

(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 noviembre de 2018 (08.11.2018) **WIPO | PCT**

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/203280 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2018/053091

(22) Fecha de presentación internacional:
03 de mayo de 2018 (03.05.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
NC2017/0004500
03 de mayo de 2017 (03.05.2017) CO

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER** [CO/CO]; Carrera 27 Calle 9, Ciudad Universitaria, Bucaramanga (CO). **CENTRO DE INVESTIGA-**

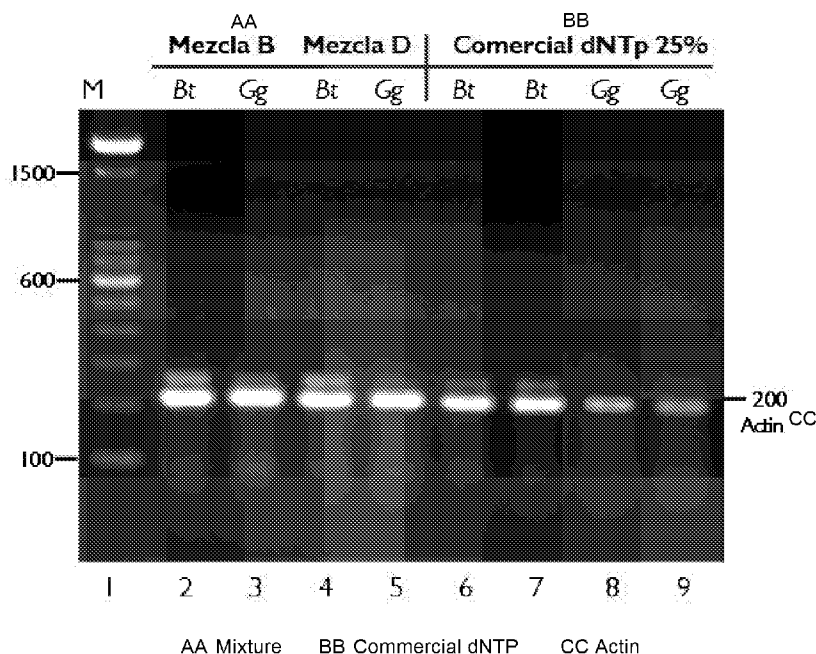
CIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL [MX/MX]; Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Ciudad De México, Código Postal 07360 (MX). **INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO** [MX/MX]; Av. Jesús García 140, Piso 12, Colonia Buenavista, Ciudad De México, C.P. 06350 (MX). **THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO** [CA/CA]; 25 Harbord St., Toronto, ON M5S 3G5, Toronto, Ontario (CA).

(72) Inventores: **BARRIOS HERNÁNDEZ, Carlos Jaime**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **BAUTISTA ROZO, Lola Xiomara**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **GONZÁLEZ BARRIOS, Juan Antonio**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santan-

(54) Title: NUCLEOTIDE MIXTURES FOR THE AMPLIFICATION AND SEQUENCING OF NUCLEIC ACID POLYMERS

(54) Título: MEZCLAS DE NUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE POLÍMEROS DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

FIG. 1.



(57) Abstract: The present invention relates to mixtures of dNTP nucleotides and/or the analogues thereof, in different proportions and/or different molar concentrations of each of same, which allow optimum polymerisation of nucleic acids, regardless of the content and distribution thereof inside the polymer. The invention also relates to a process for amplifying and sequencing nucleic acid polymers, characterised in that it uses one or more of said mixtures dNTP. The mixtures can be used to generate nucleotide polymers in any variant of PCR or RT-PCR, or to sequence same using conventional methods, pyrosequencing or third-generation sequencing.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a mezclas de nucleótidos dNTPs y/o sus análogos, en diferentes proporciones y/o concentración molar de cada uno de ellos, que permite una óptima polimerización de ácidos nucleicos independientemente de su

[Continúa en la página siguiente]



der (CO). **MARTÍNEZ FONG, Daniel**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **MARTÍNEZ PÉREZ, Francisco José**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **MEJÍA OSPINO, Enrique**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **MUNIVE ARGÜELLES, Néstor Martín**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **PEDRAZA FERREIRA, Gabriel Rodrigo**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **RAMÍREZ ARDILA, Silvia Daniela**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **RIBÓN GÓMEZ, Wellman Antonio**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **RODRÍGUEZ VÁZQUEZ, Refugio**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **TOBE, Stephen**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO). **VERA CALA, Lina María**; Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Santander (CO).

(74) **Mandatario: OLARTE, Carlos R.**; Carrera 5 No. 34-03, La Merced, Bogotá, 110311 (CO).

(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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de *PATENTSCOPE*.

contenido y distribución dentro del polímero. La invención también contempla un proceso para la amplificación y secuenciación de polímeros de ácidos nucleicos caracterizado porque emplea una o más de estas mezclas de dNTPs. Las mezclas pueden ser utilizadas en la generación de polímeros nucleotídicos en cualquiera de las variantes de PCR, RT-PCR, o en la secuenciación de ellos por los métodos convencionales, pirosecuenciación o secuenciación de tercera generación.

MEZCLAS DE NUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE POLIMEROS DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

CAMPO DE LA INVENCION

5

La invención pertenece al área de la biotecnología, biomedicina y ciencia básica, particularmente a mezclas de nucleótidos y/o sus análogos en diferentes proporciones y/o concentración molar de cada uno de ellos, para ser empleadas en procesos de amplificación y secuenciación de polímeros de ácidos nucleicos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La obtención de polímeros de ácidos nucleicos y su secuencia ha sido uno de los campos de la Biología que ha revolucionado a la humanidad. El éxito de este proceso es el resultado de varios descubrimientos y logros de la bioquímica, de los sistemas de purificación de ácidos nucleicos de fuentes biológicas o ambientales y de la síntesis química de ácidos nucleicos.

Independiente de todas las variantes que se han desarrollado para la obtención de polímeros de ácidos nucleicos, con cualquiera de sus aplicaciones e interpretación, la esencia de la reacción es a nivel de sus componentes, ya que cualquier variante de polimerización nucleotídica invariablemente requiere, además de un equipo adecuado, el segmento de ácidos nucleicos del que se obtendrán los polímeros, una ADN o ARN polimerasa para realizar la unión de los respectivos nucleótidos, un amortiguador de reacción, uno o dos oligonucleótidos para indicar el comienzo y el final del polímero a obtener y los nucleótidos o también llamados dNTPs que conforman al polímero.

Aún en lo sencillo del desarrollo y ejecución de la reacción de polimerización nucleotídica, en muchos casos, se obtienen polímeros nucleotídicos indeseados y/o que no corresponden al tamaño esperado. En otras ocasiones, la secuencia nucleotídica obtenida puede tener errores, generados por la misma reacción, por lo que el polímero obtenido no es funcional. La problemática anterior es debido a que la naturaleza de cada

secuencia nucleotídica es única, por lo tanto, seguir un protocolo común para un conjunto de polímeros nucleotídicos de cualquier origen resulta a veces inapropiado, ya que las características fisicoquímicas de cualquiera de ellos estarán determinadas por su concentración y distribución nucleotídica.

5

Para solucionar esta problemática, la comunidad científica ha demostrado que en ocasiones se debe: 1) modificar la temperatura que se aplica para la desnaturalización previa y posterior en la polimerización, 2) incluir proteínas como la albúmina, que contribuyen a la calidad final del polímero nucleotídico (Montgomery JL, Rejali N, Wittwer CT. *The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases*. J Mol Diagn. 2014 May; 16(3):305-13) y 3) adicionar agentes químicos como el dimetilsulfóxido, betantina (Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. *DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis*. PLoS One. 2010 Jun 11; 5(6):e11024) y formamida (Montgomery JL, Wittwer CT. *Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR instruments*. Clin Chem. 2014 Feb;60(2):334-40) para favorecer la especificidad de la reacción. Con todos estos elementos se ha logrado la amplificación y secuenciación de millones de polímeros de ácidos nucleicos, cuya sumatoria de una especie se interpreta biológicamente como cromosomas, genomas o su expresión como ARN.

20

Pero, aun cuando se han mostrado todos estos logros, la realidad es que persisten muchas regiones genómicas y otros polímeros nucleotídicos desconocidos, dado que la eficiencia de polimerización en diversas regiones nucleotídicas es muy limitada con los protocolos científicos reportados y los kits comerciales disponibles. Actualmente, estos últimos proporcionan todos los elementos para realizar una reacción de polimerización exitosa.

25

Algunas casas comerciales distribuyen una presentación denominada Master Mix PCR one step® o RT-PCR one step® (Thermofisher Scientific¹) para realizar la reacción, con las cuales, el usuario únicamente dispone el ADN o ARN que se desea clonar junto con los

¹ www.thermofisher.com

cebadores, para obtener una reacción de polimerización o la secuencia de un segmento de ADN o ADNc.

Otra forma para realizar la reacción de polimerización nucleotídica es aquella en la que cada uno de los nucleótidos y componentes se comercializan de forma independiente para que el usuario realice la mezcla de acuerdo a su necesidad. Para este caso, la ADN polimerasa, su amortiguador y su cofactor se comercializan por separado de los nucleótidos, los cuales se encuentran disponibles en el mercado bien sea de forma individual, o en una sola mezcla, con concentraciones molares iguales (equimolares) de cada uno de ellos.

Si bien se pueden emplear las mezclas de nucleótidos con concentraciones equimolares para llevar a cabo la polimerización nucleotídica, muchas veces no es posible obtener una polimerización completa y eficiente, debido a las diferencias en las proporciones nucleotídicas de los polímeros nucleotídicos presentes en un proceso biotecnológico y en cada uno de los seres de la naturaleza.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se refiere a mezclas de nucleótidos (dNTPs), adenina, timina, uracilo, guanina y citosina y/o sus análogos, en diferentes proporciones y/o concentraciones molares de cada uno ellos, para ser empleadas en la polimerización de ácidos nucleicos. La invención también contempla un procedimiento para la amplificación y secuenciación de polímeros de ácidos nucleicos que emplea dichas mezclas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG 1. Comparación de polímeros del ADN complementario de la beta actina de musculo bovino *Bos taurus* y del ave *Gallus gallus* al emplear la Mezcla B y la Mezcla D (carriles 2-5) con respecto a una mezcla comercial (carriles 6-9).

FIG 2. Tamizaje en la librería tipo RACE para la identificación de ADNc relacionados a la secuencia de codones para el neuropéptido FGLamida en el Escarabajo de la harina. De los carriles 1-8. M Marcador de 100 pb (Invitrogen), P1 y P2 tamizaje con los Oligonucleótidos para la FGLamida. C controles de amplificación. ES control sin nucleótidos.

FIG 3. Identificación por PCR, empleando la Mezcla D, de algunos de los clones en plásmidos recombinantes cuyos insertos corresponden a los ADNc relacionados a los codones de la FGLamida del cerebro y sistema nervioso del Escarabajo de la harina *T. molitor* obtenidos del tamizaje en la Biblioteca RACE que se indica en la FIG. 2. Los plásmidos recombinantes generan amplicones mayores al polilinker (carril 5). De este grupo únicamente se secuenciaron los clones mayores a 400 pb.

FIG 4. Ejemplos (3) de la ausencia de polimerización y concomitantemente la obtención de la secuencia del polímero nucleotídico al hacer la reacción con mezclas de nucleótidos equimolares de productos comerciales, donde se muestra la ausencia de polimerización en todos los plásmidos recombinantes seleccionados.

FIG 5. Resultados de la secuenciación de un par de los amplicones con mezclas de nucleótidos sugerida por casa comercial para genomas ricos en G-C.

FIG 6. Comparación de secuenciación de polímeros nucleotídicos con mezclas de nucleótidos sugerida por casa comercial para genomas ricos en G-C (superior) y la Mezcla L con coadyuvante (inferior).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- La invención se refiere a mezclas de nucleótidos (dNTPs), adenina, timina, uracilo, guanina y citosina (dNTPs) y/o sus análogos, con diferentes proporciones y/o
- 5 concentración molar (mol/mol) de cada uno de ellos, que provee una simple, rápida y sencilla opción para obtener y secuenciar polímeros de ácidos nucleicos (v.g. ADN y ARN), incluso en regiones nucleotídicas cuya organización y propiedades fisicoquímicas impiden su caracterización con los métodos y reactivos actuales.
- 10 Para efectos de la presente invención, el término “y sus análogos”, se refiere a compuestos análogos de las bases nitrogenadas, los cuales se pueden definir como bases nitrogenadas con alguna modificación o inclusión en su estructura. Entre los análogos se pueden mencionar los aminoalil nucleótidos, fluoróforos, nucleótidos unidos a un grupo tiol o unidos a una biotina y la 2-aminopurina.
- 15 La proporción y/o concentración molar de los dNTPs en las mezclas de la presente invención se establece según un modelo bioinformático que permite analizar las características de los polímeros de ADN o ARN y su contenido nucleotídico. La concentración molar de cada uno de los dNTPs puede estar entre el 5,0% y el 45,0%. En
- 20 la Tabla 1 se muestran los rangos de cada uno de los nucleótidos.

Tabla 1

A-T o A-U (% mol/mol)¹	G-C (% mol/mol)¹	Porcentaje Total AT ó (AU) + GC
26,1 – 30,0	20,0 - 23,9	100,0 %
30,1 - 33,9	16,1 - 19,9	100,0 %
34,0 - 45,0	5,0 – 16,0	100,0 %
20,1 - 23,9	26,1 - 29,9	100,0 %
16,1 - 19,9	30,1 - 33,9	100,0 %
5,0 - 16,0	34,0 – 45,0	100,0 %

¹ El primer valor corresponde al mínimo y el segundo al máximo de cada nucleótido.

En las mezclas de acuerdo a la presente invención, la proporción molar de Adenina-Timina o Adenina-Uracilo, al igual que la de Guanina-Citocina, siempre es 1:1 y la sumatoria total

de los porcentajes de ellos es 100,0%. Así, por ejemplo, si en una mezcla de dNTPs el porcentaje de Adenina es 20,1%, el porcentaje Timina también es 20,1%, por lo que, para completar el 100%, los porcentajes de Guanina y Citocina tendrían que ser, cada uno, del 29,9%.

5

La concentración molar de cada uno de los dNTPs en las mezclas de la invención estará determinada, en cada caso, por las proporciones nucleotídicas de los polímeros de ácidos nucleicos con los que debe reaccionar. Los diferentes rangos de concentración molar de dNTPs en las mezclas de la invención permiten que éstas puedan ser empleadas para
10 amplificar y/o secuenciar polímeros nucleotídicos con un contenido de dNTPs cercano a la igualdad (v.g. 26,1% A-T y 23,9% G-C) o significativamente distinto (v.g. 5,0% A-T y 45,0 G-C).

Las mezclas de la invención pueden contener uno o más coadyuvantes para favorecer las
15 reacciones de amplificación y secuenciación de polímeros de ácidos nucleicos. Entre los coadyuvantes se pueden mencionar solventes, diluyentes, sales, reguladores de pH, cofactores, enzimas y compuestos químicos tales como dimetilsulfóxido, tetracloruro de etilamonio (TAE-Cl), tetracloruro de metilamonio (TAM-Cl), en concentraciones entre el 0,1% y el 99,9% p/p.

20

Adicionalmente, las mezclas de dNTPs pueden estar acompañadas de un portador o vehículo aceptable, el cual debe favorecer la estabilidad y propiedades químicas de los nucleótidos. El término “vehículo aceptable” para efectos de la presente invención, se puede definir como una sustancia o mezcla de sustancias (v.g. disolventes, soluciones)
25 capaces de contener los dNTPs y/o los coadyuvantes, sin que se afecte su capacidad para realizar la función deseada.

La determinación de la proporción nucleotídica del polímero que se desea amplificar o secuenciar puede ser determinada por el usuario según sus criterios de selección. En la
30 Tabla 2 se ilustra la relación nucleotídica de genomas, cromosomas y genomas mitocondriales en algunas bacterias, hongos, plantas, animales y humanos. Con el valor del resultado se puede seleccionar la mezcla de dNTPs más apropiada.

Dada la versatilidad de las mezclas de la invención, estas pueden ser empleadas para reacciones de polimerización de ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, sistemas de generación de polímeros nucleotídicos o su secuenciación en todas sus variantes.

5

Tabla 2

Adenina/Timina ¹	Guanina/Citosina ¹	Organismo ²
26,1 - 30,0	20,0 - 23,9	Bacterias, hongos, cromosomas de humano (15), toro (27), perro (26), cabra (26), gato (15), gallo (18), pavo (19), arroz (10), maíz (10). Mitocondrial de maíz y soya.
30,1 - 33,9	16,1 - 19,9	Bacterias, hongos, cromosoma 6 de humano, escarabajo rojo de la harina (10), toro (3), perro (13), cabra (4), gato (3), gallo (3), pavo (7), soya (20), banano (11), arroz (2), tomate (12), algodón (7), orquideas (17), frijol (9), cacao (10), mitocondrial de toro, perro, gato.
34,0 - 45,0	5,0 - 16,0	Bacterias, hongos, algodón (6), frijol (2), mitocondrial de cabra.
20,0 - 23,9	26,1 - 30,0	Bacterias, hongos, cromosomas de: gallo (2), pavo (2), mitocondrial de 38 aves.
16,1 - 19,9	30,1 - 33,9	Bacterias, cromosomas de gallo (1), mitocondrial de gallo, pavo y de 415 aves.
5,0 - 16,0	34,0 - 45,0	Bacterias, mitocondrial de 11 aves.

¹ (% mol/mol). El primer valor corresponde al mínimo y el segundo al máximo de cada nucleótido.

² El número en paréntesis al lado derecho de cada organismo indica la cantidad de cromosomas que tienen la respectiva proporción molar.

- 10 En una modalidad preferida, las mezclas de la invención (Mezclas B, D, E, L y W) tienen los porcentajes de dNTPs indicados en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3.

Mezcla	A-T (% mol/mol)	G-C (% mol/mol)	Porcentaje Total AT o (AU) + GC
Mezcla B	30,0	20,0	100,0 %
Mezcla D	20,0	30,0	100,0 %
Mezcla E	33,0	17,0	100,0 %
Mezcla L	15,0	35,0	100,0 %

Tabla 4.

Mezcla	A-U (% mol/mol)	G-C (% mol/mol)	Porcentaje Total AT o (AU) + GC
Mezcla W	30,0	20,0	100,0 %

Para la preparación de las mezclas de acuerdo a la invención, se puede partir de composiciones independientes de cada uno de los nucleótidos (soluciones stock) y obtener la concentración deseada de cada uno de los nucleótidos siguiendo los métodos de dilución convencionales. Posteriormente se pueden incorporar los coadyuvantes y/o el vehículo para obtener así las mezclas.

La presente invención también contempla un proceso para la amplificación y secuenciación de polímeros de ácidos nucleicos caracterizado porque emplea una o más mezclas de dNTPs indicadas en las Tablas 1, 3 y 4.

La amplificación y secuenciación se puede llevar a cabo aplicando técnicas moleculares que incluyen: hibridación, síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), amplificación de ácidos nucleicos, secuenciación de ácidos nucleicos, predicción por medio de tecnologías electrónicas, informáticas o manuales que permitan determinar la complementariedad entre secuencias nucleotídicas y la concentración de sus componentes en el polímero. Preferiblemente, el proceso de la invención comprende las siguientes etapas:

- a) Purificar los polímeros nucleotídicos presentes en una muestra de cualquier origen;
- b) Poner en contacto una muestra del polímero nucleotídico que se desee amplificar o secuenciar con al menos una de las mezclas de dNTPs de acuerdo a la invención; ADN o ARN polimerasa; amortiguador y cofactor, si es necesario.
- c) Llevar a cabo una reacción de síntesis de polímeros nucleotídicos complementarios y/o su amplificación o secuenciación en condiciones adecuadas de medio de reacción, pH y temperatura.

- d) Establecer si el polímero nucleotídico obtenido corresponde en tamaño, composición y orden nucleotídico esperado de forma directa o indirecta, para ser aplicado acorde a la selección del usuario.
- 5 La invención también contempla el uso de las mezclas de dNTPs de la invención para amplificar y secuenciar polímeros de ácidos nucleicos mediante métodos enzimáticos convencionales y no convencionales.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos:

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Preparación de una Mezcla de diferente concentración de dNTPs.

- 15 Se prepararon 1000 microlitros (μL) de la Mezcla L (Tabla 3) a partir de soluciones stock (Invitrogen®) de concentración 100 milimolar (mM) de cada uno de los nucleótidos. Se tomaron 150μL de la solución stock de Adenina, 150μL de la solución stock de Timina, 350μL de la solución stock de Guanina y 350μL de solución stock de Citocina para obtener
- 20 así una mezcla con concentración 15mM de Adenina, 15mM de Timina, 35mM de Guanina y 35mM de Citocina.

EJEMPLO 2. Preparación de una mezcla de diferente concentración de dNTPs con coadyuvantes para PCR.

- 25 De manera análoga a la preparación descrita en el Ejemplo 1, a partir de soluciones stock se preparó una mezcla de dNTPs para PCR de un paso constituida por: 1 amortiguador de reacción 1X (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 pH 8,8 a 25°C), 2 Unidades de la ADN polimerasa Deep Vent (New England Biolabs²®), 150μM de Adenina, 150μM de Timina, 350μM de Guanina y 350μM de
- 30 Citocina y 5% de DMSO.

² <https://www.neb.com>

EJEMPLO 3. Preparación de una Mezcla de diferente concentración de dNTPs con coadyuvantes para RT-PCR.

- 5 De manera análoga a la preparación descrita en el Ejemplo 1, a partir del kit One Taq One-Step RT-PCR New England Biolabs® se preparó una mezcla constituida por enzimas ProtoScript® II Transcriptasa Reversa, ADN Polimerasa OneTaq Hot Start, Inhibidor RNase Murino y stabilizers, 3.2 mM MgCl₂, 1,7mM de Adenina, 1,7mM de Timina, 0,8mM de Guanina y 0,8mM de Citocina y 8% de tetra cloruro de etilamina.

10

EJEMPLO 4. Amplificación por RT-PCR del segmento de ADN complementario inmerso entre el primer y segundo dominio universal de la beta actina de musculo bovino *Bos taurus* y de la ave *Gallus gallus*.

- 15 La obtención y purificación del ácido ribonucleico total (ARN) de músculo bovino y de ave se efectuó con el reactivo Trizol de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen®³). La cuantificación e índice de pureza se obtuvo por métodos estándares espectrofotométricos, en tanto que la integridad del ARN total se efectuó al visualizar los ARN ribosomales por su tinción en gel de agarosa.

20

- La síntesis de ADNc se realizó con ARN total de cada muestra con la enzima transcriptasa reversa (SuperScript III Rt Invitrogen®) empleando como iniciador de polimerización un oligonucleótido de 21 timinas y con concentraciones de nucleótidos equimolares. Las condiciones de reacción, inactivación de la enzima y eliminación del ARNm templado se
- 25 llevaron a cabo de acuerdo a los métodos enzimáticos y físicos convencionales.

- La amplificación del polímero nucleotídico se realizó con un cofactor, un buffer, ADN polimerasa (*Taq* Platinum Invitrogen®), un par de oligonucleótidos en dirección sentido y antisentido que hibridan aproximadamente en la región del primer y segundo dominio
- 30 universal de la beta actina (Joseph J., Fey P. et al. *The actinome of Dictyostelium*

³ <https://www.thermofisher.com/co/en/home/brands/invitrogen.html?icid=fr-invirogen-main>

discoideum in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. PLoS One. 2008 Jul 9; 3(7):e2654.) y se empleó una mezcla de nucleótidos (mezcla B), indicada en la Tabla 3, correspondiente a la composición nucleotídica específica para el toro y el gallo. La reacción se efectuó con el protocolo estándar de la enzima durante 35 ciclos con una temperatura de alineamiento de 55°C por 30 segundos y de extensión a 72°C por 13 segundos.

El primer control de la polimerización nucleotídica se realizó con una mezcla de nucleótidos de un producto comercial (AM8200 de Invitrogen®⁴) que contiene la misma proporción molar A=T=G=C=25,0% y el segundo control de nucleótidos correspondió a la concentración molar inversa de la Mezcla B, con los valores proporcionales milimolares de A-T y G-C indicados en la Mezcla D (Tabla 3).

La separación y visualización de los amplicones en amortiguador y condiciones pertinentes, evidenció que al emplear tanto la Mezcla B como la Mezcla D se generó una concentración mayor de polímero nucleotídico esperado con respecto a la concentración obtenida empleando la mezcla del producto comercial. La mejora del proceso es más contundente en la muestra de bovino, donde se incrementó la polimerización nucleotídica de dos isoformas de beta actina (FIG. 1), la cual se ha demostrado su presencia en otras especies (Rivero F, Cvrcková F. *Origins and evolution of the actin cytoskeleton*. Adv Exp Med Biol. 2007; 607:97-110).

EJEMPLO 5. Identificación y caracterización de polímeros de ADNc relacionados al precursor de la FGLamida de sistema nervioso del Escarabajo de harina *Tenebrio molitor*.

La obtención y secuenciación de amplicones relacionados a la expresión del gen de la FGLamida de cerebro y ganglios del sistema nervioso del Escarabajo se realizó siguiendo el siguiente procedimiento:

⁴ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM8200>

Primero, se realizó la extracción de los tejidos por medio de técnicas estándar de extracción tisular y luego se efectuó la extracción y purificación de ARN total de todos los tejidos. Del conjunto de ARN total anterior, únicamente al ARN mensajero se le unió el oligonucleótido adaptador en extremo 5' por métodos enzimáticos. A esta construcción
5 para esta invención se denomina Biblioteca RACE, la cual es amplificada por dos pasos: 1) síntesis de ADN complementario con un oligonucleótido tipo RACE 3' y 2) amplificación por RT-PCR con oligonucleótidos para los adaptadores.

Luego, el tamizaje en la biblioteca RACE se realiza mediante un oligonucleótido para el
10 polímero nucleotídico que se desea encontrar y otro oligonucleótido para alguno de los adaptadores. Al final, los productos son clonados en plásmidos y secuenciados por métodos estándar para obtener la secuencia del polímero nucleotídico.

La obtención de los tejidos se efectuó por métodos de disección convencionales acogidos a protocolos de bioseguridad y bioética nacionales e internacionales para manejo de
15 animales de laboratorio. De estos tejidos se obtuvo el ARN total de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 4.

Previo a la síntesis de ADN complementario para obtener la Biblioteca RACE, se modificó el extremo 5' de todos los ARN mensajeros al eliminar la 7-metil guanocina (*CAP*) y
20 posteriormente incorporar en este extremo un oligonucleótido de ARN por métodos enzimáticos acorde al Kit GeneRacer®⁵.

La síntesis de ADN complementario se llevó a cabo con un oligonucleótido tipo RACE 3' de la misma manera como se realizó en el Ejemplo 4, pero se emplearon dos mezclas de
25 nucleótidos: la primera, una mezcla comercial de Invitrogen® con concentraciones equimolares de nucleótidos, y la segunda, una mezcla de nucleótidos (Mezcla E, Tabla 3) correspondiente a la composición nucleotídica específica para el Escarabajo rojo de la harina (TGSC 2008), que incluía además dimetilsulfoxido (DMSO) al 5% como coadyuvante. El protocolo de síntesis y purificación del polímero nucleotídico fue acorde
30 al indicado en el Ejemplo 4.

⁵ https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/generacer_man.pdf

Para la amplificación por RT-PCR de todos los polímeros nucleotídicos del proceso anterior, se pusieron en contacto con: un par de los oligonucleótidos que hibridan en la secuencia nucleotídica de los polilinkers que se encuentran en los extremos de los adaptadores de todos los ADNc, una mezcla de ADN polimerasas termoestables DreamTaq/DeepVent (Fermentas®/New England Biolabs®) y las concentraciones de nucleótidos indicadas en la síntesis de ADNc.

Las condiciones de polimerización fueron 28 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 20 segundos, alineamiento de 62°C por 30 segundos, y de extensión a 72°C por 120 segundos. Los productos se purificaron por métodos de exclusión molecular en columna establecidos por QIAGEN® y visualizados en gel de agarosa. Los polímeros nucleotídicos resultantes se les denominó Biblioteca RACE.

Para la identificación de los amplicones relacionados a la FGLamida en la biblioteca RACE, se realizó el procedimiento de polimerización indicado en el párrafo anterior, pero empleando como vehículo de tamizaje e iniciador de la polimerización un oligonucleótido degenerado cuyos nucleótidos corresponden a los codones para los últimos aminoácidos de la FGLamida y el par de aminoácidos básicos para el procesamiento del propéptido (Martínez-Pérez F, Bendena WG, Chang BS, Tobe SS. *FGLamide Allatostatin genes in Arthropoda: introns early or late?* Peptides. 2009 Jul;30(7):1241-8; Elliott KL, Chan KK & Stay B. *Evidence for a Phe-Gly-Leu-amide-like allatostatin in the beetle Tenebrio molitor*. 2010 Peptides. Mar 31(3):402-7) y el oligonucleótido antisentido al polilinker del cebador RACE 3' el control.

Los productos se separaron para ser visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (FIG. 2). A diferencia de lo reportado en bases literarias en las que se sugería la inexistencia de polímeros genómicos que codificaran para ARN mensajeros relacionados a los codones para el precursor del neuropéptido, la Mezcla E generó los polímeros nucleotídicos que confirman la generación y funcionalidad de la biblioteca RACE.

Las reacciones positivas se purificaron por columna de exclusión molecular de manera similar a como se indica en el Ejemplo 4 y posteriormente se clonaron en el plásmido pJet 1.2 acorde a los procedimientos establecidos por el fabricante (Thermo Scientific®). Los plásmidos recombinantes se amplificaron por transformación a la bacteria *E. coli* C600 en
5 condiciones de esterilidad, temperatura y medios de cultivos nutritivos con el fármaco de selección sugerido por el distribuidor del plásmido.

Para la identificación de los plásmidos recombinantes, inicialmente las colonias bacterianas positivas se cultivaron de forma independiente en medio líquido con el fármaco
10 de selección y luego los plásmidos recombinantes se purificaron por métodos químicos-enzimáticos convencionales. La selección de los plásmidos positivos de los falsos-positivos se realizó mediante PCR según el procedimiento de la amplificación de la biblioteca RACE, pero con un par de oligonucleótidos que flanquean la región del polilinker de cada plásmido y por 20 ciclos. Los amplicones se visualizaron en gel de
15 agarosa como se indicó en la reacción de RT-PCR de tamizaje de la biblioteca RACE (FIG. 3).

La secuenciación de los plásmidos recombinantes se realizó utilizando el Kit GenomeLab Methods Development Kit MDK ⁶, el cual permitió disponer en la reacción de
20 secuenciación las proporciones nucleotídicas y desoxinucleotídicas de la Mezcla E para la amplificación de la librería. La secuenciación de los controles correspondió a la que empleó la mezcla del Kit CEQ Quick Start ⁷ (Beckman Coulter®) la cual contiene nucleótidos con concentraciones equimolares.

25 Tanto las ADN polimerasas y todos los componentes de la reacción, incluyendo el oligonucleótido de inicio de la polimerización, fueron los correspondientes a cada Kit. Así mismo, las condiciones de polimerización y purificación de los polímeros se realizaron de acuerdo a las indicaciones del Kit. La señal luminosa incorporada a cada uno de los polímeros nucleotídicos se identificó y se cuantificó por electroforesis de ocho capilares

⁶ <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=608019.pdf>

⁷ <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=DS9380A.pdf>

acoplados a rayo láser por medio del equipo GenomeLab GeXP™ Genetic Analysis System (Beckman Coulter®) y los datos fueron visualizados con el programa computacional propuesto por el fabricante.

- 5 En la FIG. 4 se muestra un par de gráficas del patrón de luminosidad de la secuenciación de tres de los plásmidos recombinantes empleando la mezcla de nucleótidos del producto comercial, donde se observa claramente que no hubo reacción de secuenciación puesto que no existió reacción de polimerización. De igual manera, la secuenciación de los mismos plásmidos recombinantes para polímeros nucleotídicos ricos en G-C generó
10 amplicones sin una concordancia biológica a cualquier marco abierto de lectura de ARN mensajeros, como se muestra en la FIG. 5. La polimerización inadecuada se corrigió empleando la Mezcla E.

- La superioridad en la polimerización al emplear la Mezcla, debido a su concentración nucleotídica específica, con respecto a la mezcla comercial, también se demostró con el
15 resultado obtenido del polímero nucleotídico del plásmido recombinante J50C3 para Escarabajo negro. La secuencia obtenida utilizando la Mezcla E fue homóloga con la beta integrina del Escarabajo rojo de la harina, en tanto que el mismo polímero, pero secuenciado con la mezcla comercial, generó una secuencia sin relevancia biológica
20 homologa a segmentos pequeños de polímeros nucleotídicos no mayores a 50 nucleótidos (pez, ácaro y genoma mitocondrial de loros).

- Si bien las dos mezclas, la mezcla comercial y la Mezcla E, generaron polimerización nucleotídica, el resultado de la mezcla comercial no produjo una secuencia acorde a un
25 patrón biológico, como sí lo produjo la Mezcla E, en la que el patrón de polimerización es el esperado para cualquier polímero nucleotídico independientemente de su concentración y orden de nucleótidos (FIG. 6).

- Empleando la mezcla de la invención, se confirmó la presencia de polímeros nucleotídicos
30 que no pudieron ser identificados por los métodos existentes para la secuenciación genómica de especies homólogas (TGSC, 2008), pero de los que se tenían reportes de la actividad biológica de los productos proteicos sintetizados a partir del polímero

nucleotídico correspondiente (Martínez-Pérez F, Bendena WG, Chang BS, Tobe SS. *FGLamide Allatostatin genes in Arthropoda: introns early or late?* Peptides. 2009 Jul;30(7):1241-8; Elliott KL, Chan KK & Stay B. *Evidence for a Phe-Gly-Leu-amide-like allatostatin in the beetle Tenebrio molitor.* 2010 Peptides. Mar 31(3):402-7).

5

EJEMPLO 6. Secuenciación genómica de tercera generación del genoma de la bacteria *Kocuria rhizophila*.

Para determinar la eficiencia de las mezclas de la invención en tecnologías de
10 secuenciación de tercera generación a partir de polímeros nucleotídicos ricos en GC, se
seleccionó la especie bacteriana *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, cuya composición
nucleotídica aproximada es A-T 29,8% – G-C 71,2% (Takarada H, Sekine M, Kosugi H,
Matsuo Y, Fujisawa T, Omata S, Kishi E, Shimizu A, Tsukatani N, Tanikawa S, Fujita N,
Harayama S. *Complete genome sequence of the soil actinomycete Kocuria rhizophila.* J
15 Bacteriol. Jun 2008; 190(12):4139-46) y se empleó la Mezcla L (Tabla 3).

La secuenciación genómica se realizó con el sistema Flx + 454-ROCHE⁸ en formato
1x550. Para ello, la Biblioteca se construyó con insertos de 1500 pb y su titulación se
realizó de acuerdo al protocolo propuesto por el manual Rapid Library Preparation
20 Manual GS FLX+ and GS Junior+ Series - XL⁹.

Para la reacción de emulsión, en la cual se generan los microreactores para la
incorporación de los polímeros nucleotídicos de la Biblioteca a las microesferas,
únicamente se modificó la concentración nucleotídica y se incluyó el coadyuvante en la
25 mezcla de nucleótidos para la polimerización, el resto del proceso se realizó según el
protocolo indicado en el manual emPCR Amplification Manual - Lib-L GS Junior and GS
Junior+ Series¹⁰.

⁸ <http://454.com/products/gs-flx-system/>

⁹ http://454.com/downloads/my454/documentation/gs-flx-plus/Rapid-Library-Preparation-Method-Manual_XLPlus_May2011.pdf

¹⁰ http://454.com/downloads/my454/documentation/gs-flx-plus/emPCR-Amp-Lib-L-LV-Method-Manual_XLPlus_May2011.pdf

La primera modificación se realizó con la Mezcla L. En la segunda, se adiciono una mezcla comercial con proporciones equimolares y DMSO al 5% (p/p) como coadyuvante. Para la tercera, se empleó la Mezcla L junto con el DMSO al 5% (p/p). Posteriormente, la secuenciación de los productos poliméricos obtenidos del proceso anterior se realizó de acuerdo al Manual Sequencing GS Junior + Series - XL+ Kit¹¹.

Como se puede observar en la Tabla 5, la inclusión de la Mezcla L en la emulsión cambió radicalmente la secuenciación de tercera generación en comparación con la mezcla comercial, puesto que la calidad de la polimerización a nivel de su fidelidad, respecto al genoma de referencia, fue muy alta. Con la inclusión de DMSO en la Mezcla comercial se triplicó el número de nucleótidos totales (Mb) y se duplicó el número de lecturas y la longitud promedio; mientras que, la inclusión de DMSO en la Mezcla L genera productos pequeños pero de una muy alta fidelidad.

Tabla 5

Mezcla de dNTPs	Mb totales	Longitud promedio de pares de bases	Read de mayor tamaño.	No. Reads
¹ Mezcla Comercial	24	311	970	77713
² Mezcla D	13	289	708	47439
¹ Mezcla Comercial + DMSO 5%	88	513	982	171231
² Mezcla D + DMSO 5%	6	183	606	35695

¹ Mezcla Comercial con cantidades equimolares de nucleótidos.

² Mezcla L A-T<<G-C con proporción de nucleótidos A-T 15,0% : G-C 35,0%.

Estos resultados confirman que la presencia de DMSO en la polimerización, mejora significativamente la secuenciación de polímeros nucleotídicos por procedimientos de tercera generación y genera resultados más confiables en cuanto a la calidad del polímero obtenido.

EJEMPLO 7. Transcripción *in vitro* de polímeros nucleotídicos.

¹¹ http://454.com/downloads/my454/documentation/gs-flx-plus/GS-FLXPlus_Sequencing_Method-Manual_XLPlusKit_May2011.pdf

- Para la producción de polímeros nucleotídicos en forma de ARN, se puede utilizar cualquier Kit comercial que contenga los nucleótidos (dNTPs) y una ARN polimerasa. Uno de estos kits puede ser MEGAscript® T7 Transcription kit¹² que incluye los cuatro nucleótidos de forma independiente para obtener cualquiera de las mezclas mencionadas
- 5 en los Ejemplos 1 a 6. Para ello, se prepara una mezcla de dNTPs con las proporciones de la Mezcla W, como se indica en la Tabla 4. Finalizada la polimerización, el ARN se purifica y recupera siguiendo las indicaciones del producto o por métodos químicos o físicos convencionales.

¹² <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1334>

REIVINDICACIONES

- 1) Una mezcla de nucleótidos (dNTPs) que comprende adenina (A), timina (T), uracilo (U), guanina (G) y citosina (C) y/o sus análogos, en donde la concentración molar de cada uno de los dNTPs se encuentra en los rangos de porcentaje indicados a continuación, en una proporción 1:1 mol/mol de A-T ó A-U y 1:1 mol/mol de G-C, y cuya suma total en porcentaje es 100,0%.

A-T o A-U (% mol/mol)	G-C (% mol/mol)	Porcentaje Total AT (AU) + GC
26,1 - 30,0	20,0 - 23,9	100,0 %
30,1 - 33,9	16,1 - 19,9	100,0 %
34,0 - 45,0	5,0 - 16,0	100,0 %
20,0 - 23,9	26,1 - 30,0	100,0 %
16,1 - 19,9	30,1 - 33,9	100,0 %
5,0 - 16,0	34,0 - 45,0	100,0 %

- 2) La mezcla de dNTPs de acuerdo con la Reivindicación 1, que adicionalmente comprende uno o más coadyuvantes y un vehículo aceptable.
- 3) La mezcla de dNTPs de acuerdo con la Reivindicación 2, donde los coadyuvantes se seleccionan de solventes, diluyentes, sales, reguladores de pH, cofactores, enzimas y compuestos químicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), tetracloruro de etilamonio (TAE-Cl), tetracloruro de metilamonio (TAM-Cl), en concentraciones entre 0,1% y 99,9% p/p.
- 4) La mezcla de la Reivindicación 1, que comprende los siguientes porcentajes de dNTPs:

A-T (% mol/mol)	G-C (% mol/mol)	Porcentaje Total AT o (AU) + GC
30,0	20,0	100,0 %
20,0	30,0	100,0 %
33,0	17,0	100,0 %
17,0	33,0	100,0 %
35,0	15,0	100,0 %
15,0	35,0	100,0 %

5) La mezcla de la Reivindicación 1, que comprende los siguientes porcentajes de dNTPs:

A-U (% mol/mol)	G-C (% mol/mol)	Porcentaje Total AT o (AU) + GC
30,0	20,0	100,0 %

5

6) La mezcla de dNTPs de acuerdo con la Reivindicación 4 o 5, que adicionalmente comprende uno o más coadyuvantes y un vehículo aceptable.

7) Un procedimiento para la amplificación y secuenciación de polímeros de ácidos nucleicos caracterizado porque emplea una o más de las mezclas de nucleótidos dNTPs de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 5.

8) El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 7, en donde la amplificación y secuenciación se lleva a cabo aplicando técnicas moleculares que incluyen: hibridación, síntesis de ácido ribonucleico complementario (ADNc o cDNA), amplificación de ácidos nucleicos, secuenciación de ácidos nucleicos, predicción por medio de tecnologías electrónicas, informáticas o manuales que permitan determinar la complementariedad entre secuencias nucleotídicas y la concentración de sus componentes en el polímero.

9) El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:

- a) purificar los polímeros nucleotídicos presentes en una muestra de cualquier origen;
- b) poner en contacto una muestra del polímero nucleotídico que se desee amplificar o secuenciar con al menos una de las mezclas de dNTPs;
- c) llevar a cabo una reacción de síntesis de polímeros nucleotídicos complementarios y/o su amplificación o secuenciación en condiciones adecuadas de medio de reacción, pH y temperatura; y
- d) establecer si el polímero nucleotídico obtenido corresponde en tamaño, composición y orden nucleotídico esperado de forma directa o indirecta.

FIG. 1.

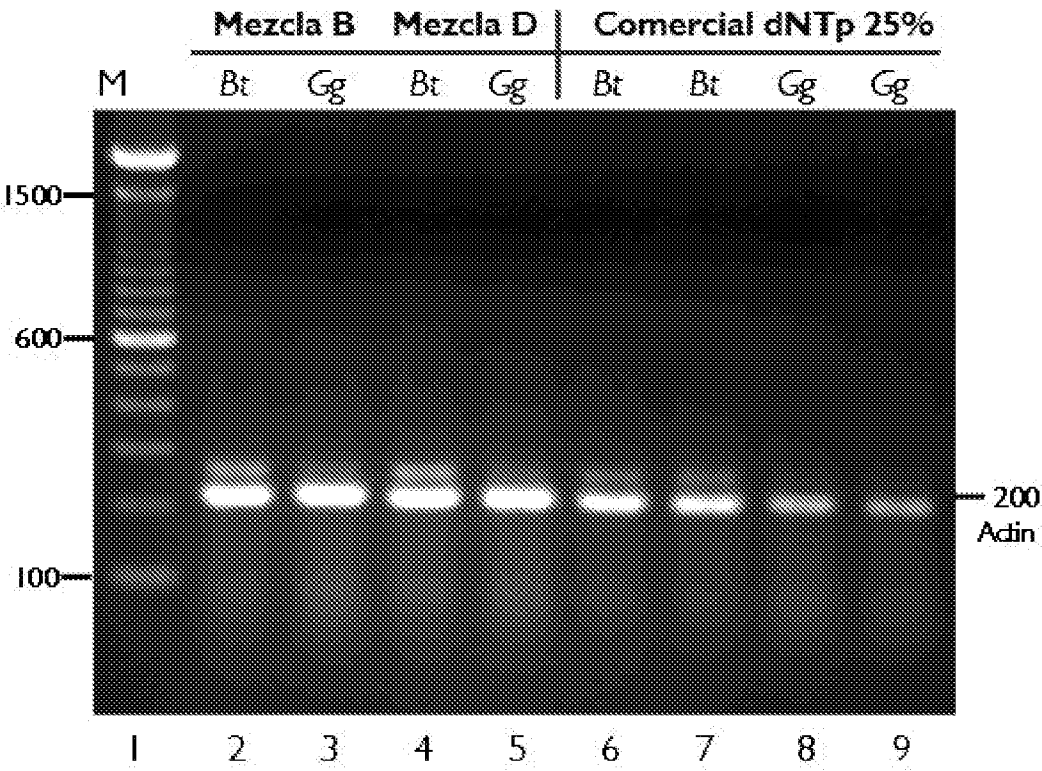


FIG. 2

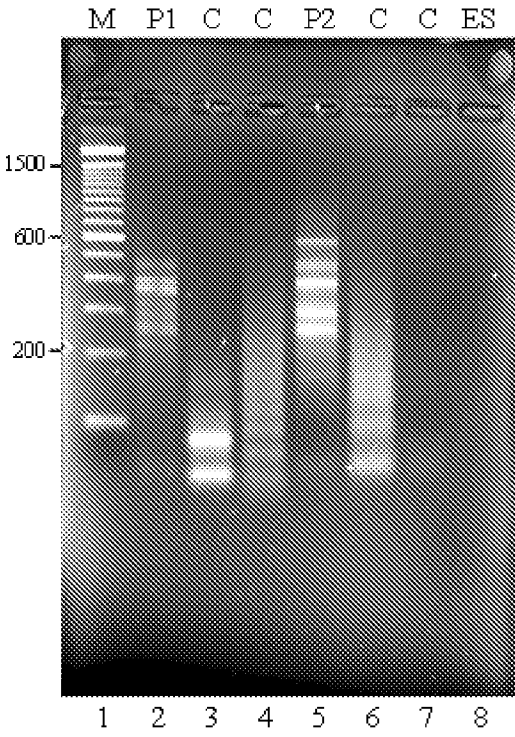


FIG. 3

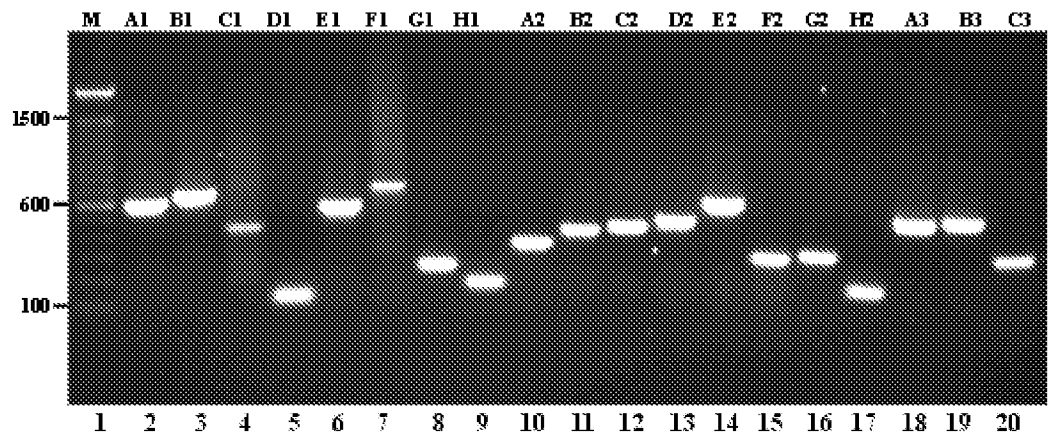


FIG. 4

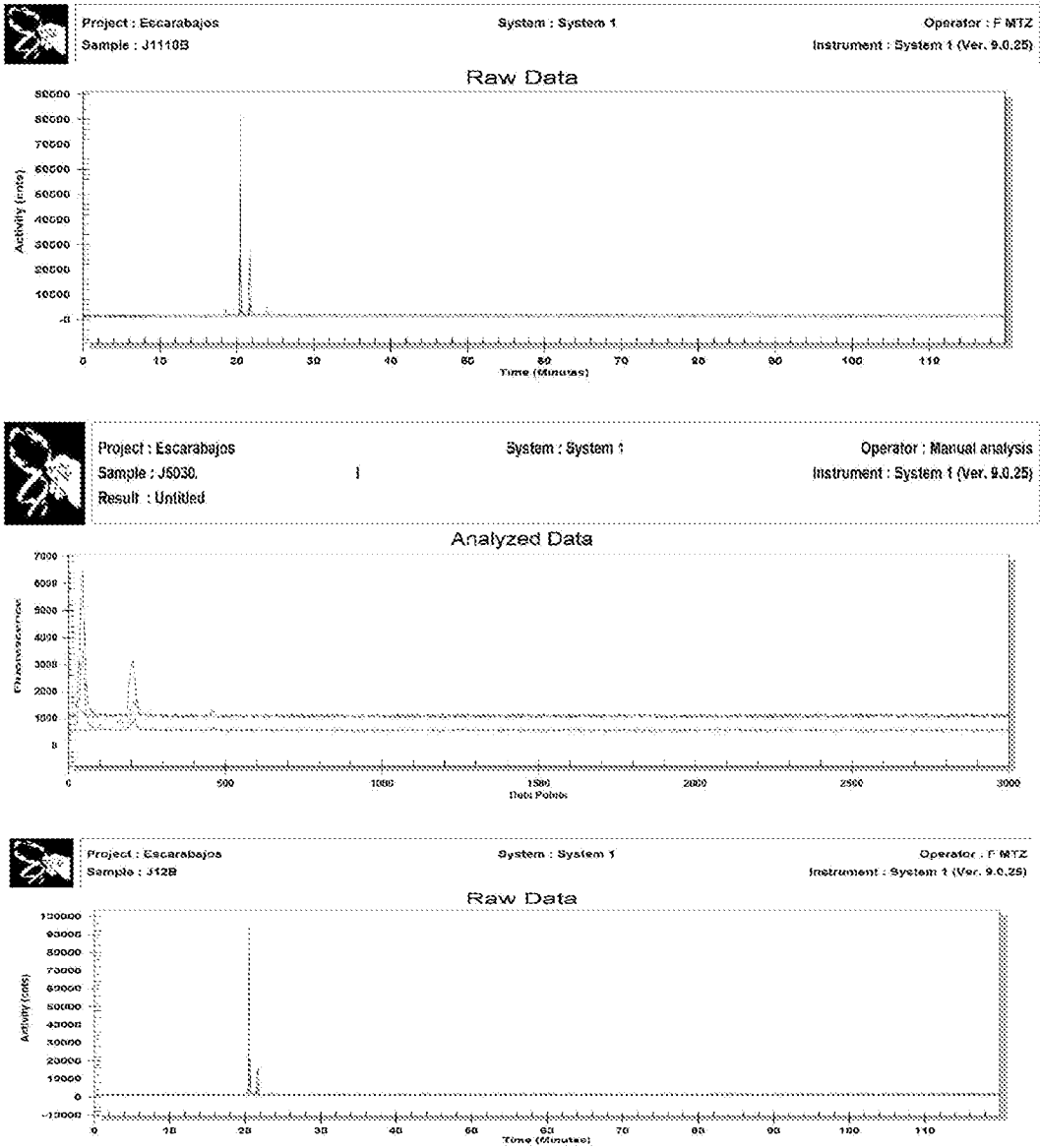


FIG. 5

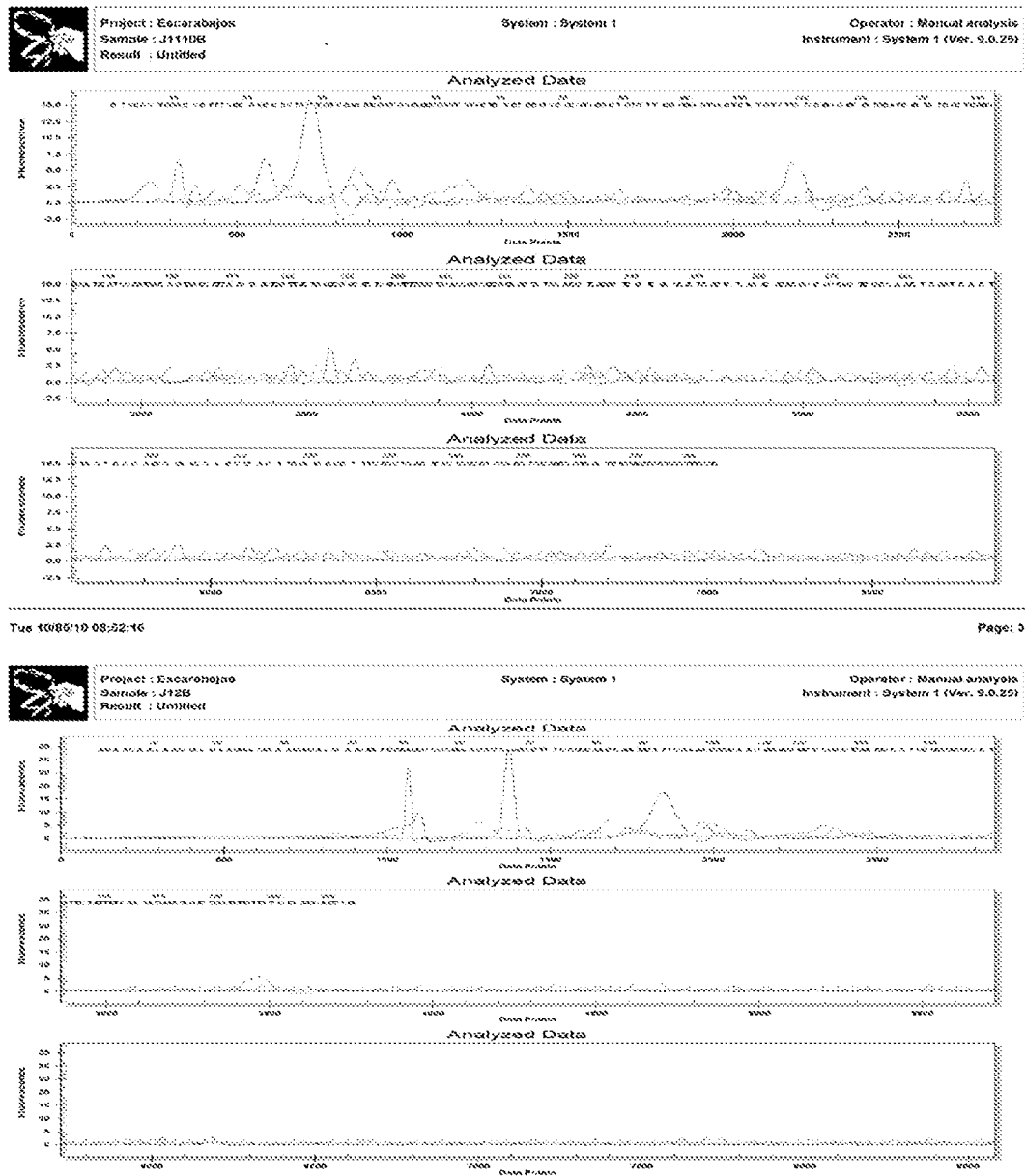
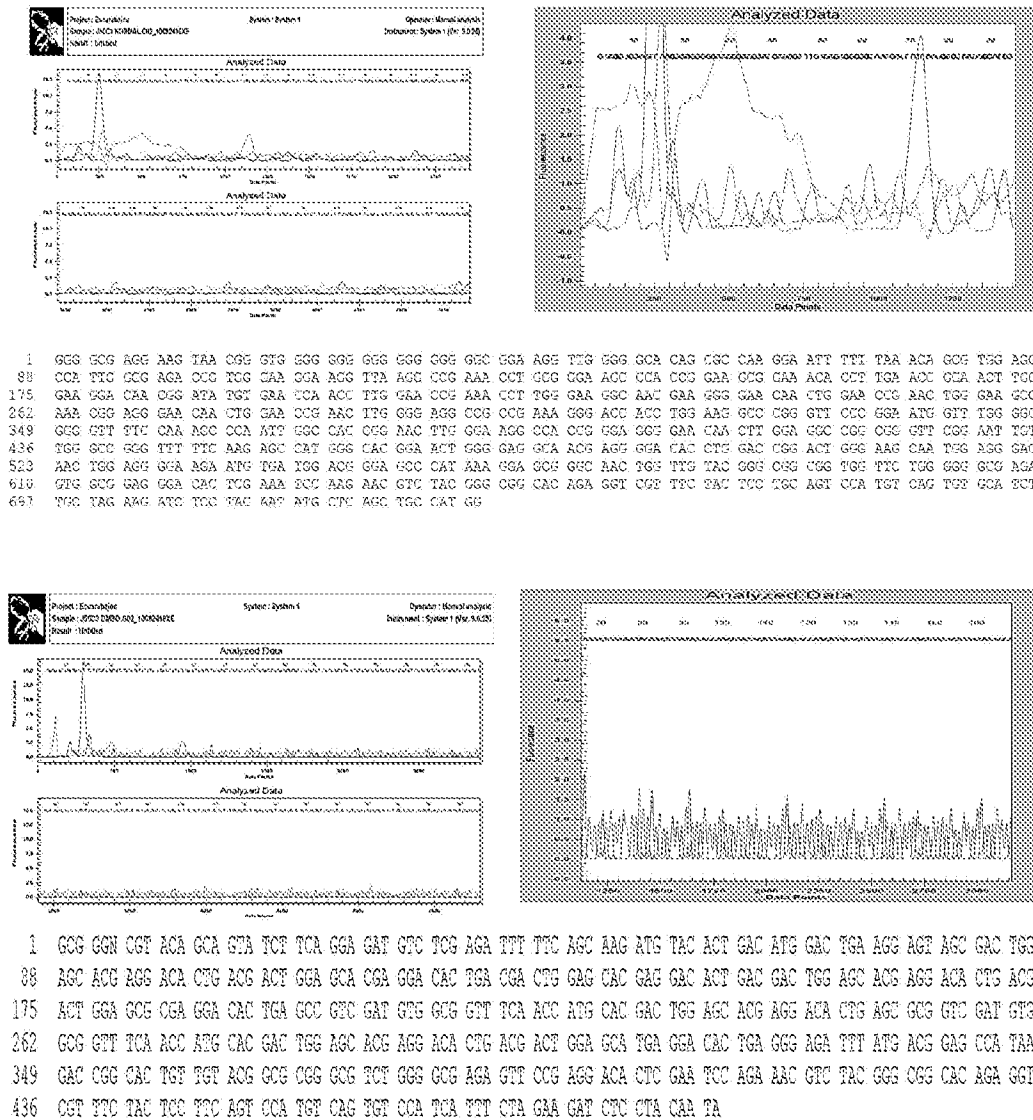


FIG. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2018/053091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(CIP): C12Q1/68 (2018.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

(CIP): C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN (EMBASE, BIOSIS, USPATFULL), ESP@CENET, GOOGLE SCHOLAR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8409805 B2 (ASURAGEN, INC.) 02 April 2013 The whole document	1-4, 6-9
Y		1-9
Y	VAN PELT-VERKUIL, E. et al. Deoxynucleotide Triphosphates and Buffer Components. In: Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, pp 91-101. DOI:10.1007/978-1-4020-6241-4_6 [Recuperado: 14 abril 2018]. Recuperado desde: < https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6241-4_6 > Page 91	1-9
A	US 5976842 A (CLONTECH LABORATORIES, INC) 02 November 1999 The whole document	
A	FROMANT, M. et al. Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry, 1995, 224(1): 347-353. DOI: 10.1006/abio.1995.1050. The whole document	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14/06/2018

14 June 2018

Date of mailing of the international search report

05/09/2018

05 September 2018

Name and mailing address of the ISA/

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2018/053091

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2018/053091

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 8409805 B2	02-04-2013	US2010209970 (A1) AU2010213981 (A1) AU2010213981 (B2) AU2010213981 (C1) BRPI1008778 (A2) CN102395686 (A) CN102395686 (B) EP2396426 (A1) EP2396426 (B1) IL214326 (A) KR20110120923 (A) KR101784527 (B1) RU2011137526 (A) WO2010093552 (A1) ZA201105632 (B)	19-08-2010 18-08-2011 28-11-2013 26-06-2014 06-09-2016 28-03-2012 13-05-2015 21-12-2011 26-11-2014 31-03-2015 04-11-2011 11-10-2017 20-03-2013 19-08-2010 25-04-2012
US 5976842 A	02-11-1999	NONE	

(Continuation of Box III)

The set of claims does not have a single inventive concept linking all the claims. The common feature shared by all the claims of the present application is that of dNTP mixtures in which the ratio of AT/CG is other than 1. However, an a posteriori analysis showed that this common feature is already known from the prior art (US8409805 B2, ASURAGEN, INC. 02.04.2013). This document discloses solutions comprising dNTPs with a ratio of GC/AT higher than 1. Therefore, this feature cannot be considered to be a common inventive concept and, consequently, the application does not meet the requirement of unity of invention. Each dNTP percentage range indicated in the table in claim 1 is considered to correspond to a different inventive concept.

As a result, the following groups of inventions have been identified:

GROUP 1: Claim 5 (in full) and claims 1-4 and 6-9, limited to the dNTP mixture in which the molar ratio of A:T or A:U and G:C equals 1:1 and the molar concentration of each of the dNTPs equals 26.1 to 30% mol/mol A-T or A-U and 20.0 to 23.9% mol/mol G-C; and process using this mixture.

GROUP 2: Claims 1-4 and 6-9, limited to the dNTP mixture in which the molar ratio of A:T or A:U and G:C equals 1:1 and the molar concentration of each of the dNTPs equals 30.1 to 33.9% mol/mol A-T or A-U and 16.1 to 19.9% mol/mol G-C; and process using this mixture.

GROUP 3: Claims 1-4 and 6-9, limited to the dNTP mixture in which the molar ratio of A:T or A:U and G:C equals 1:1 and the molar concentration of each of the dNTPs equals 34.0 to 45.0% mol/mol A-T or A-U and 5.0 to 16.0% mol/mol G-C; and process using this mixture.

GROUP 4: Claims 1-4 and 6-9, limited to the dNTP mixture in which the molar ratio of A:T or A:U and G:C equals 1:1 and the molar concentration of each of the dNTPs equals 20.0 to 23.9% mol/mol A-T or A-U and 26.1 to 30.0% mol/mol G-C; and process using this mixture.

GROUP 5: Claims 1-4 and 6-9, limited to the dNTP mixture in which the molar ratio of A:T or A:U and G:C equals 1:1 and the molar concentration of each of the dNTPs equals 16.1 to 19.9% mol/mol A-T or A-U and 30.1 to 33.9% mol/mol G-C; and process using this mixture.

GROUP 6: Claims 1-4 and 6-9, limited to the dNTP mixture in which the molar ratio of A:T or A:U and G:C equals 1:1 and the molar concentration of each of the dNTPs equals 5.0 to 16.0% mol/mol A-T or A-U and 34.0 to 45.0% mol/mol G-C; and process using this mixture.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2018/053091

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP): C12Q1/68 (2018.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

(CIP): C12Q1/68

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

STN (EMBASE, BIOSIS, USPATFULL), ESP@CENET, GOOGLE SCHOLAR

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 8409805 B2 (ASURAGEN, INC.) 02 abril 2013	1-4, 6-9
Y	Todo el documento.	1-9
Y	VAN PELT-VERKUIL, E. et al. Deoxynucleotide Triphosphates and Buffer Components. In: Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, pp 91-101. DOI:10.1007/978-1-4020-6241-4_6 [Recuperado: 14 abril 2018]. Recuperado desde: < https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6241-4_6 > Página 91	1-9
A	US 5976842 A (CLONTECH LABORATORIES, INC) 02 noviembre 1999 Todo el documento.	

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

14/06/2018

14/junio/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

05/09/2018

05/septiembre/2018

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile

N° de fax

Funcionario autorizado

GARRIDO GAMBOA, Carolina

N° de teléfono 56-2-28870551

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2018/053091

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	FROMANT, M. et al. Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry, 1995, 224(1): 347-353. DOI: 10.1006/abio.1995.1050. Todo el documento.	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2018/053091

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

(Ver hoja adicional)

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

(Recuadro III)

El pliego de reivindicaciones no tiene un único concepto inventivo que vincule todas las reivindicaciones. La característica común que tienen todas las reivindicaciones de la presente solicitud corresponde a mezclas de dNTPs en las cuales, las proporciones de AT/CG son distintas de 1. Sin embargo, como resultado de un análisis *a posteriori*, se concluye que dicha característica común ya es conocida en el arte previo (US 8409805 B2, ASURAGEN, INC. 02-04-2013). Dicho documento divulga soluciones que comprenden dNTPs en una razón GC/AT mayor a 1. Por lo tanto, dicha característica no puede ser considerada como concepto común inventivo y, en consecuencia, la solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención. Se considera que cada rango de porcentaje de dNTPs dado en la tabla de la reivindicación 1, correspondería a un concepto inventivo diferente.

Como resultado, se han identificado los siguientes grupos de invenciones:

GRUPO 1: reivindicación 5 completa y reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9 restringidas a mezcla de dNTPs, donde la proporción molar de A:T o A:U y G:C es 1:1 y la concentración molar de cada uno de los dNTPs es de 26,1 a 30% mol/mol de A-T o A-U y de 20,0 a 23,9% mol/mol para G-C; y procedimiento que usa dicha mezcla.

GRUPO 2: reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9 restringidas a mezcla de dNTPs, donde la proporción molar de A:T o A:U y G:C es 1:1 y la concentración molar de cada uno de los dNTPs es de 30,1 a 33,9% mol/mol de A-T o A-U y de 16,1 a 19,9% mol/mol para G-C; y procedimiento que usa dicha mezcla.

GRUPO 3: reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9 restringidas a mezcla de dNTPs, donde la proporción molar de A:T o A:U y G:C es 1:1 y la concentración molar de cada uno de los dNTPs es de 34,0 a 45,0% mol/mol de A-T o A-U y de 5,0 a 16,0% mol/mol para G-C; y procedimiento que usa dicha mezcla.

GRUPO 4: reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9 restringidas a mezcla de dNTPs, donde la proporción molar de A:T o A:U y G:C es 1:1 y la concentración molar de cada uno de los dNTPs es de 20,0 a 23,9% mol/mol de A-T o A-U y de 26,1 a 30,0% mol/mol para G-C; y procedimiento que usa dicha mezcla.

GRUPO 5: reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9 restringidas a mezcla de dNTPs, donde la proporción molar de A:T o A:U y G:C es 1:1 y la concentración molar de cada uno de los dNTPs es de 16,1 a 19,9% mol/mol de A-T o A-U y de 30,1 a 33,9% mol/mol para G-C; y procedimiento que usa dicha mezcla.

GRUPO 6: reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9 restringidas a mezcla de dNTPs, donde la proporción molar de A:T o A:U y G:C es 1:1 y la concentración molar de cada uno de los dNTPs es de 5,0 a 16,0% mol/mol de A-T o A-U y de 34,0 a 45,0% mol/mol para G-C; y procedimiento que usa dicha mezcla.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/IB2018/053091

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
US 8409805 B2	02-04-2013	US2010209970 (A1)	19-08-2010
		AU2010213981 (A1)	18-08-2011
		AU2010213981 (B2)	28-11-2013
		AU2010213981 (C1)	26-06-2014
		BRPI1008778 (A2)	06-09-2016
		CN102395686 (A)	28-03-2012
		CN102395686 (B)	13-05-2015
		EP2396426 (A1)	21-12-2011
		EP2396426 (B1)	26-11-2014
		IL214326 (A)	31-03-2015
		KR20110120923 (A)	04-11-2011
		KR101784527 (B1)	11-10-2017
		RU2011137526 (A)	20-03-2013
		WO2010093552 (A1)	19-08-2010
		ZA201105632 (B)	25-04-2012
US 5976842 A	02-11-1999	Ninguno	