebadores, que es un inconveniente bien conocido de los métodos de MDA basados en cebadores sintéticos aleatorios.

Ejemplo 3: La adición de horquilla en ambos extremos del ADN de acuerdo con la descripción permite la amplificación eficiente de las moléculas de ADN de 50 pb hasta 1250 pb mediante amplificación por desplazamiento múltiple TruePrime

En la Figura 6 se muestra la amplificación de las moléculas de ADN que varían de 50 pb hasta 1250 pb (50, 100, 150, 200, 400, 500, 600, 700, 800 y 1250 pb) obtenidas por amplificación de PCR. La reparación de extremos y la reacción de adición de cola de dA, y la adición de los adaptadores en horquilla permiten la amplificación eficiente de las diferentes moléculas de ADN por TruePrime.

Ejemplo 4: Eficiencia de la primasa de ADN de TthPrimPol en dependencia de la secuencia de horquilla del adaptador.

En la Figura 7 se muestran los diferentes adaptadores en horquilla probados. Todos los adaptadores tienen

secuencias autocomplementarias que permiten la autohibridación de las moléculas que forman una horquilla. La secuencia y la longitud de la horquilla difieren en cada caso.

En la Figura 8 se muestra la actividad de la primasa del ADN de TthPrimPol, la enzima a cargo de sintetizar los cebadores de ADN para la ADN pol de Phi29 en TruePrime, mediante el uso de adaptadores con diferentes tamaños y secuencias de horquilla. El adaptador 1 muestra la actividad más alta, como se puede deducir de la cantidad de cebadores de ADN generados, así como también la casi completa ausencia del nucleótido marcado no incorporado (G^*), lo que resalta la eficiencia de la actividad de la primasa de ADN mediante el uso de esta molécula. Sorprendentemente, los otros tres adaptadores que contienen una secuencia de reconocimiento de TthPrimPol más accesible (3' CTCC 5')⁴⁶ muestren menos actividad, especialmente en el caso del adaptador 2. El adaptador 1 muestra la actividad más alta y la secuencia más corta, por lo que se convierte en el mejor candidato para usarse en el flujo de trabajo de amplificación de ADNcf.

Ejemplo 5: El método actual da como resultado una amplificación muy eficiente de las muestras de ADN libre circulante de pacientes con cáncer.

Se reclutaron 48 pacientes con cáncer para este estudio con consentimiento informado. Se extrajeron 10 ml de sangre mediante el uso de tubos Streck Cell-free DNA BCT®. Se aislaron inmediatamente 3 ml de plasma mediante un protocolo de centrifugación de doble giro para evitar la contaminación del ADN genómico de las células sanguíneas nucleadas. El ADN libre circulante se purificó a partir de 1 ml de muestras de plasma mediante el uso del kit de purificación de ADNcf de referencia (kit de ácido nucleico circulante QIAamp de Qiagen). Se obtuvieron diferentes rendimientos en cada caso cuantificado por Qubit (que varía de 0,12 hasta 21,6 ng/μl). El perfil de tamaño del ADN libre circulante se analizó mediante el uso del kit Bioanalyzer HS para confirmar la presencia de las moléculas de ADN libre circulante apoptótico de interés (tamaño ~160-170 pb) y la ausencia de otras moléculas de ADN más largas.

1 ng de ADNcf en cada caso siguió el flujo de trabajo de la descripción para la amplificación del ADNcf (etapas mostradas en la Figura 9, parte izquierda); es decir, que comienza con las etapas de reparación de extremos, adición de cola de dA y ligazón del adaptador 1. Después de eso, las muestras resultantes (15 μl) se amplificaron mediante el uso de la tecnología TruePrime. En la Figura 9 (parte derecha) se muestran los rendimientos de amplificación obtenidos. Todas las muestras de ADN libre circulante se amplificaron eficientemente.

Ejemplo 6: El método actual da como resultado una amplificación muy sensible de las muestras de ADN libre circulante de pacientes con cáncer.

En la Figura 10 se muestran la excelente sensibilidad y eficiencia del flujo de trabajo de la descripción, que logra rendimientos de amplificación de ADN en el intervalo de microgramos a partir de picogramos de ADN libre circulante. Es notable la proporcionalidad entre la cantidad de entrada y el rendimiento de amplificación observado.

Ejemplo 7: La secuenciación de genoma completo de lectura corta (Illumina) y de lectura larga (Oxford Nanopore MinION) confirma la viabilidad y eficiencia del flujo de trabajo del método para la amplificación del ADN libre circulante apoptótico.

Para la amplificación de ADNcf por duplicado se sometieron al flujo de trabajo de la descripción 4 ng de ADN libre circulante de un paciente con cáncer de colon (T3N1aM0).

Secuenciación del genoma completo de lectura larga (Oxford Nanopore MinION): 1500 ng de cada ADN libre circulante amplificado se trataron previamente con endonucleasa I de T7 antes de preparar la biblioteca para eliminar la estructura de ADN ramificada múltiple. Se usó el kit de secuenciación de ID de ligazón SQK-LSK108 y se siguió el protocolo de ID de secuenciación de ADN genómico para el dispositivo MinION mediante el uso de SQK-LSK 108. La celda de flujo se hizo funcionar durante 48 horas.

Las secuencias de la ejecución de Oxford Nanopore MinION se analizaron y probaron para determinar la aparición de la secuencia del adaptador en horquilla [SEQ ID NO:1]. Aunque la calidad de la secuenciación no fue alta, la secuencia del adaptador en horquilla [SEQ ID NO:1] podría encontrarse en casi cada lectura y fragmentos de secuencia separados con una alta similitud (probada por BLAST de esos fragmentos, que tenían la misma región genética que el acierto).

En la Figura 11 se muestra la alta correlación de fragmentos separados por la secuencia del adaptador en horquilla [SEQ ID NO:1] con respecto a la longitud de la lectura de MinION.

Secuenciación de genoma completo de lectura corta (Illumina): se trituraron 1000 ng de cada ADN libre amplificado con Covaris para obtener fragmentos de 500 pb. El ADN cortado se purificó mediante el uso de perlas AMPure y la biblioteca se preparó mediante el uso del kit de biblioteca de ADN bajo NxSeq AmpFREE (Lucigen). Se añadieron índices dobles mediante PCR y las muestras se secuenciaron en un Illumina HiSeq 2500 mediante el uso de lecturas de extremos emparejados (2 x 150 pb).

En la Figura 12 se muestran los resultados de detección de cobertura y variante de número de copia (CNV). La cobertura de dos muestras del mismo paciente parece casi idéntica y muy uniforme, al igual que el gráfico de CNV, en el que, excepto por las partes únicas, ambas muestras tienen una composición idéntica de cromosomas. Las lecturas se analizaron mediante CLC Genomics Workbench, se combinaron en una lectura y luego se separaron nuevamente en la posición de la horquilla. La secuencia de horquilla podría encontrarse en casi todas las lecturas combinadas. Las lecturas apareadas separadas nuevamente y creadas artificialmente se alinearon con el genoma humano y se analizaron para obtener las estadísticas de cobertura, la reproducibilidad y el contenido de CNV.

En la Figura 13 se muestra el gráfico de cobertura de las dos muestras de un paciente en diferentes resoluciones. Es notable la amplificación casi idéntica y los resultados del proceso posterior a la secuenciación.

Ejemplo 8: La secuenciación de amplicones confirma la viabilidad y eficiencia del flujo de trabajo del método para la amplificación de ADN libre circulante apoptótico.

26, 7, 84 y 150 ng de ADN libre circulante de tres pacientes diferentes con cáncer de colon (T3/4) se sometieron al flujo de trabajo de descripción para la amplificación de ADNcf, obteniendo 15, 17 y 20 µg respectivamente. Se secuenciaron 20 ng del ADNcf no amplificado y 50 ng del ADNcf amplificado de cada paciente mediante el uso del Ensayo de ADNcf del colon Oncomine™ con códigos de barras moleculares de etiqueta para el multiplexado en un sistema de secuenciación Ion Proton™, mediante el uso de un chip Ion Proton™. Las bibliotecas se prepararon mediante el uso del sistema Ion Chef™. La alineación de la lectura se llevó a cabo mediante el uso del software Torrent Suite y el llamado de variantes se realizó mediante el uso del software CLC con la siguiente configuración: Pliodía = 2. Ignorar posiciones con cobertura por encima=1 000 000. Restringir la asignación a las regiones diana = Oncomine_Colon_cfDNA.03062017. Designed_BED. Ignorar pares rotos = Núm. Ignorar coincidencias no específicas = Lecturas. Cobertura mínima = 10. Recuento mínimo = 2. Frecuencia mínima (%) = 1,0-35,0. Filtro de calidad base = núm. Filtro de dirección de lectura = núm. Filtro de dirección de lectura relativa = núm. Filtro de posición de lectura = núm. Eliminar variantes de error de pirólisis = núm. Crear pista = sí. Crear tabla anotada = Núm.

Se llevó a cabo la identificación de variantes para variantes de un solo nucleótido, variantes de múltiples nucleótidos, inserciones y eliminaciones con diferentes frecuencias, del 35 % al 1 %. En la Figura 14 se muestra el número de variantes anotadas y no anotadas detectadas en cada paciente al comparar las muestras de ADNcf amplificadas y no amplificadas en cada caso.

En los tres casos, se detectaron más variantes en la muestra amplificada que en la muestra no amplificada, independientemente del umbral de frecuencia del alelo de la mutación. Adicionalmente, el número de variantes anotadas también es mayor en las muestras amplificadas que en las no amplificadas.

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos para el primer paciente y el mayor número de variantes clínicamente relevantes en la muestra amplificada en comparación con la muestra de ADNcf no amplificada del mismo paciente a dos frecuencias de alelos diferentes (1 % y 35 %). Para la frecuencia del 1 %, se detectan 30 mutaciones clínicamente relevantes (ClinVar) en la muestra amplificada, mientras que solo 14 en la no amplificada. De esos 14, 10 también se detectan en la muestra amplificada. Para la frecuencia del 35 %, se detectan 3 mutaciones ClinVar en la muestra no amplificada. Esas 3 y 2 mutaciones ClinVar adicionales se encuentran en el material amplificado.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos para el segundo paciente y el mayor número de variantes clínicamente relevantes en la muestra amplificada en comparación con la muestra de ADNcf no amplificada del mismo paciente a dos frecuencias de alelos diferentes (1 % y 35 %). Para la frecuencia del 1 %, se detectan 31 mutaciones ClinVar en la muestra amplificada, mientras que solo 13 en la no amplificada. De esos 13, 10 también se cubren en la muestra amplificada.

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos para el tercer paciente y el mayor número de variantes clínicamente relevantes en la muestra amplificada en comparación con la muestra de ADNcf no amplificada del mismo paciente a dos frecuencias de alelos diferentes (1 % y 35 %). Para la frecuencia del 1 %, se detectan 26 mutaciones ClinVar en la muestra amplificada, mientras que solo 16 en la muestra no amplificada. De esos 16, 13 también se cubren en la muestra amplificada.

Por lo tanto, el uso del procedimiento de la descripción antes de la secuenciación del amplicón aumenta la sensibilidad del análisis, lo que permite la detección de más variantes clínicamente relevantes.

Referencias

- www.cancer.gov-targeted-therapies. 2016. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013, 10(8): 472-484.

3. Speicher MR, Pantel K. Tumor signatures in the blood. *Nat Biotechnol* 2014, 32(5): 441- 443.
4. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011, 11(6): 426-437.
5. Enderle D, Spiel A, Coticchia CM, Berghoff E, Mueller R, Schlumpberger M, y otros Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. *PLoS One* 2015, 10(8): e0136133.
10. Jia S, Zocco D, Samuels ML, Chou MF, Chammas R, Skog J, y otros Emerging technologies in extracellular vesicle-based molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2014, 14(3): 307-321.
10. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, y otros Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008, 10(12): 1470-1476.
15. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, y otros Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015, 372(17): 1589-1597.
15. Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, y otros Clinical performance of non- invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn* 2015.
20. Wagner AJ, Mitchell ME, Tomita-Mitchell A. Use of cell-free fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal screening. *Clin Perinatal* 2014, 41(4): 957-966.
20. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, y otros DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014, 370(9): 799-808.
25. Cuckle H, Benn P, Pergament E. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy as a clinical service. *Clin Biochem* 2015, 48(15): 932-941.
25. Robinson C, van den Boom D, Bombard AT. Noninvasive prenatal detection of aneuploidy. *Clin Obstet Gynecol* 2014, 57(1): 210-225.
30. 14. Syngelaki A, Pergament E, Homfray T, Akolekar R, Nicolaides KH. Replacing the combined test by cell-free DNA testing in screening for trisomies 21, 18 and 13: impact on the diagnosis of other chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther* 2014, 35(3): 174-184.
30. 15. Wax JR, Chard R, Litton C, Pinette MG. Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. *Am J Obstet Gynecol* 2015.
35. 16. De Vlaminck I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C, y otros Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci US A* 2015.
35. 17. De Vlaminck I, Valentine HA, Snyder TM, Strehl C, Cohen G, Luikart H, y otros Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med* 2014, 6(241): 241ra277.
40. 18. Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, Del Favero J, Bosmans JL, Claas FH, y otros Cell-free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. *Am J Transplant* 2015, 15(10): 2541-2551.
40. 19. Snyder TM, Khush KK, Valentine HA, Quake SR. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci US A* 2011, 108(15): 6229- 6234.
45. 20. Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, y otros Donor Derived Cell-free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transpl Proc* 2015, 47(8): 2400-2403.
45. 21. Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell free DNA in Cancers. *Mol Diagn Ther* 2015, 19(6): 339-350.
50. 22. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, y otros Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008, 14(9): 985-990.
50. 23. Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biol* 2014, 15(8): 449.
55. 24. Siravegna G, Bardelli A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Mo/Onco/2015*.
55. 25. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, y otros Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014, 20(4): 430-435.
60. 26. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Cell-free DNA for diagnosing myocardial infarction: not ready for prime time. *Clin Chem Lab Med* 2015.
60. 27. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, y otros Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014, 6(224):224ra224.
65. 28. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, y otros Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013, 368(13): 1199-1209.
65. 29. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, Kamal M, Blin A, Leroy Q, y otros Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mo/Oneal* 2015, 9(4): 783-790.
65. 30. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, y otros Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One* 2014, 9(3): e87838.
65. 31. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods* 2006, 3(2): 95-97.
65. 32. Butler TM, Johnson-Camacho K, Peto M, Wang NJ, Macey TA, Korkola JE, y otros Exome Sequencing of Cell-free DNA from Metastatic Cancer Patients Identifies Clinically Actionable Mutations Distinct from Primary Disease. *PLoS One* 2015, 10(8): e0136407.

33. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, y otros Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013, 497(7447): 108-112.
34. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, y otros An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014, 20(5): 548- 554.
- 5 35. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CK, Nuciforo P, y otros Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol* 2014, 25(9): 1729-1735.
- 10 36. Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, y otros Detection of tumor- derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci US A* 2015, 112(31): 9704-9709.
- 15 37. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, y otros Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012, 4(136): 136ra168.
- 20 38. Kinde I, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. FAST-SeqS: a simple and efficient method for the detection of aneuploidy by massively parallel sequencing. *PLoS One* 2012, 7(7): e41162.
- 25 39. Belie J, Koch M, Ulz P, Auer M, Gerhalter T, Mohan S, y otros Rapid Identification of Plasma DNA Samples with Increased ctDNA Levels by a Modified FAST-SeqS Approach. *Clin Chem* 2015, 61(6): 838-849.
- 30 40. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roeber J, Christie M, y otros Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2015, 26(8): 1715-1722.
- 35 41. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006, 3(7): 551-559.
- 40 42. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci US A* 2003, 100(15): 8817-8822.
- 45 43. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, y otros Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 2009, 27(9): 858- 863.
- 50 44. Tabernero J, Lenz H-J, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, y otros Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *The Lancet Oncology* 2015, 16(8): 937- 948.
- 55 45. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, y otros The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012, 486(7404): 537-540.
- 60 46. Picher AJ, Budeus B, Wafzig O, Kruger C, Garcia-Gomez S, Martinez-Jimenez MI, Dfaz-Talavera A, Weber D, Blanco L & Schneider A. TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimpol. *Nat Comm* 2016, Nov 29; 7:13296
- 65 47. Kandoth C, McLellan MD, Vandine F, Ye K, Niu B, Lu C, y otros Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013, 502(7471): 333-339.
- 70 48. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, y otros The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 2004, 91(2): 355-358.
- 75 49. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutsikakis H, y otros COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 2015, 43(Emisión de base de datos): D805-811.
- 80 50. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, y otros A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010, 7(4): 248-249.
- 85 51. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009, 4(7): 1073-1081.
- 90 52. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001, 11(5):863-874.
- 95 53. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003, 31(13): 3812-3814.
- 100 54. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 2012, 40(Emisión del servidor web): W452-457.
- 105 55. WO 2014/140309, "Methods for amplification and sequencing using thermostable TthPrimpol", 14 de septiembre de 2018. WO 2011/047307A 1, "Multiple Displacement Amplification", abril 21, 2011.

Como se usa en la presente descripción, los siguientes significados se aplican a menos que se especifique de cualquier otra manera. La palabra "puede" se usa en un sentido permisivo (es decir, que significa que tiene el potencial de), en lugar de un sentido obligatorio (es decir, que significa debe). Las palabras "incluyen", "que incluye" y "incluye" y similares significan que incluyen, pero no se limitan a. Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un elemento" incluye una combinación de dos o más elementos, a pesar del uso de otros términos y frases para uno o más elementos, tales como "uno o más". El término "o" es, a menos que se indique de cualquier otra manera, no exclusivo, es decir, que abarca tanto "y" como "o". El término "cualquiera de" entre un modificador y una secuencia significa que el modificador modifica cada miembro de la secuencia. Así, por ejemplo, la frase "al menos cualquiera de 1, 2 o 3" significa "al menos 1, al menos 2 o al menos 3".

Debe entenderse que la descripción y los dibujos no pretenden limitar la invención a la forma particular descrita. Los encabezados usados en la presente descripción son solo para propósitos organizativos y no están destinados a limitar el alcance de la descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar ADN que comprende:
 - a) proporcionar moléculas de ADN bicatenarias lineales;
 - b) unir adaptadores monocatenarios que comprenden una secuencia cebadora XTC, en donde X es adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T), a ambos extremos de las moléculas de ADN bicatenarias lineales para producir moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, que comprenden secuencias internas complementarias, en donde la secuencia cebadora XTC se ubica en la porción no complementaria de los adaptadores; y
 - c) amplificar las moléculas de ADN monocatenarias cerradas covalentemente, en una única operación mediante (i) amplificación de círculo rodante mediante el uso de una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena y (ii) amplificación por desplazamiento múltiple mediante el uso de TthPrimPol.

2. El método de la reivindicación 1, en donde las moléculas de ADN bicatenarias lineales comprenden moléculas de ADN libre circulante apoptótico, por ejemplo, que tienen tamaños de menos de 480 pb, menos de 320 pb, o entre aproximadamente 140 pb y 180 pb (por ejemplo, con un promedio de aproximadamente 160 pb).

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ADN bicatenario lineal se deriva de uno o más fluidos corporales de mamíferos, por ejemplo, seleccionados de CSF, sangre, plasma, suero, ascitis, orina, saliva, lágrimas, leche, semen y líquido sinovial.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde proporcionar el ADN bicatenario lineal comprende reparación de extremos y/o adición de cola de dA.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los adaptadores tienen una estructura en horquilla.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende unir adaptadores que tienen la siguiente secuencia: 5'TAACATTGTTGGCCACTCAGGCCAACAAATGTTAT3' [SEQ ID NO:1].

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde unir los adaptadores comprende ligazón de extremos romos o ligazón de extremos cohesivos.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las moléculas de ADN bicatenarias lineales tienen un tamaño que varía de 50 pb a 1250 pb.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende: proporcionar moléculas de ADN libre circulante apoptótico;
 - realizar la reparación de extremos y la adición de cola de dA de las moléculas de ADN libre circulante;
 - y
 - ligar adaptadores en horquilla que comprenden un saliente de dT a las moléculas de ADN libre circulante con extremos reparados y cola de dA añadida.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la amplificación comprende la extensión de la cadena mediante el uso de la polimerasa Phi29.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la amplificación por desplazamiento múltiple se realiza sin la adición de cebadores sintéticos.

12. Un kit para amplificar el ADN en donde el kit puede realizar RCA y MDA en una única operación, el kit comprende:
 - (a) TthPrimPol;
 - (b) una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena adecuada para la amplificación de círculo rodante (RCA) de ADN circular;
 - (c) trifosfatos de desoxirribonucleótidos; y
 - (d) un adaptador en horquilla monocatenario adecuado para la unión a las moléculas de ADN bicatenarias lineales, en donde el adaptador comprende una secuencia cebadora XTC, en donde X es adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T), y en donde la secuencia cebadora XTC se ubica en la porción no complementaria del adaptador.

13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la polimerasa es la polimerasa Phi29.

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, que comprende además una o más enzimas para la reparación de extremos de ADNds, tal como la ADN polimerasa T4, el fragmento Klenow y/o la Taq polimerasa.

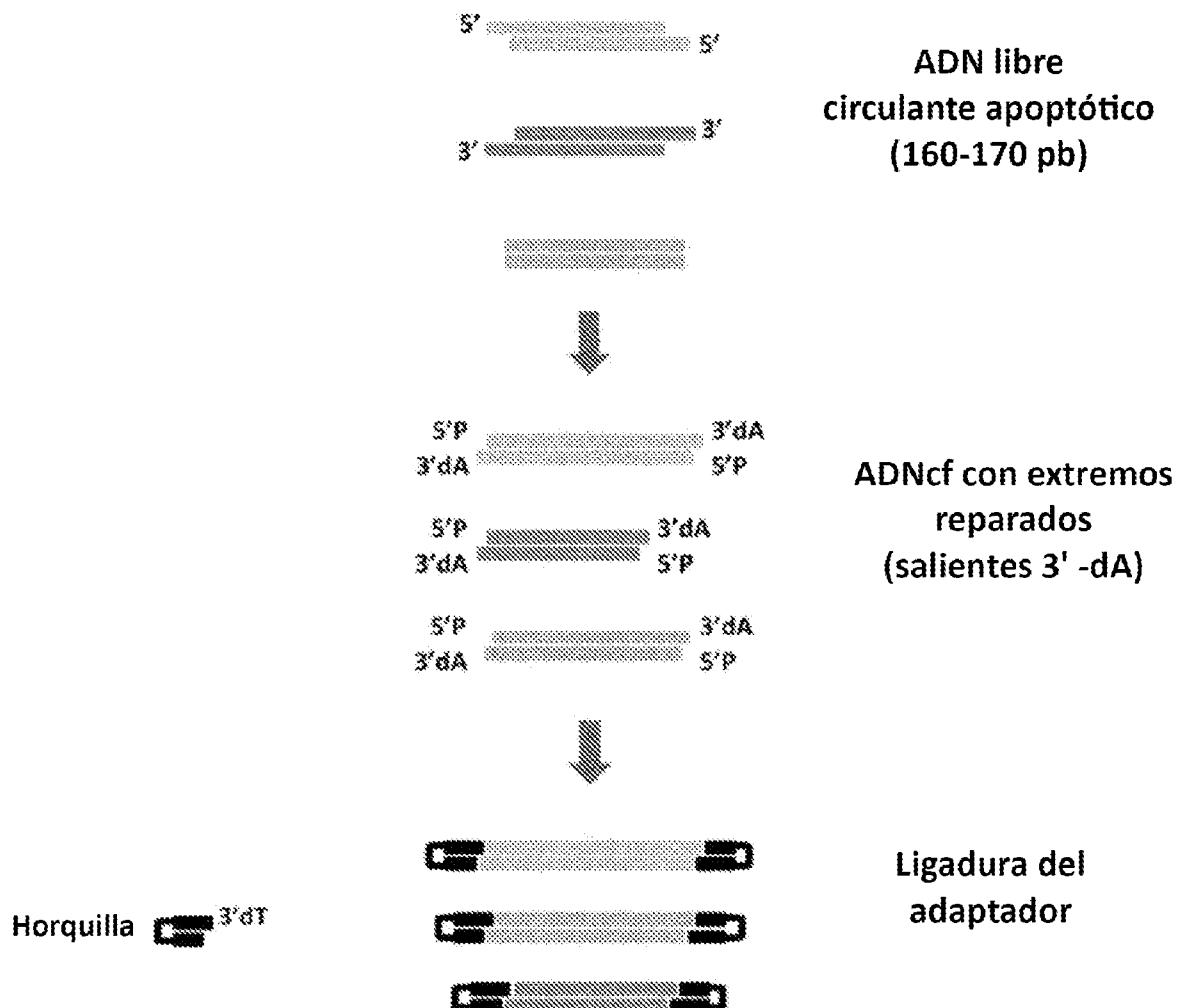


Figura 1

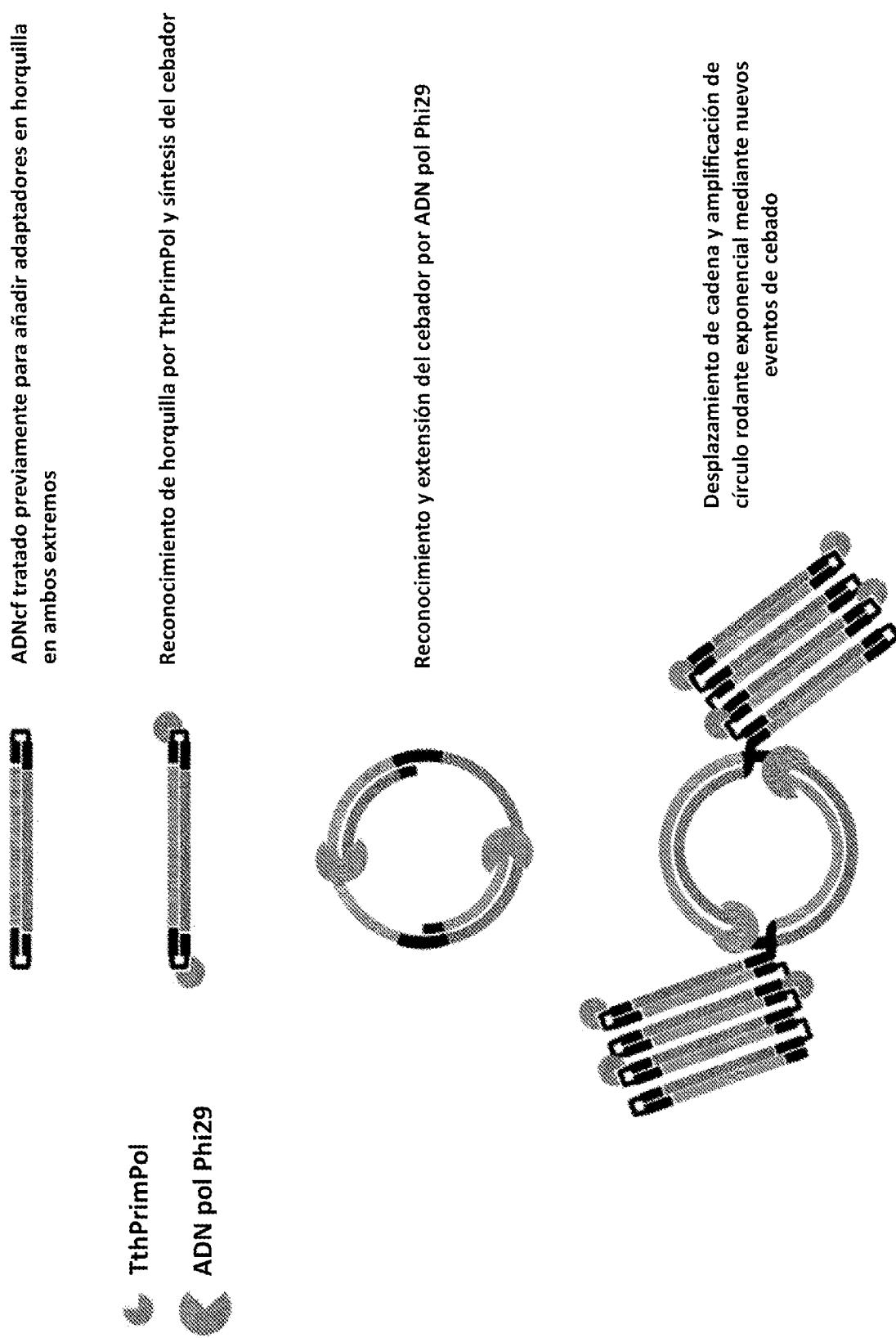


Figura 2

Amplificación de ADN de fragmentos de ADN cortos debido
a la adición de adaptadores en horquilla

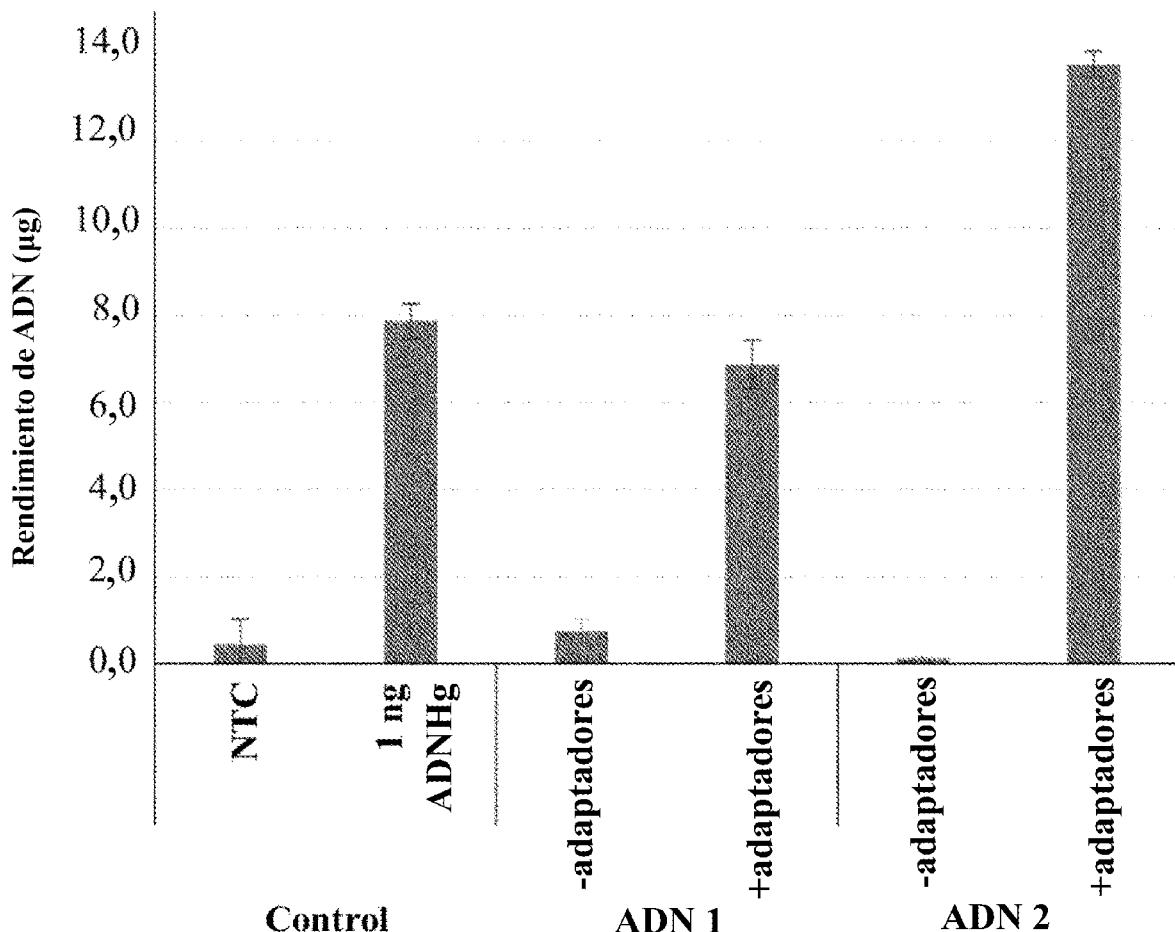


Figura 3

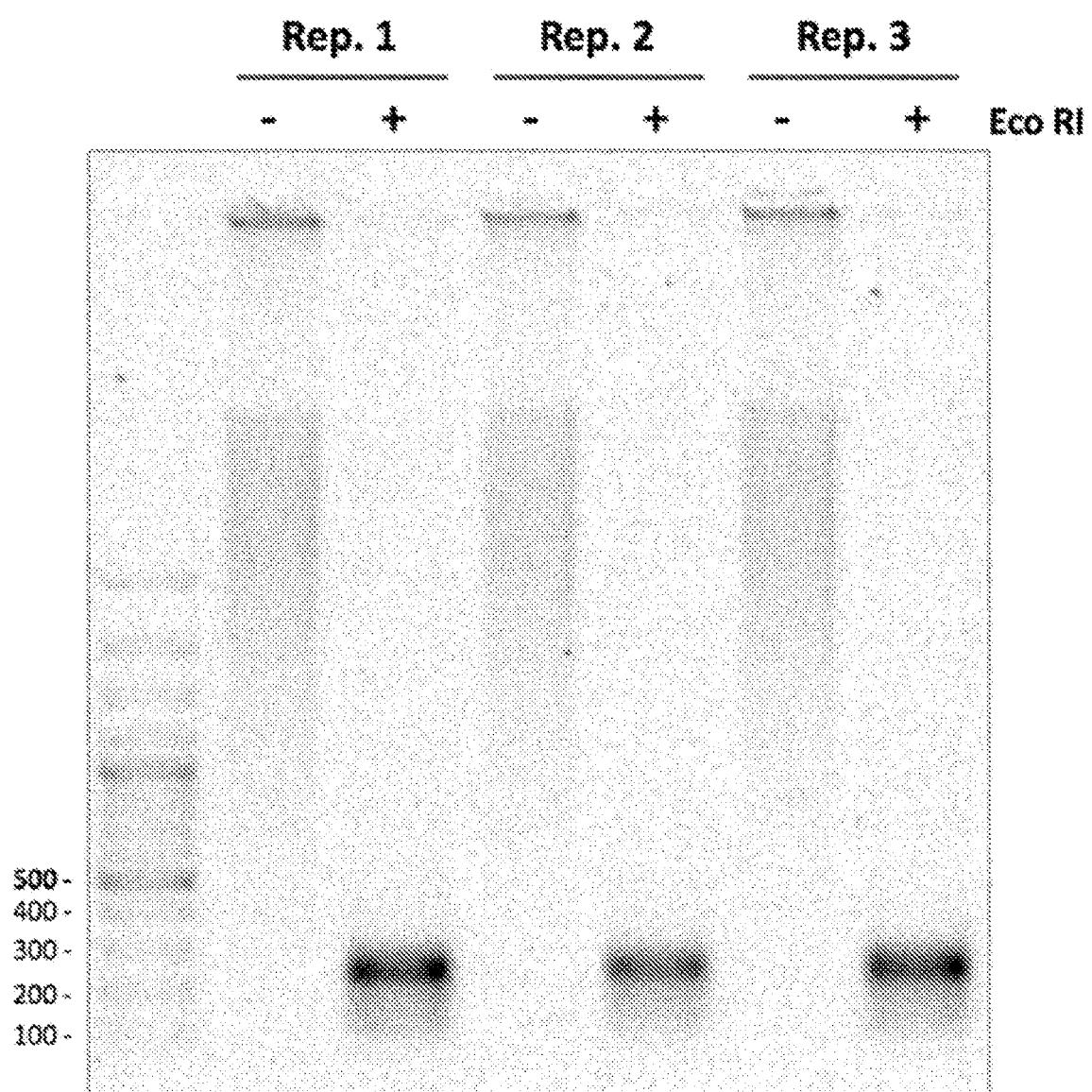


Figura 4

ES 2 993 028 T3

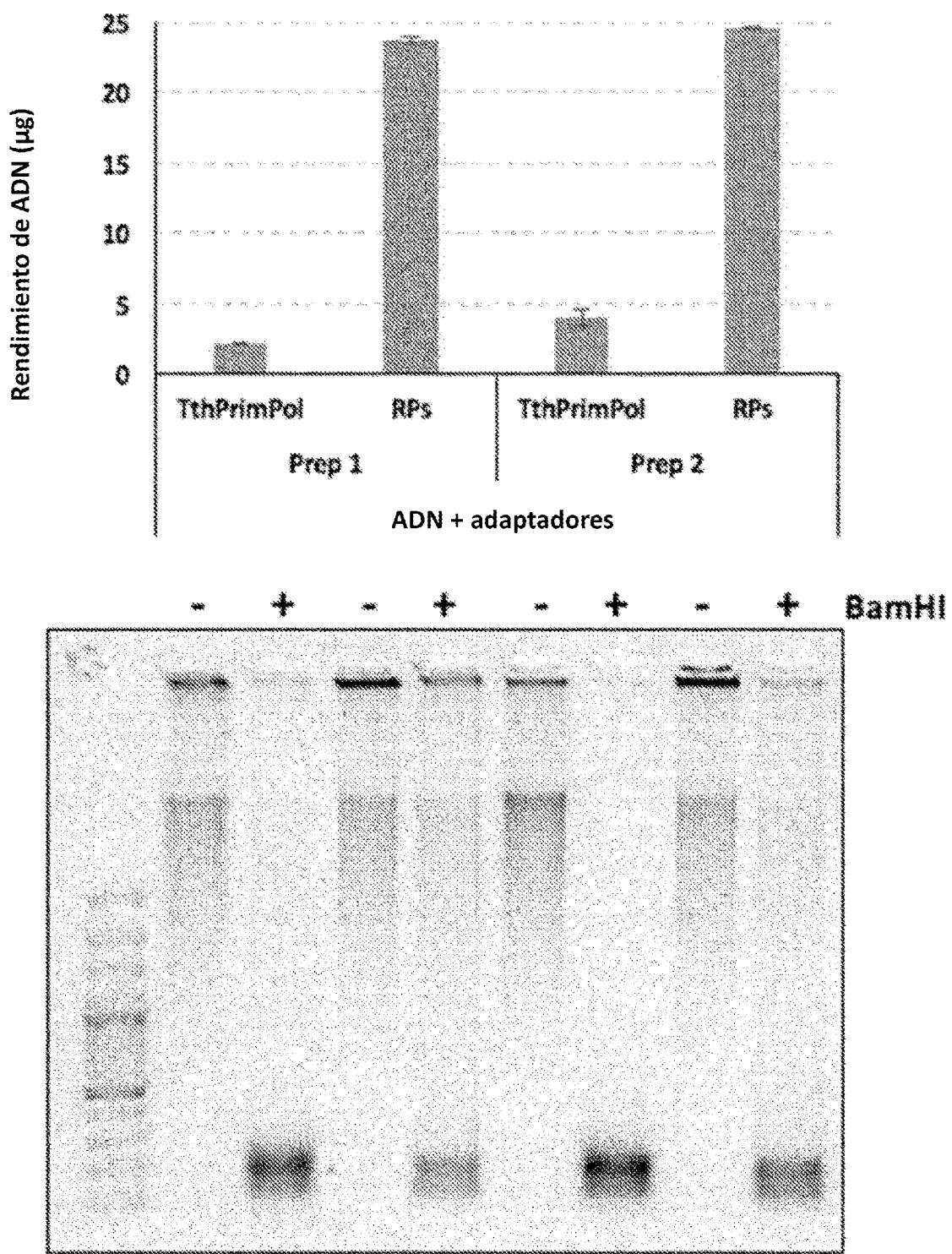


Figura 5

Eficiencia de amplificación en dependencia de la longitud del fragmento de ADN

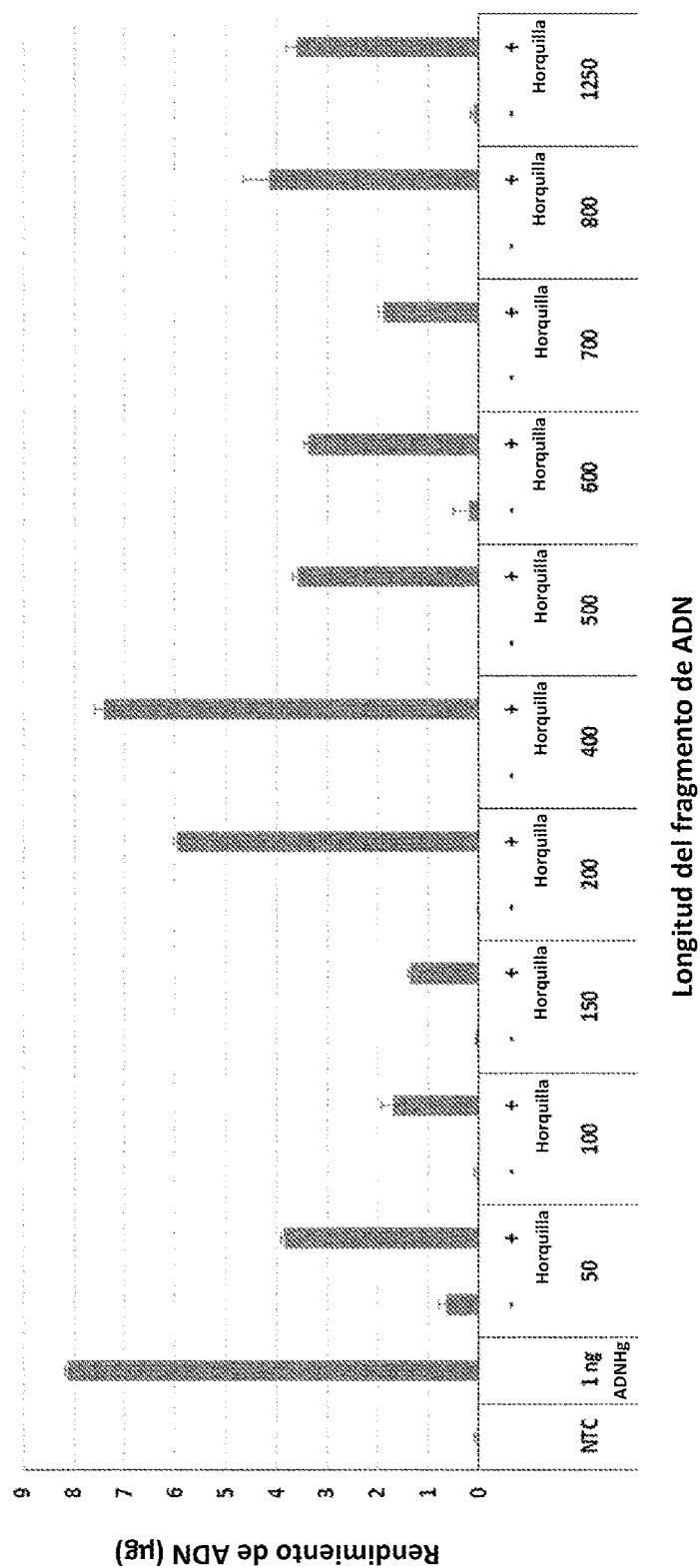


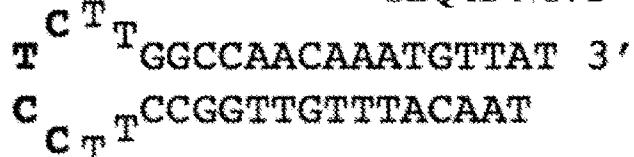
Figura 6

Adaptadores probados**Adaptador 1**

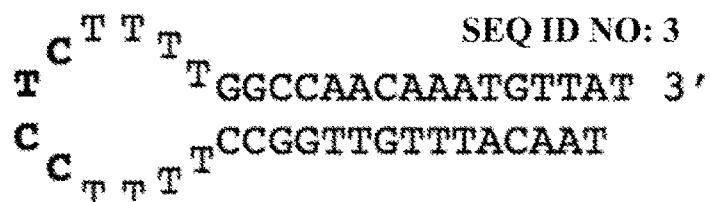
SEQ ID NO: 1

**Adaptador 2**

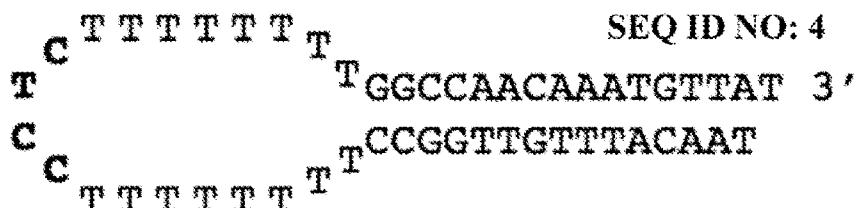
SEQ ID NO: 2

**Adaptador 3**

SEQ ID NO: 3

**Adaptador 4**

SEQ ID NO: 4

**Figura 7**

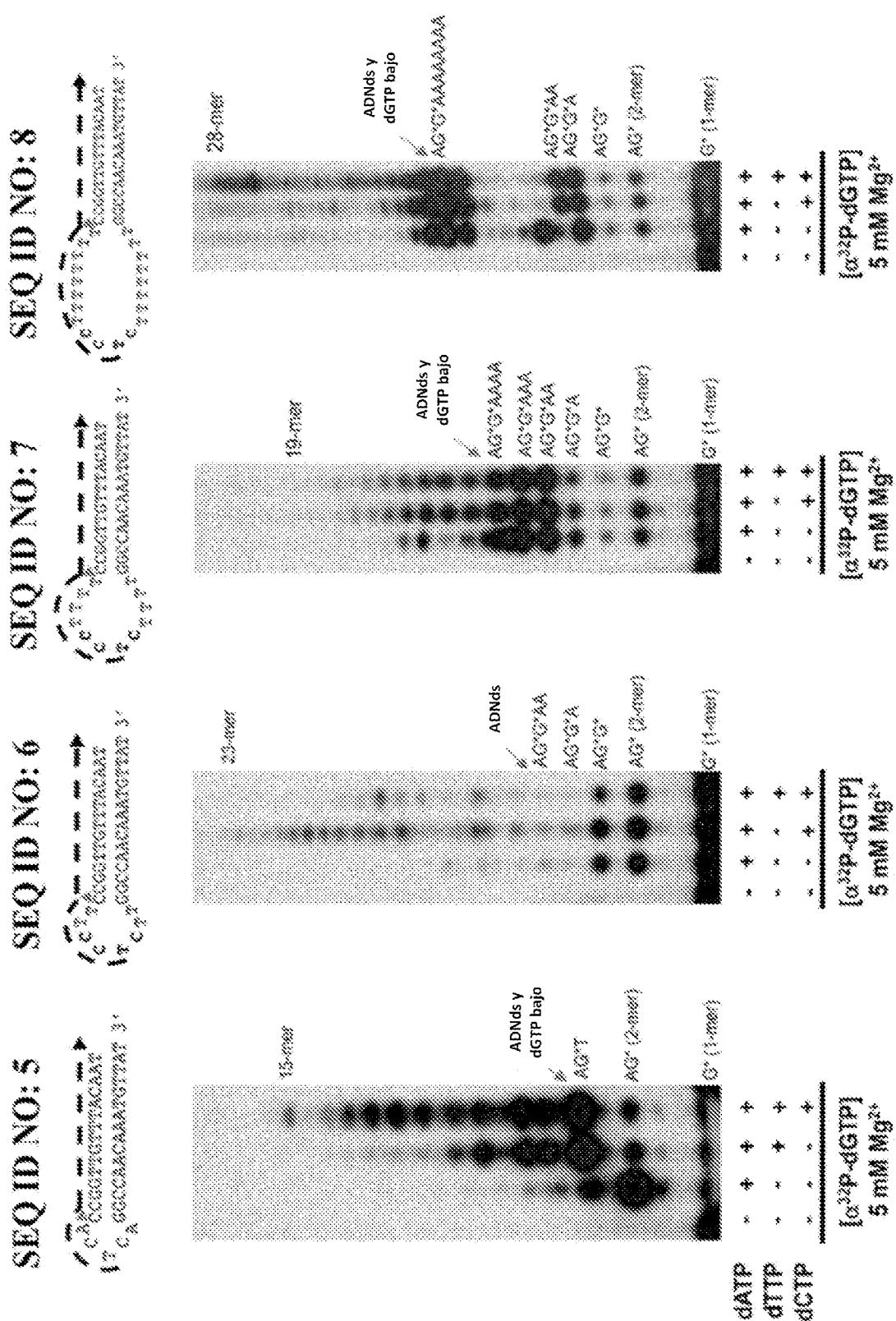


Figura 8

- Protocolo:**
1. Reparación de extremos + reacción de adición de cola de dA:
 - 30' 20 °C y 30' 65 °C
 - Volumen de muestra: 50 µl
 - Volumen de reacción: 60 µl

Rendimientos de amplificación de ADN obtenidos a partir de 1 ng de ADN libre circulante

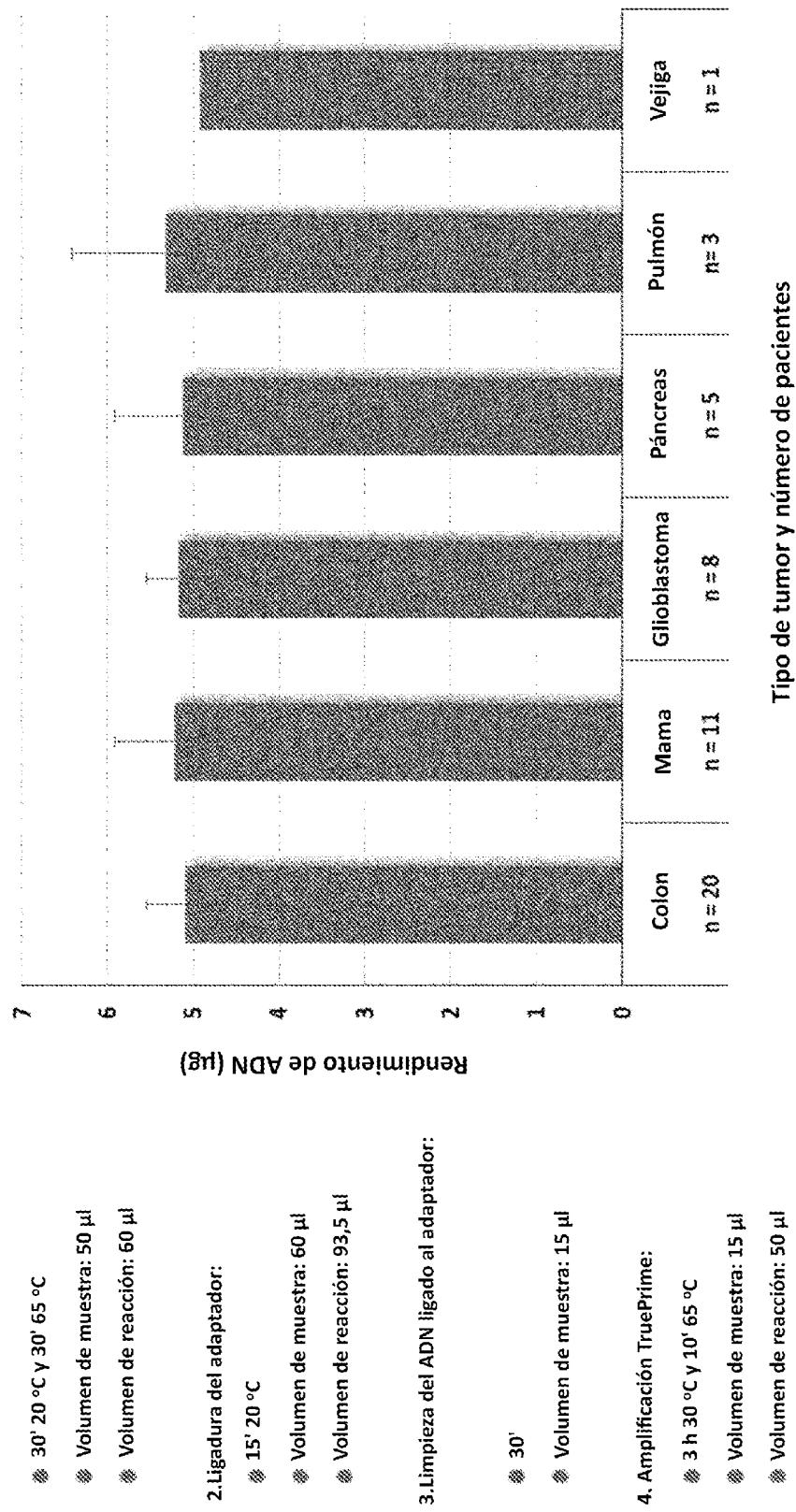


Figura 9

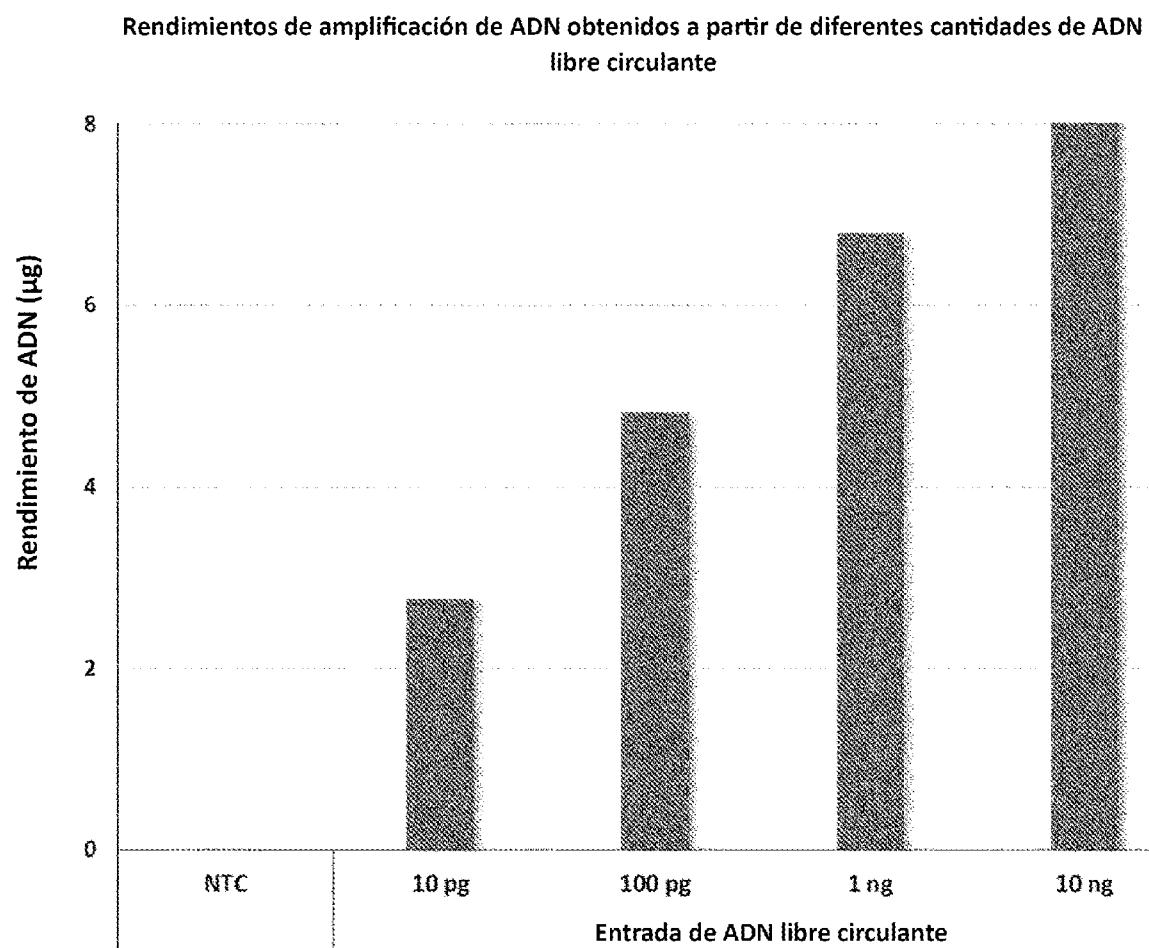


Figura 10

ES 2 993 028 T3

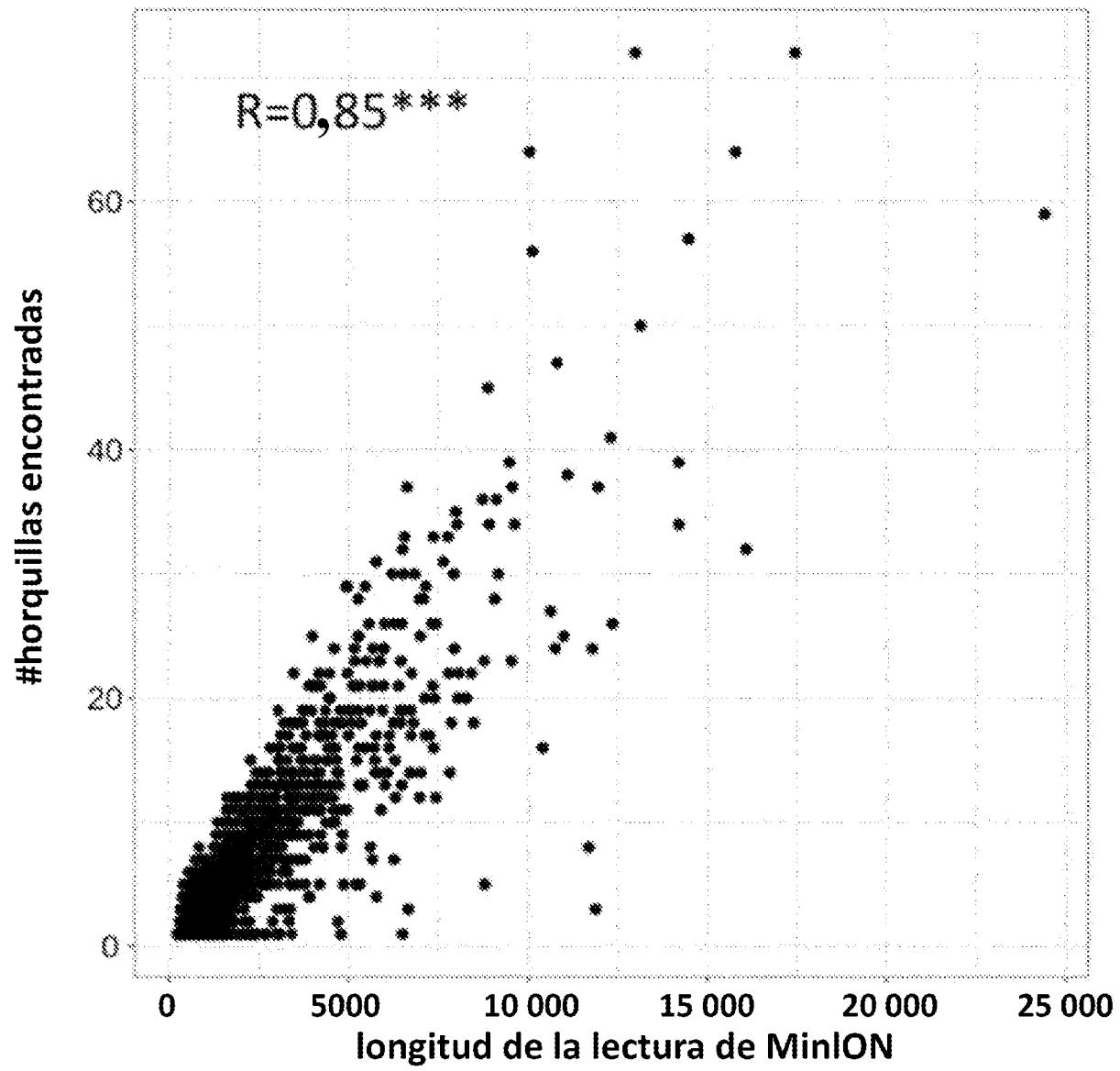


Figura 11

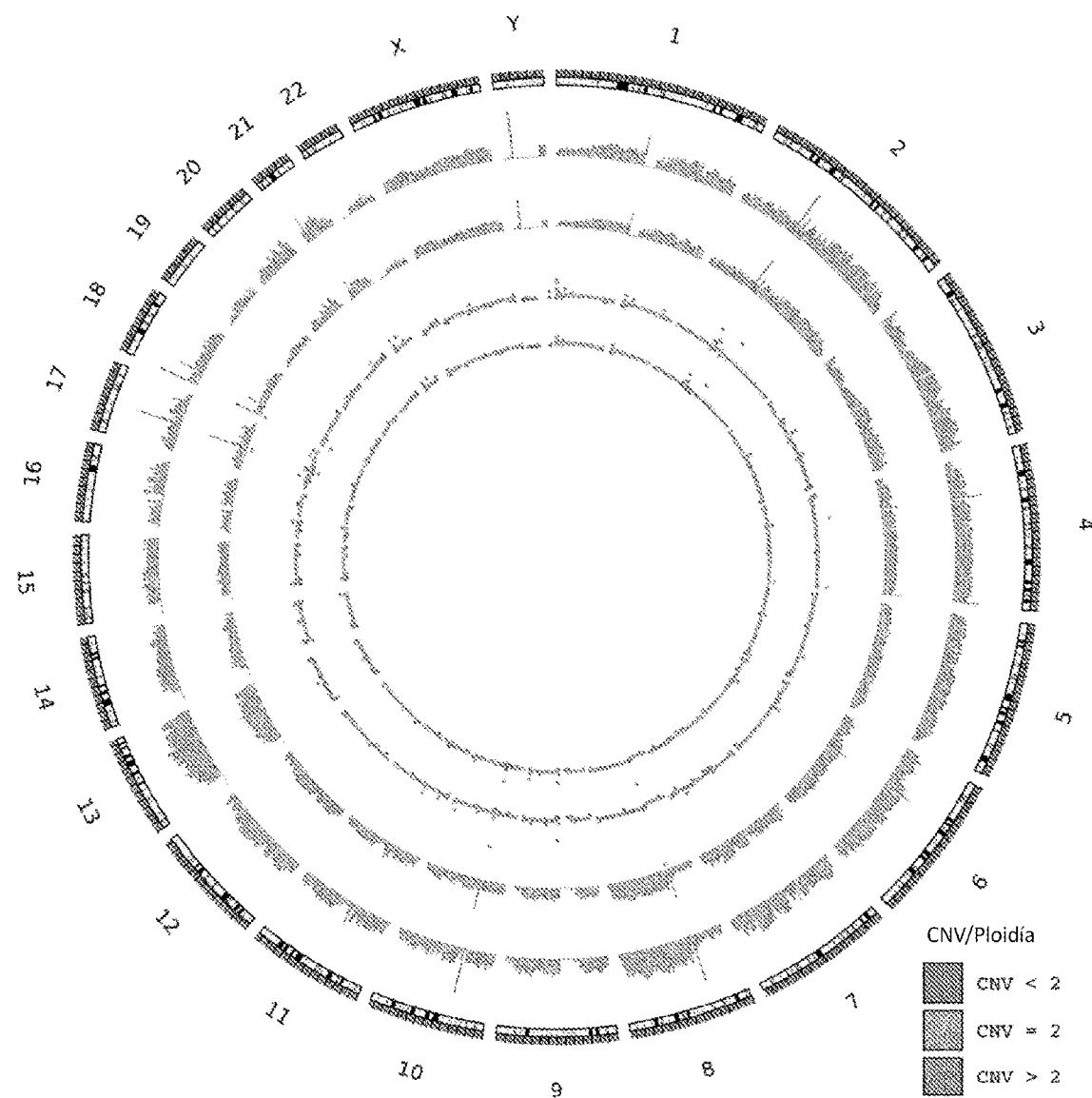


Figura 12

5

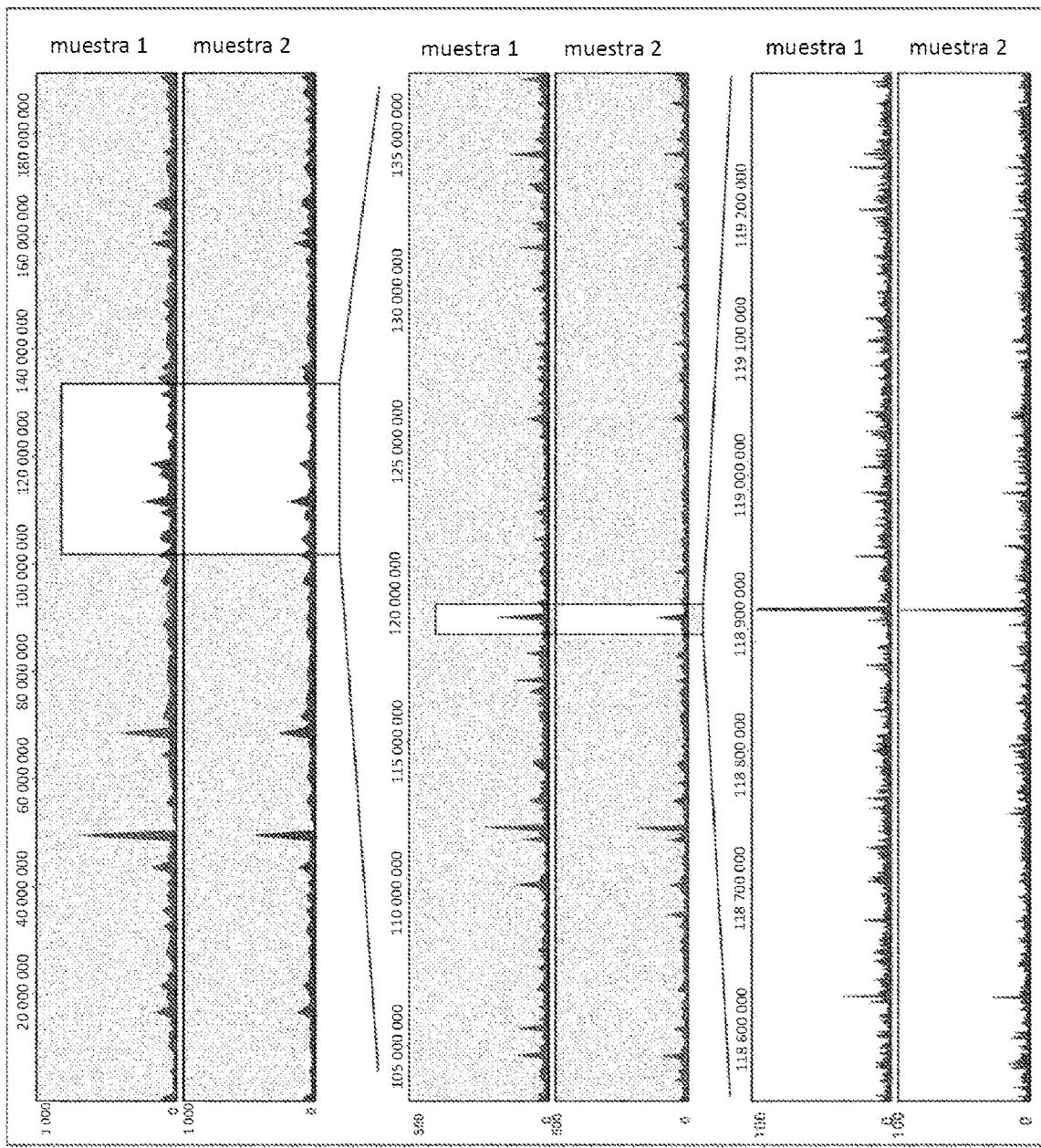


Figura 13

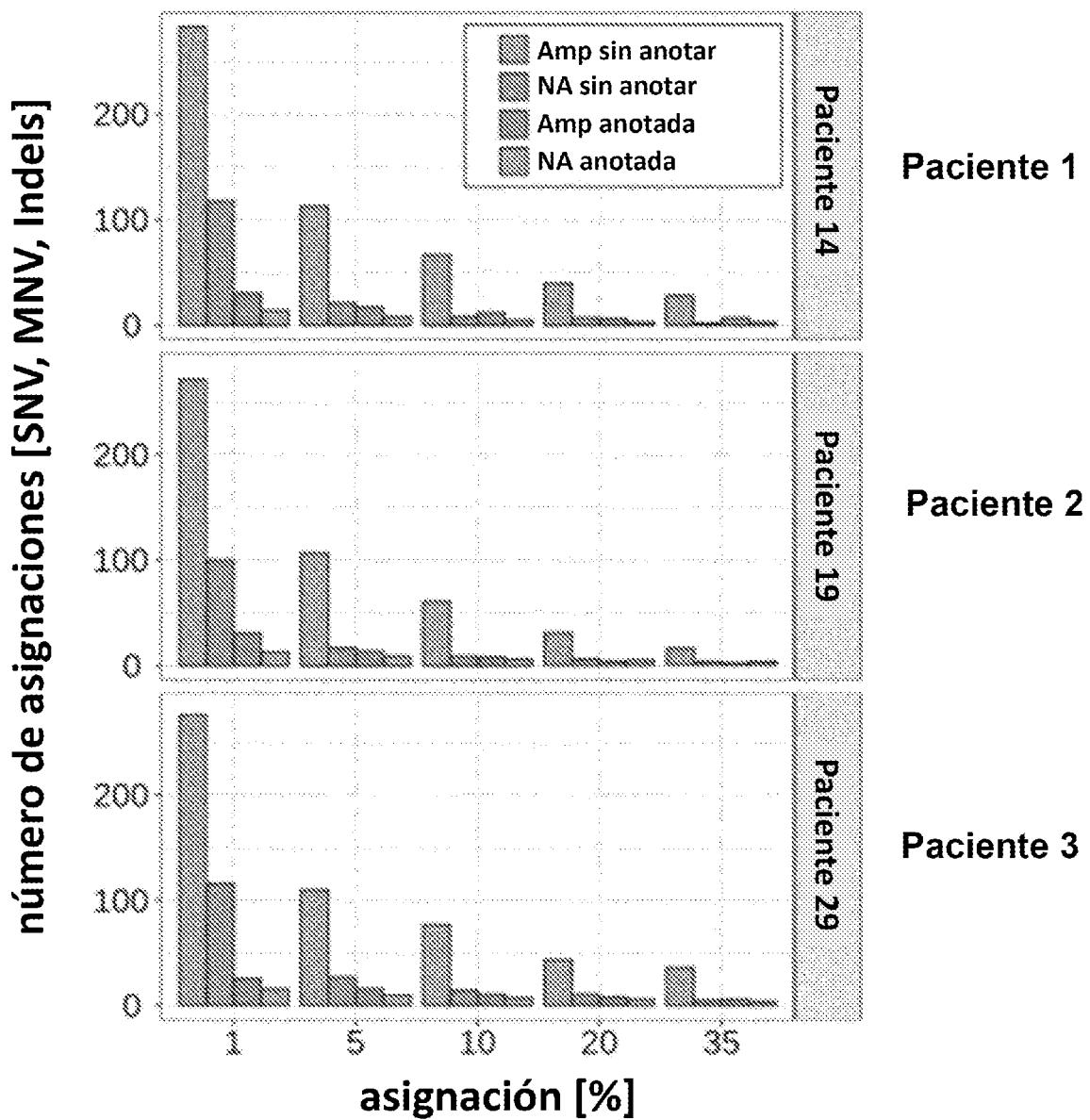
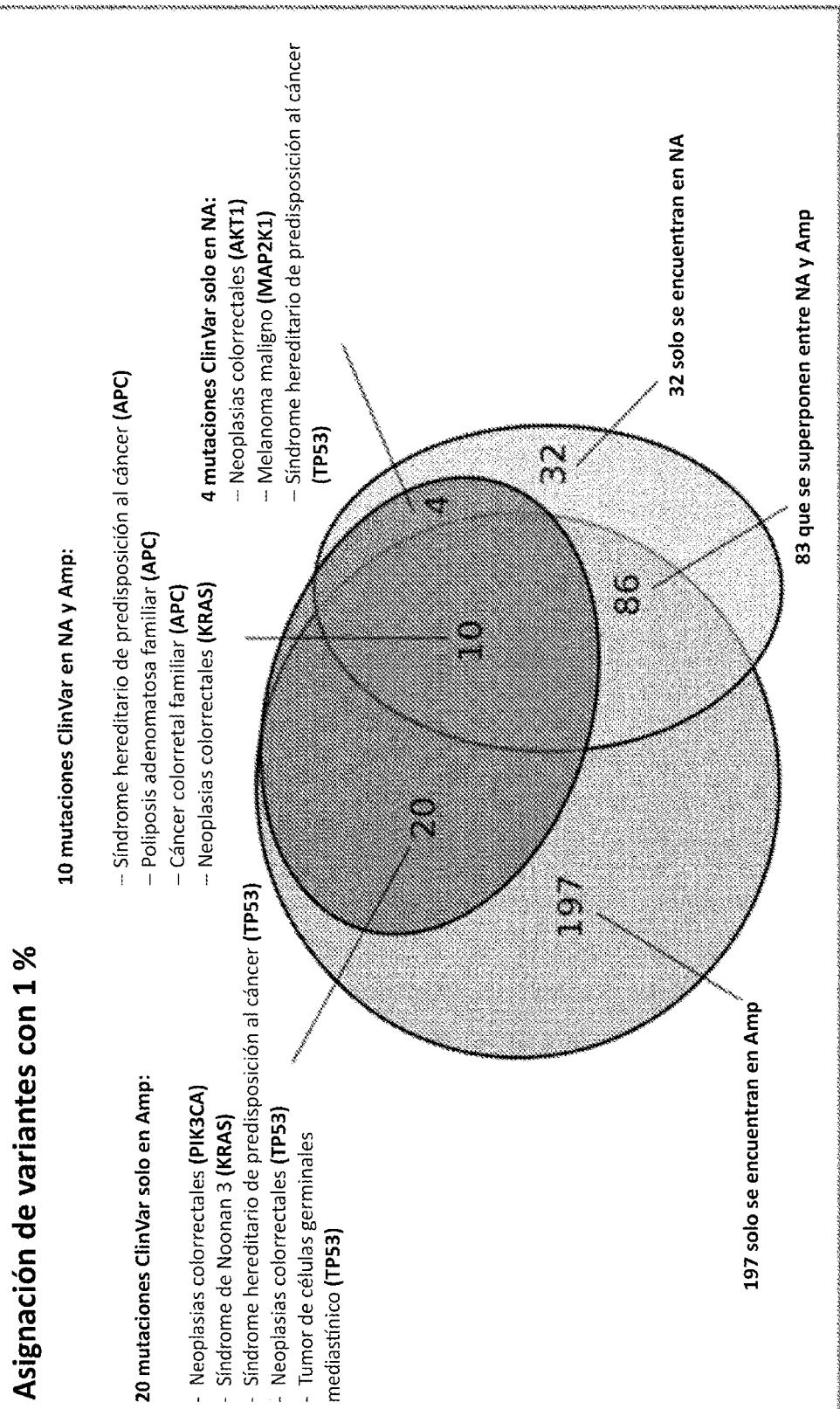


Figura 14

**Figura 15**

Asignación de variantes con 35 %

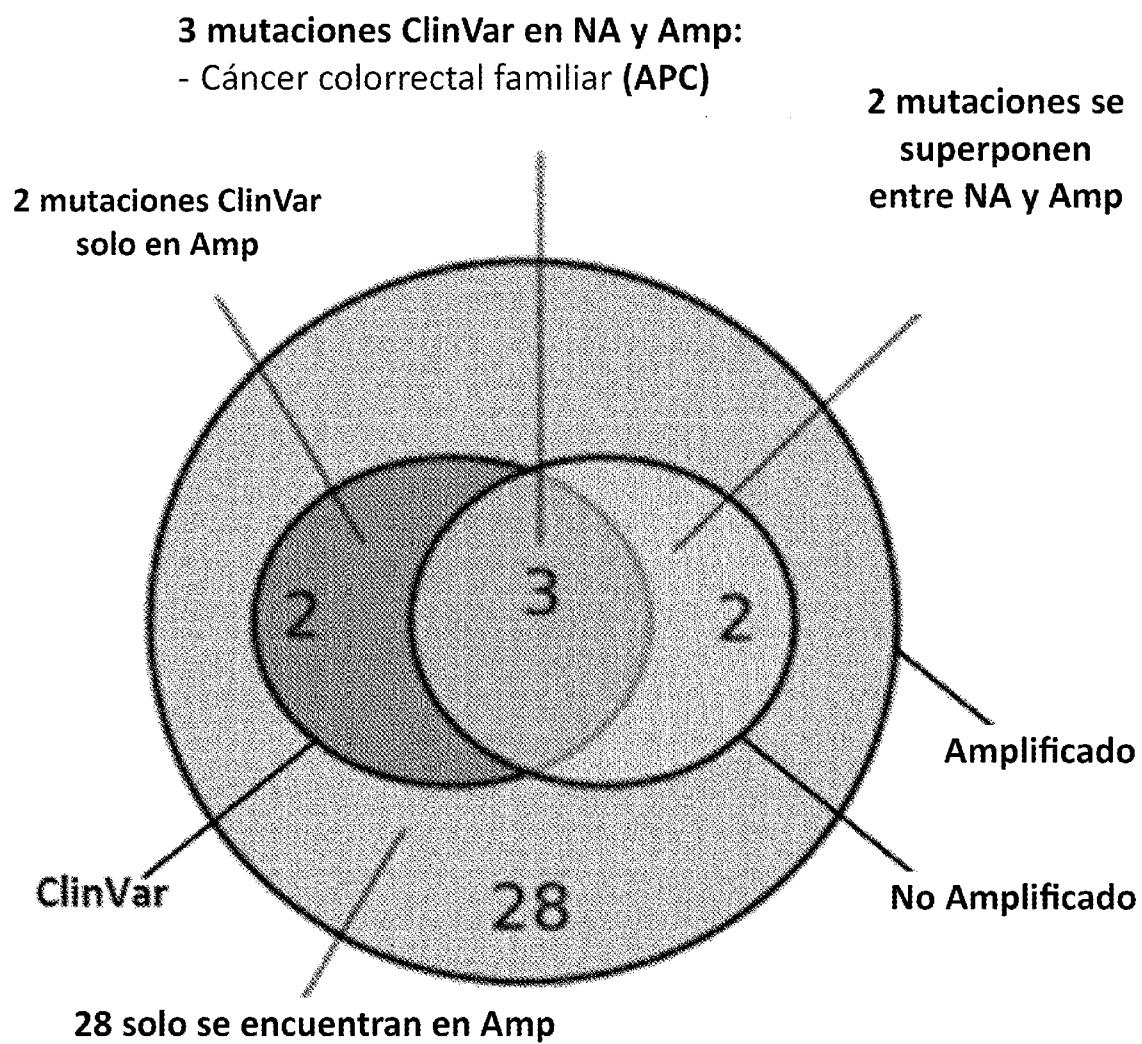


Figura 15 continuación

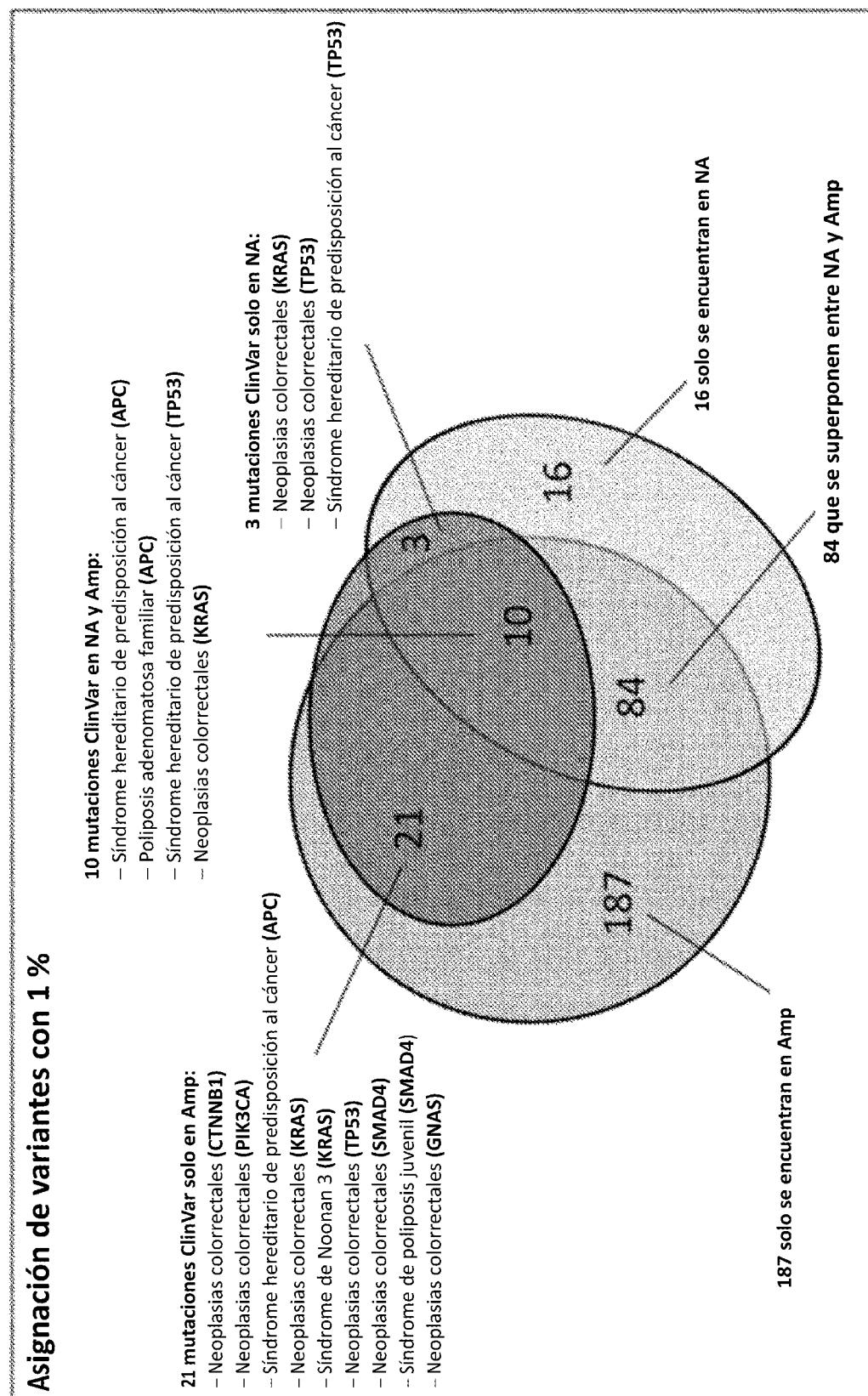


Figura 16

Asignación de variantes con 35 %

2 mutaciones ClinVar en NA y Amp:

- Melanoma maligno (**BRAF**)
- Neoplasias colorrectales (**BRAF**)

3 mutaciones se superponen entre NA y Amp

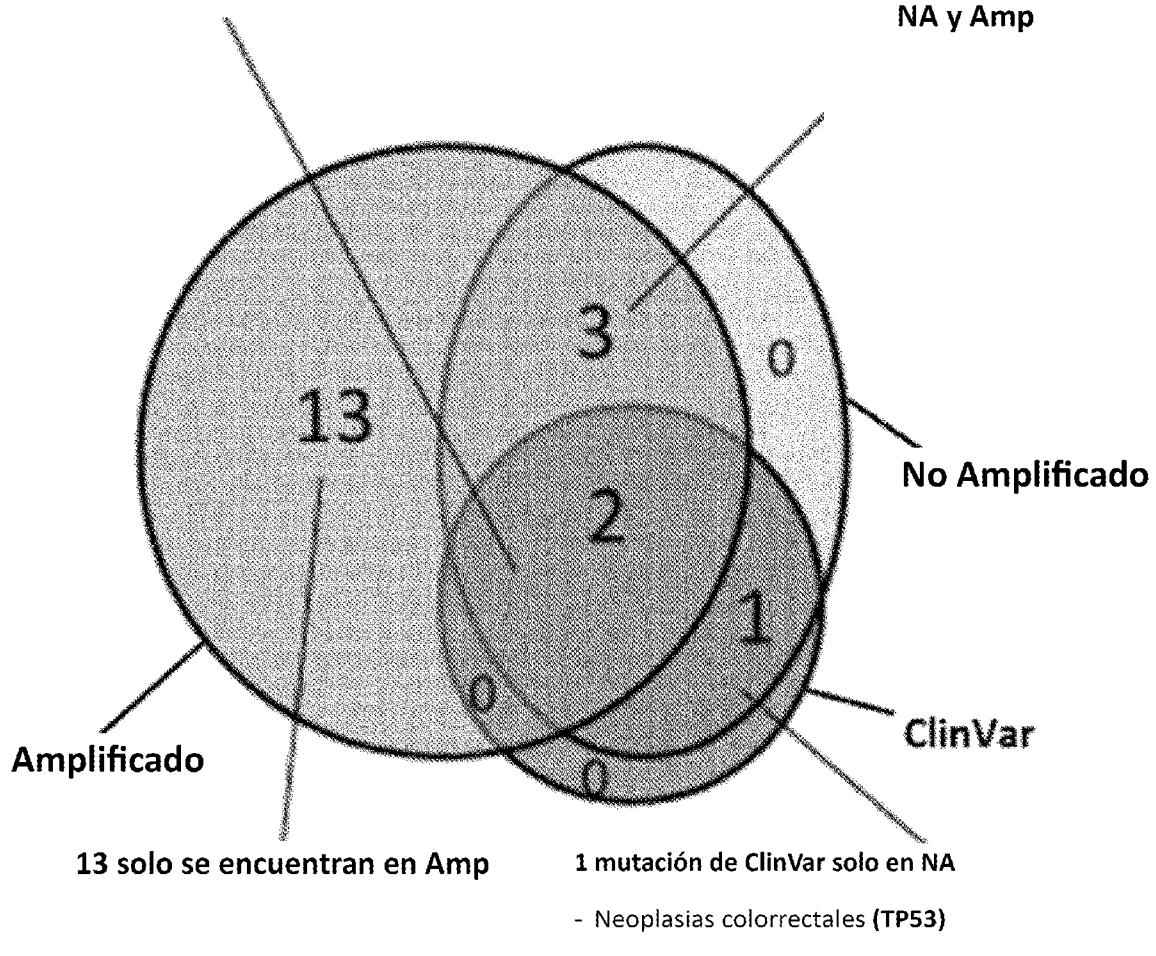


Figura 16 continuación

Asignación de variantes con 1 %

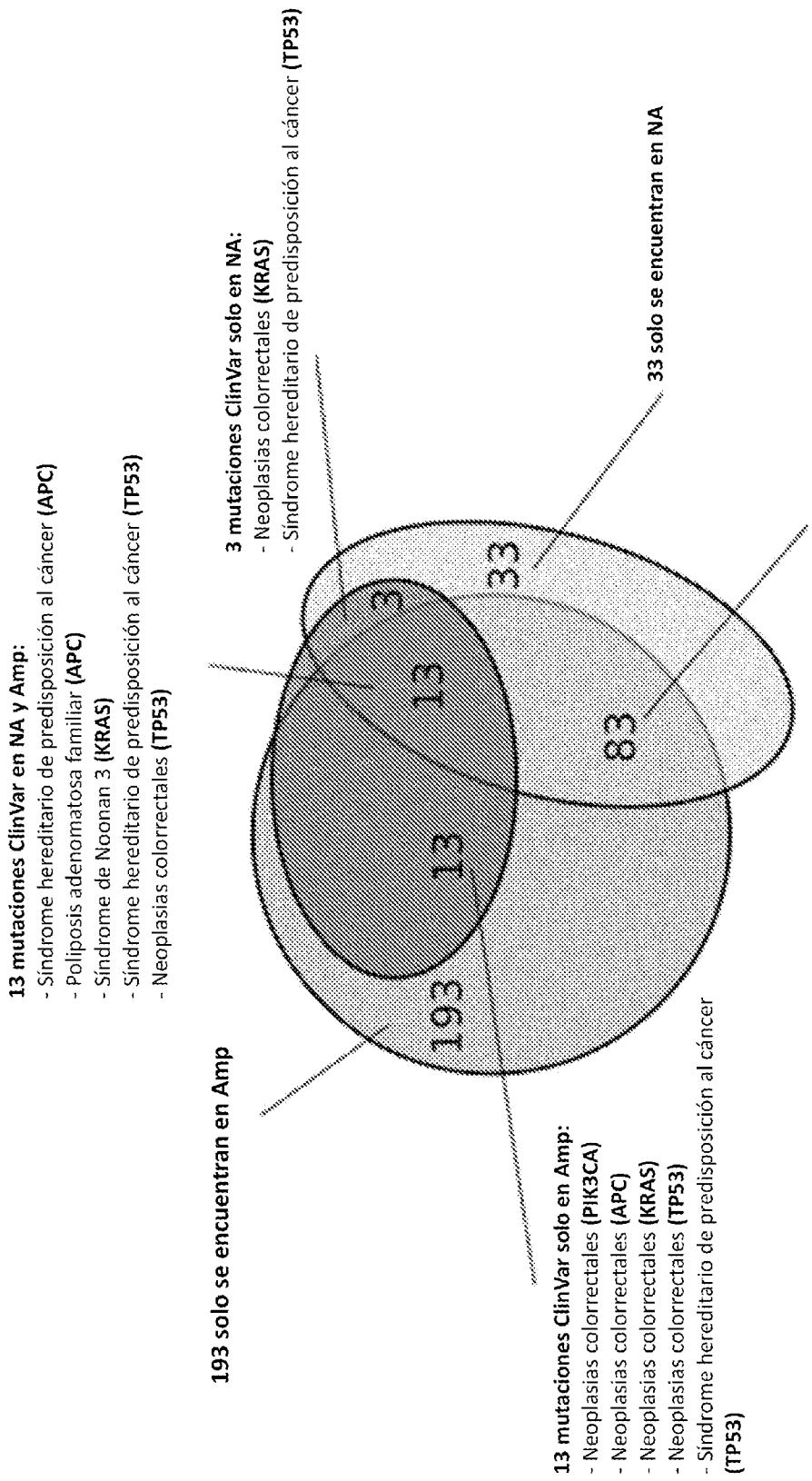


Figura 17

Asignación de variantes con 35 %

4 mutaciones ClinVar en Amp:

- Síndrome hereditario de predisposición al cáncer (**TP53**)
- Síndrome hereditario de predisposición al cáncer (**SMAD4**)

31 solo se encuentran en Amp

2 mutaciones ClinVar
en NA y Amp:

- Neoplasias colorrectales (**BRAF**)

ClinVar

Amplificado

5 mutaciones
que se
superponen
entre NA y Amp

No Amplificado

2 mutaciones ClinVar solo en NA:

- Síndrome hereditario de predisposición al cáncer (**TP53**)

SEQ ID NO:10

MRFIEHALSYAAQGYGVILPLRPGGKEPLGKLVPHGLKNASRDOPATLEAWNRSCPRCGVGILP
GPEVLVLDFFDDEAWEGLRQERPALEAAPRQRTPKQGRHVFLRLPEGVRLSASVRAIPGVDL
RGMGRAYVVAAPTRLKDGRYYTWEAPLTPPEELPPVPQALLLKLLPPPFPFWGAVGTAS
PKRLQALLQAYAAQVARTPEGQRHNTLIRYAVAAGQLIPHGLDPREAEEVLVAAMSAGLPE
WEARDAVRWGLGVGASRPLYLESSSKPPEFRTYRARVYARMRRWV

Figura 18