

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 517**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2020** **PCT/NL2020/050261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2020** **WO20218924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2020** **E 20721838 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024** **EP 3959335**

54 Título: **Métodos y composiciones para la amplificación isotérmica del ADN**

30 Prioridad:

23.04.2019 NL 2022993

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2024

73 Titular/es:

SYNVOLUX IP B.V. (100.0%)
J.H. Oortweg 19
2333 CH Leiden, NL

72 Inventor/es:

ZONDAG, GERBEN CAROLUS MARTINUS;
TEUNISSE, BRAM JOHANNES y
PAOLINI, NAHUEL ALEJANDRO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 992 517 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 composiciones para la amplificación isotérmica del ADN

Campo:

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Además, la solicitud proporciona métodos, composiciones y kits para replicar o amplificar plantillas de ADN nativas o desnaturalizadas en condiciones isotérmicas. Más específicamente, la invención está dirigida al uso de una ARN polimerasa en métodos para amplificar una plantilla de ADN sin o con cebadores oligonucleótidos añadidos exógenamente reducidos.

1 Introducción

Existen varias técnicas para la amplificación de moléculas de ADN. Estas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que implica rondas repetitivas de reacciones a diferentes temperaturas, y reacciones isotérmicas que casi todas involucran una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena. Ejemplos de reacciones isotérmicas incluyen la amplificación por círculo rodante (RCA), la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que involucra cebadores específicos para generar moléculas de ADN cuasi circulares, la amplificación dependiente de helicasa (HDA) y la reacción de amplificación por enzima de corte (NEAR), que implican la generación de cortes en la molécula de ADN que se utilizan para iniciar la replicación.

La replicación de una molécula de ADN requiere un grupo hidroxilo libre que sirve como punto de partida para la adición de desoxirribonucleótidos por una ADN polimerasa. Normalmente, se añaden exógenamente oligonucleótidos cortos y monocatenarios o cebadores complementarios a la molécula de ADN plantilla para preparar la replicación de una molécula de ADN por una ADN polimerasa. Dichos cebadores monocatenarios pueden comprender una secuencia de nucleótidos específica para amplificar una plantilla de ADN específica, o comprender una o más secuencias de nucleótidos genéricas y/o degeneradas para amplificar plantillas de ADN de manera semialeatoria. Dichas secuencias de nucleótidos genéricas comprenden, por ejemplo, oligorribonucleótidos aleatorios, cebadores de ADN hexaméricos aleatorios y nonaméricos aleatorios.

Como alternativa, la replicación del ADN puede ser iniciada por un monofosfato de desoxirribonucleósido que está unido covalentemente a una proteína. Dichas proteínas son utilizadas en la naturaleza por ciertos virus bacterianos o animales para la replicación del genoma en las células huésped (Salas, 1991. Annu. Rev. Biochem. 60: 39-71) pero actualmente carecen de una aplicación amplia para otros usos. Además, una clase separada de enzimas, denominadas primasa-polimerasas (PrimPol), comprenden actividades tanto de ADN polimerasa como de ADN primasa y pueden usarse tanto para la síntesis de cebadores como para la replicación de una molécula de ADN. Dichas PrimPols, a diferencia de las primasas convencionales, generan cebadores de ADN (Lipps et al., 2003. EMBO J 22: 2516-2525). Un PrimPol aislado de *Thermus thermophilus* se ha descubierto que proporciona excelentes resultados en la amplificación de genomas completos a partir de células individuales, en comparación con el cebado aleatorio (Picher et al., 2016. Nature Comm 7: 13296).

En el estado actual de la técnica, la replicación *in vitro* de una plantilla de ADN, especialmente de moléculas de ADN grandes como genomas completos, se basa principalmente en la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA). MDA es un método de amplificación isotérmica que emplea cebadores de oligonucleótidos y una ADN polimerasa que desplaza cadenas, como la ADN polimerasa Phi29, para amplificar exponencialmente una molécula de ADN plantilla (Dean et al., 2001. Genome Res. 11(6): 1095-1099; Dean et al., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. 99(8): 5261-5266). La ADN polimerasa Phi29 combina alta procesividad, actividad de desplazamiento de cadena y actividad exonucleasa de corrección de errores de 3' a 5', lo que da como resultado la síntesis de fragmentos de ADN >70 kb con tasas de error muy bajas (Blanco et al., 1989. J Biol Chem 264: 8935-8940; Garmendia et al., 1992. J Biol Chem 267: 2594-2599; Esteban et al., 1993. J Biol Chem 268: 2719-26).

Si bien el ADN nativo comúnmente existe como una estructura de doble hélice, el uso de oligonucleótidos aleatorios, ya sean específicos o degenerados, como los cebadores hexaméricos, requiere ADN desnaturalizado o monocatenario para un cebado eficiente. La desnaturalización del ADN mediante calor o métodos químicos puede provocar roturas de cadenas y otros daños perjudiciales al ADN plantilla inicial, lo que es altamente indeseable y posiblemente perjudicial para el análisis posterior. Además, el uso de cebadores aleatorios a menudo da como resultado una amplificación sesgada del ADN plantilla, errores de secuenciación debido a un cebado incorrecto y/o una amplificación no específica por autocebado de los oligonucleótidos aleatorios (véase, por ejemplo, Hansen et al., 2010. Nucleic Acids Res 38: e131; van Gurp et al., 2013. PLoS ONE 8(12): e85583; Sabina and Leamon 2015. Methods Mol Biol. 1347:15-41). Algunos de estos problemas se resuelven en parte mediante el uso de un PrimPol aislado de *Thermus thermophilus* (Richer et al., 2016. Nature Comm 7: 13296), que posee actividad primasa intrínseca sin necesidad de oligonucleótidos añadidos exógenamente. Sin embargo, tanto los oligonucleótidos aleatorios como PrimPol requieren o favorecen el ADN monocatenario o desnaturalizado como plantilla para un cebado eficiente. La desnaturalización se puede lograr

al elevar la temperatura o añadiendo una solución altamente alcalina, seguida de la neutralización de la solución antes de la replicación. Estos pasos de desnaturalización adicionales son propensos a generar artefactos como daños o roturas del ADN plantilla y aumentan el riesgo de contaminación. Por lo tanto, es preferible evitar una etapa de desnaturalización adicional, especialmente en métodos de replicación de ADN de alto rendimiento y en casos de plantillas de ADN delicadas o escasas. Los documentos EP2206789 y WO0041524 describen otros métodos de amplificación en ausencia de un cebador.

Por lo tanto, existe una necesidad de un método de replicación de ADN que no requiera cebadores de oligonucleótidos y/o la etapa adicional de desnaturalizar la molécula de plantilla de ADN.

2 Breve descripción de la invención

En este documento se proporcionan métodos y el uso de composiciones y kits para la amplificación de una plantilla o ADN diana en ausencia de, o con cantidades reducidas de, cebadores de oligonucleótidos. El ADN objetivo puede ser una molécula circular, como un plásmido, un cósmido o una sonda de clonado de ADN circularizada, o una molécula lineal, como un genoma, uno o más fragmentos genómicos o fragmentos de ácido nucleico generados sintéticamente o enzimáticamente. Una molécula de ADN plantilla puede tener forma monocatenaria o bicatenaria.

La invención proporciona un método para amplificar una molécula de ADN plantilla, que comprende a) proporcionar una molécula de ADN plantilla; b) proporcionar una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena y una combinación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos; c) incubar dichos materiales en un tampón adecuado y durante una cantidad de tiempo adecuada para permitir la replicación y amplificación de dicha molécula de ADN plantilla, en el que el cebado por dicha ARN polimerasa dependiente del promotor ocurre independientemente de una secuencia promotora de consenso.

Dicha molécula de ADN plantilla, ARN polimerasa, ADN polimerasa y nucleótidos se incuban preferiblemente en dicho tampón adecuado a temperatura constante dentro de un rango de 3 °C, 6 °C o 12 °C durante un período de tiempo adecuado.

Dicha ARN polimerasa es un miembro de la familia de las ARN polimerasas de subunidad única. Se selecciona una ARN polimerasa preferida del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas.

Dicha ADN polimerasa dependiente de ADN tiene actividad de desplazamiento de cadena. Se selecciona una ADN polimerasa preferida entre Phi29, Bst, Vent ADN polimerasa o una combinación o variantes de las mismas.

En un método preferido de la invención, dichos ribonucleótidos comprenden como máximo tres ribonucleótidos, de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina, tal como adenina o guanina, o una combinación de las mismas.

La replicación y amplificación de una molécula de ADN plantilla mediante los métodos de la invención se puede realizar además en presencia de al menos un cebador oligonucleotídico complementario a la molécula de ADN plantilla, una mezcla de cebadores oligonucleotídicos aleatorios o una combinación de los mismos.

En los métodos de la invención, uno de los nucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente al menos una especie de los nucleótidos o ribonucleótidos, se modifica o marca, preferiblemente con una etiqueta detectable.

Un producto amplificado que se replica y amplifica mediante los métodos de la invención, puede detectarse directa o indirectamente mediante fluorescencia y/o por medios químicos, por ejemplo mediante una sonda marcada con biotina o fluoróforo, y/o mediante amplificación en presencia de un dNTP conjugado con fluoróforo.

La invención proporciona además el uso de una ARN polimerasa de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, para iniciar el cebado en una plantilla de ADN y, opcionalmente, amplificar la plantilla de ADN a partir del cebador mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena en presencia de desoxirribonucleótidos, en el que el inicio del cebado ocurre en presencia de como máximo tres ribonucleótidos, de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina. Dicha iniciación del cebado incluye preferiblemente proporcionar al menos un ribonucleótido con una nucleobase de purina, más preferiblemente 2 o 3 ribonucleótidos seleccionados entre GTP, ATP y CTP.

Dicha ARN polimerasa de acuerdo con la invención puede utilizarse para amplificar una molécula de ADN plantilla monocatenario o bicatenario en forma lineal o circular, incluido el ADN genómico. El uso de una ARN polimerasa de acuerdo con la invención puede emplearse con fines terapéuticos, que incluye, pero no se limita a, terapia génica y vacunas, o con fines forenses o de diagnóstico, por ejemplo en genotipificación, secuenciación de ADN, detección de ADN viral o bacteriano o detección de una mutación de ácido nucleico.

Dicha ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única se selecciona preferiblemente del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas.

La invención proporciona además un uso de un kit de partes, que comprende una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de las ARN polimerasas de subunidad única, una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena, o una mezcla de las mismas, como máximo 3 ribonucleótidos de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina, desoxirribonucleótidos y, opcionalmente, una parte que contiene un tampón adecuado, para la amplificación de una molécula de ADN plantilla.

La invención proporciona además el uso de un kit de partes de acuerdo con la invención para la amplificación de una molécula de ADN plantilla, en donde la ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única se selecciona del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas.

3 Leyendas de figuras

Figura 1. Cebado de la amplificación de ADN por ARN polimerasas. Figura 1A. Productos de amplificación de ADN plasmídico circular tras el cebado por hexámeros aleatorios o por diferentes ARN polimerasas. El cebado por las ARN polimerasas ocurre en ausencia de cebadores oligonucleótidos añadidos exógenamente y parece ser independiente de sus secuencias promotoras cognadas. Plantillas utilizadas: Filas 1, sin control de plantilla; Filas 2, p53 (sin promotor de la ARN polimerasa); Filas 3: plásmido p3 que comprende un único promotor T7; Filas 4, plásmido pB327 que comprende dos promotores T7 invertidos; Filas 5, plásmido pBSK que comprende los promotores T3 y T7; Filas 6, plásmido pGem-7 que comprende los promotores T7 y SP6. Figura 1B. El análisis de enzimas de restricción (BsaI) ilustra la amplificación fiel del ADN del plásmido pB327 después de cebado con hexámeros aleatorios o con diferentes ARN polimerasas en presencia o ausencia de ribonucleótidos purinérgicos. Fila 1, marcador; Fila 2, cebadores hexaméricos (H); Fila 3, cebador hexamérico y GTP/ATP; Fila 4, ARN polimerasa T7 y GTP/ATP; Fila 5, ARN polimerasa T3 y GTP/ATP; Fila 6, ARN polimerasa SP6 y GTP/ATP; Fila 7, ARN polimerasa T7 sin GTP/ATP; Fila 8, control de digestión, plantilla pB327 de 250 ng.

Figura 2. Cebado por polimerasas de ARN en presencia de diferentes ribonucleótidos. Fig. 2A. Dependencia de ribonucleótidos de cebado mediado por polimerasa de ARN de la amplificación de ADN p53. Filas -, sin ribonucleótidos; Filas G, 0.5 mM de GTP; Filas A, 0.5 mM de ATP; Filas U, 0.5 mM de UTP; Filas C, 0.5 mM de CTP; Filas Pu, 0.25 mM de GTP y 0.25 mM de ATP; Filas Py, 0.25 mM de UTP y 0.25 mM de CTP; Filas N, 0.125 mM de los cuatro ribonucleótidos. Figura 2B. Amplificación del ADN del plásmido pB327 en condiciones con ARN polimerasas y concentraciones decrecientes de ribonucleótidos. Las concentraciones de GTP y ATP en micromolares se indican encima de cada fila. (-) no muestra controles de plantilla que contengan 1 mM de GTP y ATP.

Figura 3. Amplificación del ADN del plásmido pB327 nativo o desnaturalizado en presencia de ARN polimerasas en diferentes tiempos de incubación. Las reacciones en las filas 1 a 4 contenían 10 ng de ADN plasmídico nativo pB327, no desnaturalizado, como plantilla de partida. Las filas 5 a 8 contenían 10 ng de pB327, desnaturalizado por calor antes de la amplificación. Todas las reacciones comprenden 50 μ M de hexámeros, además de la ARN polimerasa indicada encima de cada fila.

Figura 4. Amplificación de la plantilla de ADN monocatenario circular M13mp18 seguida de digestión con XbaI. La banda inferior representa el producto correcto que migra alrededor de 7 kb. Fila 1, sin control de cebado; Fila 2, cebadores hexaméricos 50 μ M; Fila 3, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T7; Fila 4, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T3; Fila 5, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa SP6; Fila 6, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T7 y cebadores hexaméricos 50 μ M; Fila 7, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T3 y cebadores hexaméricos 50 μ M; Fila 8, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa SP6 y cebadores hexaméricos 50 μ M.

Figura 5. Amplificación específica del ADN genómico. Figura 5A. Amplificación de plantilla de ADN genómico HeLa de 1 ng/ μ l. Figura 5B. Amplificación no específica mediante cebadores hexaméricos en ausencia de plantilla. Filas 1, sin control de cebado; Filas 2, cebadores hexaméricos 50 μ M; Filas 3, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T7; Filas 4, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T3; Filas 5, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa SP6; Filas 6, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T7 y cebadores hexaméricos 50 μ M; Filas 7, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T3 y cebadores hexaméricos 50 μ M; Filas 8, 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa SP6 y cebadores hexaméricos 50 μ M.

Figura 6. Las ARN polimerasas mejoran y aumentan el rendimiento de la amplificación cebada con hexámeros de plantillas de ADN circulares. Figura 6A. Amplificación mejorada del ADN del plásmido p53 nativo en presencia de ARN polimerasas (RNAP). Sobre las filas se indica el tiempo de amplificación en horas. Figura 6B. (arriba y abajo) Cuantificación de la amplificación del ADN en el tiempo y las actividades relativas de las ARN polimerasas. Figura 6C. Amplificación mejorada del ADN del plásmido p53 desnaturalizado mediada por ARN polimerasas en presencia de las concentraciones de hexámeros indicadas (en micromolar). La plantilla

utilizada fue 0.5 ng/μl de ADN plasmídico p53 desnaturalizado, que no incluye una secuencia de promotor T7, T3 o SP6.

Figura 7. Amplificación de ADN mediada por ARN polimerasas y Phi29 obtenidos de diferentes proveedores comerciales. Fig. 7A. ARN polimerasas y ADN polimerasa phi29 de diferentes proveedores. Panel superior, Phi29 de Biolab Innovative Research Technologies (proveedor B); panel central, Phi29 de New England Biolabs (proveedor N); panel inferior, Phi29 de Thermo Fisher (proveedor T). Las filas - sin control de cebado, las filas H indican cebado de hexámeros. Las ARN polimerasas T7, T3 y SP6 obtenidas de New England Biolabs (N) o de Thermo Fisher (T) se utilizaron como se indica encima de cada fila. La plantilla utilizada en cada reacción fue 0.5 ng/μl de ADN plasmídico p53, que no incluye una secuencia de promotor T7, T3 o SP6. Fig. 7B. Amplificación en presencia de diferentes sistemas buffer.

Figura 8. Eficiencia de transfección y niveles de expresión del ADN amplificado en diferentes condiciones como se indica. Los paneles superiores ilustran la eficiencia de transfección (fracción de células que expresan GFP en la población celular total) y la intensidad fluorescente media (MFI) para las células HEK293 humanas, el panel inferior muestra los resultados para las células B16F10 de ratón. El cebado de la amplificación de ADN se inició mediante hexámeros aleatorios en ausencia (barras blancas rayadas) o presencia de ribonucleótidos (barras grises rayadas), o mediante la ARN polimerasa T7 (barras negras), la ARN polimerasa T3 (barras grises) o la ARN polimerasa SP6 (barras blancas) en presencia de ribonucleótidos.

Figura 9. Actividad de luciferasa a lo largo del tiempo en ratones inyectados con ADN plasmídico o ADN lineal, frente a ratones de control. Se indica la media y la desviación estándar de 4 ratones por grupo.

Figura 10. Vacunación con ADN plasmídico o ADN lineal. Figura 10A. Células T específicas del epítipo OVA como porcentaje del número total de células T CD8 positivas, inducidas por ADN plasmídico o ADN lineal, versus control. Figura 10B. El Gráficos de Kaplan-Meier de ratones vacunados que fueron inoculados con células tumorales B16-OVA 21 días después de la vacunación.

4 Descripción detallada de la invención

4.1 Definiciones

El término “molécula de ADN plantilla” o “plantilla de ADN”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una molécula de ADN que se va a replicar. Dicha plantilla de ADN puede ser cualquier molécula de ADN, incluyendo una molécula de ADN monocatenario o bicatenario, una molécula de ADN lineal o circular y una molécula de ADN pequeña o grande, desde moléculas de plásmido lineales o circulares de menos de 10 kilobases hasta moléculas de ADN grandes tales como moléculas de ADN genómico o plásmidos BAC.

El término “tampón adecuado”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una solución tamponada acuosa cuyo pH está en un valor casi constante. Un tampón adecuado para reacciones de replicación comprende sales metálicas divalentes, preferiblemente una sal de magnesio, como cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y/o acetato de magnesio.

El término “ARN polimerasa”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una enzima ARN polimerasa dependiente de ADN que produce una transcripción de ARN con plantilla de ADN. Dicha ARN polimerasa es un miembro de la familia de ARN polimerasas de subunidad única que incluye muchas ARN polimerasas de fagos (T7, T3, K11, SP6, N4 y otras) así como las ARN polimerasas mitocondriales (McAllister and Raskin, 1993. Mol Microbiol. 10: 1-6). Se selecciona una ARN polimerasa preferida del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas. Estas variantes incluyen, por ejemplo, las ARN polimerasas T7 mutantes capaces de utilizar ribonucleótidos y desoxinucleótidos canónicos y no canónicos como sustratos (Kostyuk et al., 1995. FEBS Lett. 369: 165-168; Sousa et al., 1995. EMBO J. 14(18): 4609-4621; Gudima et al., 1998. FEBS Lett. 439: 302-306; Padilla et al., 2002. Nucl. Acids Res. 30(24): e138), variantes de la ARN polimerasa que muestran una mayor termoestabilidad (Hi-T7™ RNA Polymerase from New England Biolabs; Boulain et al., 2013. Protein Eng Des Sel. 26(11): 725-734), o una ARN polimerasa mutante con especificidad de promotor disminuida (Ikeda et al., 1993. Biochemistry 32(35):9115-9124).

El término “ADN polimerasa”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una enzima ADN polimerasa dependiente de ADN que produce una molécula de ADN con plantilla de ADN. Dicha ADN polimerasa añade desoxirribonucleótidos al extremo 3' de una cadena de ADN.

El término “polimerasa de ADN que desplaza cadenas”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una polimerasa de ADN que es capaz de desplazar una cadena de ADN en dirección descendente de la secuencia. Por lo tanto, dicha enzima es capaz de desenrollar una molécula de ADN de doble cadena durante la replicación de dicha molécula. Dicha polimerasa carece preferentemente de una actividad exonucleasa 5'→3'. Una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena adecuada incluye el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, un fragmento Klenow de una *Bacillus stearothermophilus* ADN polimerasa denominada Bst polimerasa (New England Biolabs, Ipswich, MA), ADN polimerasa Bsm, fragmento grande (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), ADN polimerasa BcaBEST (Takara Bio, Kusatsu, Japón), *Thermoanaerobacter*

thermohydrosulfuricus (Tts) ADN polimerasa (US 5,744,312), una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus* o *Thermus thermophiles*, una variante de la ADN polimerasa dependiente de ADN T7 denominada SEQUENASE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), una ADN polimerasa dependiente de ADN T5 (Fujimura and Roop, 1976. J Biol Chem 251: 2168-2174), holoenzima aT4 ADN polimerasa (Kaboord y Benkovic, 1995. Curr Biol 5:149-157), una ADN polimerasa dependiente de ADN de *Thermococcus litoralis*, denominada polimerasa VENT (New England Biolabs, Ipswich, MA), ADN polimerasa del fago M2 (Matsumoto et al., 1989. Gene 84: 247), la ADN polimerasa del fago PRD1 (Jung et al., 1987. Proc Natl Acad Sci USA 84: 8287; Zhu and Ito, 1994. Biochim Biophys Acta 1219: 267-276), la ADN polimerasa Phi29 y cualquier mutante de la ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena de la misma, que incluye, por ejemplo, una fusión de una polimerasa con una proteína de unión al ADN (de Vega et al., 2010. PNAS 107: 16506-16511).

El término “ribonucleótido”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una molécula que comprende un grupo de azúcar ribosa, una nucleobase y al menos un grupo fosfato. Dicha nucleobase incluye adenina, guanina, citosina, uracilo y cualquier modificación de las mismas. Las nucleobases adenina y guanina se denominan colectivamente purinas, mientras que la citosina y el uracilo se denominan colectivamente pirimidinas. El término ribonucleótido incluye la referencia a un análogo de un ribonucleótido tal como una molécula fluorescente, por ejemplo 1,3-diaza-2-oxofenotiazina-ribosa-5'-trifosfato (tCTP), y/u otros análogos tales como inosina, xantosina, N4-hidroxicitosina, N4-metoxicitosina y 6H, 8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona (Suzuki et al., 2005. Nucleic Acids Symp Series 49: 97-98).

El término “desoxirribonucleótido”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una molécula que comprende un grupo de azúcar desoxirribosa, una nucleobase y al menos un grupo fosfato. Dicha nucleobase incluye la adenina, guanina, citosina, timidina y cualquier modificación de las mismas, presentes de forma natural. Las nucleobases adenina y guanina se denominan colectivamente purinas, mientras que la citosina y la timidina se denominan colectivamente pirimidinas. El término desoxirribonucleótido incluye la referencia a un análogo de un desoxirribonucleótido tal como una desoxiuridina, desoxiinosina y/o desoxixantosina.

El término “nucleótido”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido o cualquier variante o modificación del mismo. Se apreciará que se han realizado y descrito una gran variedad de modificaciones de nucleótidos que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la materia. El término nucleótido tal como se emplea en este documento abarca dichas formas de nucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente.

El término “cebador”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a un oligonucleótido que es eficaz para unirse a un ADN plantilla y cebar la replicación de dicho ADN plantilla mediante una ADN polimerasa. Dicho oligonucleótido puede añadirse exógenamente a una plantilla de ADN y puede comprender desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o una combinación o variantes de los mismos. Alternativamente, un cebador puede generarse a partir de una plantilla de ADN mediante una ARN polimerasa. Dicho cebador puede ser generado por una ARN polimerasa o variante de la misma en presencia de uno o más nucleótidos. Dichos nucleótidos comprenden preferiblemente ribonucleótidos, preferiblemente de 1 a 3 especies seleccionadas entre GTP, ATP y CTP, más preferiblemente comprende al menos una nucleobase de purina, tal como adenina o guanina, o ambas nucleobases de adenina y guanina. Dichas variantes incluyen análogos de oligonucleótidos sintéticos tales como fosforotioato, fosfotriéster, fosforotioato 2-alquilado y análogos de fosforamidoato, análogos con modificaciones en la posición 2' de anillos de azúcar de nucleósidos tales como 2'-fluoro, O-metilo o metoxietilo, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico puenteado y/o moléculas de ácido nucleico bloqueadas.

El término “sonda de candado”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a un oligonucleótido cuyos extremos son complementarios a secuencias adyacentes en una molécula de ARN o ADN de plantilla objetivo. La hibridación de una sonda de candado con su objetivo permite la circularización por ligadura. Una sonda de candado circularizada puede posteriormente servir como plantilla de ADN para la amplificación.

4.2 Métodos de la invención

La invención se basa en la observación inesperada de que una ARN polimerasa de la familia de las ARN polimerasas de subunidad única, como la ARN polimerasa T7, es capaz de mediar eficientemente el cebado la preparación de plantillas de ADN tanto nativas como desnaturalizadas para la amplificación posterior por una ADN polimerasa dependiente de ADN, en ausencia de una secuencia de promotor T7 de consenso y cebadores oligonucleotídicos añadidos exógenamente. Posteriormente se descubrió que también otras ARN polimerasas, como la ARN polimerasa SP6 y T3, pueden iniciar la amplificación del ADN en ausencia de una secuencia promotora de consenso SP6 o T3, respectivamente. Además, se ha demostrado que dichas ARN polimerasas inician el cebado de plantillas de ADN monocatenario. La naturaleza inesperada de los hallazgos radica en el hecho de que la actividad transcripcional de las ARN polimerasas dependientes de ADN, como las ARN polimerasas T7, T3 y SP6, se ha descrito ampliamente como altamente específica para sus respectivas secuencias promotoras, y que la unión de dichas ARN polimerasas solo ocurre en secuencias promotoras de ADN de doble cadena (Golomb et al., 1977. J Virol 21: 743-752; Stump and Hall, 1993. Nucleic Acids Res 21: 5480-5484; Maslak and Martin, 1993. Biochemistry 32: 4281-4285; Li et al., 1996. Biochemistry 35: 3722-3727).

El cebado por dicha ARN polimerasa de acuerdo con los métodos de la invención depende de la presencia de al menos un ribonucleótido. Para evitar la polimerización prolongada de las transcripciones de ARN, la reacción se realiza preferiblemente en presencia de como máximo 3 ribonucleótidos. Dichos 3 ribonucleótidos como máximo incluyen preferiblemente al menos un ribonucleótido de purina, tal como ATP o GTP, o una combinación de los mismos. Se prefiere que CTP y/o UTP se dejen fuera de la mezcla de reacción.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para amplificar una molécula de ADN plantilla, que comprende a) proporcionar una molécula de ADN plantilla; b) proporcionar una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena y una combinación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos; y c) incubar dichos materiales en un tampón adecuado y durante una cantidad de tiempo adecuada para permitir la replicación y amplificación de dicha molécula de ADN plantilla, y, opcionalmente, d) detectar el producto amplificado.

Dicha ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única media el cebado para una reacción de elongación posterior por una ADN polimerasa. Sin limitarse a la teoría, dicha ARN polimerasa se une al ADN plantilla y une un único nucleótido de ARN que puede servir como cebador para la elongación por una ADN polimerasa dependiente de ADN. Alternativamente, o además, dicha ARN polimerasa produce un tramo corto de ARN mediante un proceso denominado transcripción abortiva, en el que la ARN polimerasa se une a una molécula de ADN e inicia la síntesis de transcripciones cortas de ARNm. Dicha transcripción abortada puede implicar la fragmentación del ADN (Revyakin et al., 2006. Science 314: 1139-1143). Las transcripciones de ARNm cortas y abortadas se pueden utilizar como cebador de ribonucleótidos y se alargan mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN.

Una ARN polimerasa preferida es una ARN polimerasa T3, una ARN polimerasa SP6 y una ARN polimerasa T7. La ARN polimerasa más preferida es la ARN polimerasa T7.

Dicha ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza cadenas es preferiblemente la ADN polimerasa Phi29, Bst y/o Vent. La temperatura óptima de la polimerasa Phi29 es de unos 30 °C. La temperatura óptima de la polimerasa Bst es de 60-65 °C, mientras que la temperatura óptima de la polimerasa Vent es de unos 72 °C. Como la mayoría de las ARN polimerasas naturales son activas a 30-37 °C, la enzima de elección para combinarse con una ARN polimerasa T3, una ARN polimerasa SP6 o una ARN polimerasa T7 es la polimerasa Phi29. Sin embargo, para un experto en la materia quedará claro que una ARN polimerasa dependiente de ADN más termoestable se puede combinar con una polimerasa Bst o una polimerasa Vent a una temperatura de incubación más alta.

La ADN polimerasa Phi29 tiene una mayor procesividad y capacidad de desplazamiento de cadenas, en comparación con la ADN polimerasa Bst y/o Vent. Además, la ADN polimerasa Phi29 posee actividad de corrección de pruebas, lo que da como resultado una replicación altamente precisa (Garmendia et al., 1992. J. Biol. Chem. 267, 2594-2599). Por lo tanto, la ADN polimerasa dependiente de ADN con desplazamiento de cadena más preferida es la polimerasa Phi29. Sin embargo, otras ADN polimerasas dependientes de ADN que desplazan cadenas que son o serán conocidas también pueden ser adecuadas para su uso en los métodos de esta invención.

Un método de la invención se lleva a cabo durante un período de tiempo adecuado para amplificar la plantilla de ADN. Dicha cantidad de tiempo preferiblemente es de 0.5-48 horas, más preferiblemente de 1-24 horas, más preferiblemente de 2-20 horas, tal como al menos 5 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas o al menos 16 horas.

Un método de la invención se lleva a cabo en un tampón adecuado. Dicho tampón comprende preferiblemente un agente tampón para mantener el pH en un valor casi constante. Dicho agente tampón puede incluir fosfato, borato, ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), glicina y/o ácido [tris(hidroximetil)metilamino]propanosulfónico (TAPS). Un pH de reacción preferido para una polimerasa está entre 6 y 10, preferiblemente entre 7 y 9, tal como 7.2, 7.5, 7.8, 8.0, 8.1, 8.5, 8.6 o 8.8.

Un agente tampón preferido es o comprende Tris, preferiblemente Tris 10-100 mM. Dicho Tris se ajusta preferiblemente a un pH deseado mediante la adición de un ácido tal como acetato y/o cloruro de hidrógeno.

Un tampón adecuado para reacciones de replicación comprende además iones metálicos divalentes como Mg²⁺ o Mn²⁺. Los iones metálicos divalentes pueden proporcionarse como sales de los mismos, tales como cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y/o acetato de magnesio. Dicha concentración está preferiblemente entre 0.5 y 20 mM, tal como entre 1 y 10 mM, preferiblemente alrededor de 5-10 mM.

Los componentes adicionales de dicho tampón pueden incluir iones de potasio, como cloruro de potasio, otras sales como sulfato de amonio y/o betaína, etilenglicol, 1,2-propanodiol y/o espermidina, como se conoce en la técnica para mejorar la replicación de ciertas plantillas de ADN, como 2-10 % DMSO o 2-10 % glicerol (Cheng et al., 1994. Proc Natl Acad Sci 91: 5695-5699).

Preferiblemente, se incluyen ingredientes adicionales en el tampón de reacción para estabilizar la actividad enzimática, incluyendo gelatina, albúmina, agentes reductores como betamercaptoetanol, ditioneitol (DTT) y/o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y un detergente suave como, por ejemplo, TWEEN 20 o Triton-X 100.

5 En una realización, un tampón preferido comprende Tris-acetato, acetato de magnesio y acetato de potasio, más preferido Tris-acetato 33 mM, pH 7.9 a 37 °C, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM, 0.1 % (p/p) de Tween 20 y 1 mM de DTT.

En una realización, un tampón preferido comprende Tris-cloruro, cloruro de magnesio y sulfato de amonio, más preferido 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 a 25 °C), 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄ y 4 mM de DTT.

10 Un método de la invención puede incluir además el suministro de al menos un oligonucleótido exógeno como cebador, oligonucleótido que es complementario a un tramo de nucleótidos en la molécula de ADN plantilla, una mezcla de oligonucleótidos aleatorios o una combinación de los mismos. Dicho oligonucleótido o mezcla de oligonucleótidos preferiblemente es o comprende una o más moléculas de ácido nucleico monocatenario, preferiblemente moléculas de ADN, moléculas de ARN o mezclas o análogos de las mismas. Dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario comprenden preferiblemente de 6-100 bases de longitud, tal como de 9-30 bases. Dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario pueden servir como puntos de partida adicionales para la replicación y amplificación de la molécula de ADN plantilla.

20 Un producto amplificado producido mediante los métodos de la invención puede detectarse y visualizarse, por ejemplo, mediante electroforesis en gel. La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar las moléculas de ADN en función de su tamaño, ya que todas las moléculas de ADN tienen esencialmente la misma carga. La electroforesis implica hacer pasar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Dependiendo de su tamaño, las moléculas viajarán a través del gel a diferentes velocidades, lo que permitirá separarlas unas de otras.

25 Dicho gel normalmente es un gel de agarosa o de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se utilizan normalmente para pequeños fragmentos de ADN de hasta 500-1000 pares de bases (pb). Los geles de agarosa se pueden utilizar para fragmentos de ADN de 100 a 20 kbp, pero se puede lograr una resolución de más de 6 Mb con electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

30 Como alternativa, o además, un producto amplificado que se produce mediante los métodos de la invención puede detectarse y visualizarse mediante agentes o colorantes de unión al ADN o de intercalación del ADN como bromuro de etidio, violeta de cristal, colorantes de Hoechst o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), colorantes de cianina como SYBR Green o Eva Green. Como alternativa, un producto amplificado que se produce mediante los métodos de la invención puede detectarse utilizando una sonda conjugada o fluorescente, como por ejemplo un oligonucleótido complementario unido a biotina o fluoróforo o una baliza molecular marcada con fluorescencia, y/o mediante amplificación en presencia de un dNTP modificado o conjugado.

35 Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, entre otros, Atto425 (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Alemania), Atto 647N (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Alemania), YakimaYellow (Epoch Biosciences Inc, Bothell, WA, EE. UU.), Cal610 (BioSearch Technologies, Petaluma, CA, EE. UU.), Cal635 (BioSearch Technologies, Petaluma, CA, EE. UU.), FAM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), TET (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), HEX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), colorantes de cianina como Cy5, Cy5.5, Cy3, Cy3.5, Cy7 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), colorantes Alexa (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), Tamra (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), ROX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), JOE (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.), isotiocianato de fluoresceína (FITC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.) y tetrametilrodamina (TRITC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE. UU.).

45 Como es sabido por un experto en la materia, dicho fluoróforo puede detectarse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un fluoróforo se puede detectar excitándolo con la longitud de onda de luz adecuada y detectando la fluorescencia emitida.

50 Una molécula de ADN plantilla para la amplificación de acuerdo con los métodos de la invención puede ser cualquier molécula de ADN lineal o circular, incluyendo ADN mitocondrial y ADN genómico de bacteriófagos, virus, bacterias, incluyendo arqueobacterias, protozoos tales como Amoebozoa, Choanozoa y Excavata, Chromista, incluyendo algas, y diatomeas, plantas, hongos, animales, incluyendo humanos. La amplificación de dicha plantilla genómica, preferiblemente la plantilla genómica completa, puede utilizarse para aplicaciones biomédicas y forenses. Los análisis genómicos, como la hibridación genómica comparativa, la genotipificación de loci polimórficos y la detección de mutaciones genéticas de enfermedades, son importantes en la medicina genómica y la ciencia forense.

55 Muchas técnicas de análisis de ADN biomédico y forense requieren cantidades de ADN genómico de nanogramos a microgramos. A menudo es necesario amplificar las muestras de ADN antes de poder realizar análisis genómicos. Los métodos de la invención pueden usarse para dicha amplificación del genoma completo de una molécula de ADN plantilla genómica.

Como alternativa, o además, se pueden emplear los métodos de la invención para amplificar una molécula de ADN plantilla circular. Dicha plantilla de ADN circular es, por ejemplo, un plásmido de ADN recombinante, un plásmido de origen natural, un genoma mitocondrial o un genoma circular de algunos bacteriófagos y virus. Dicha plantilla de ADN circular también puede generarse artificialmente, por ejemplo, mediante el uso de sondas de candado, mediante síntesis genética o mediante métodos de ADN recombinante que incluyen ligación enzimática, por ejemplo, mediante la ADN ligasa T4, o ligación sin plantilla utilizando ligasas de ADN especiales, como una ligasa que es capaz de realizar una ligación intramolecular independiente de la plantilla de una secuencia de ADN monocatenario para generar el círculo de ADN monocatenario, por ejemplo, CircLigase (Lucigen Corp., Middleton, WI). Como apreciarán los expertos en la materia, un producto de plantilla de ADN lineal también se puede convertir en una plantilla circular utilizando, por ejemplo, una ADN recombinasa, una protelomerasa, una resolvasa o integrasa, mediante autoligación o mediante ligadura de bucles de horquilla terminales.

Los métodos de amplificación, como los métodos de amplificación de esta invención, son idealmente adecuados para generar plantillas de ADN para la síntesis de ARN o transcripción *in vitro*, incluidas plantillas lineales. Por ejemplo, una construcción de ADN circular que comprende un promotor para una ARN polimerasa, por ejemplo un promotor SP6, T3 o T7, y opcionalmente una secuencia poli(A), se puede amplificar en presencia de una ADN polimerasa y una ARN polimerasa (que coincida o no con el sitio del promotor) de acuerdo con la presente invención. Puede estar presente una enzima de restricción durante la reacción de amplificación que digiere los productos amplificados, dando como resultado productos amplificados linealizados discretos adecuados para transcripción *in vitro* o *in vivo*. Dicha enzima de restricción preferiblemente es selectiva para los productos amplificados, pero no restringe la molécula de ADN plantilla. Esta selectividad la proporciona, por ejemplo, una enzima de restricción sensible a la metilación. Por ejemplo, una molécula de ADN plantilla que se produce en una cepa *E. coli* Dam⁺ (metila A en la secuencia de reconocimiento GATC), no puede ser restringida por MboI, mientras que los productos amplificados no están metilados y pueden ser restringidos por esta enzima. Como es bien sabido en la técnica, también se pueden utilizar sitios de metilación que se superponen al sitio de reconocimiento de ciertas endonucleasas (por ejemplo, XbaI, ClaI); consulte international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/dam-and-dcm-methylases-of-e-coli, o la base de datos de enzimas de restricción REBASE (en rebase.neb.com/rebase/rebms.html) para obtener más ejemplos. De manera similar, una molécula de ADN plantilla que se produce en una cepa *E. coli* Dcm⁺ (metila C en CCAGG y CCTGG), no puede restringirse en los sitios metilados por ciertas enzimas de restricción como StyD4I, ApaI o FseI, mientras que los productos amplificados no están metilados y pueden restringirse por estas enzimas.

Además, los métodos de amplificación como los métodos de amplificación de esta invención, son idealmente adecuados para generar plantillas virales lineales. Por ejemplo, una construcción circular que comprende una copia de ADN de un genoma viral puede amplificarse en presencia de una ADN polimerasa y una ARN polimerasa, por ejemplo una polimerasa T7, nucleótidos y ribonucleótidos. Dicha construcción circular comprende una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción entre las secuencias de repetición terminales, preferiblemente una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilasa Dam, Dcm o EcoKI. La presencia de dicha enzima de restricción durante la reacción de amplificación restringirá los productos amplificados, dando como resultado copias de ADN genómico amplificado linealizado de un genoma viral con secuencias de repetición terminales presentes en ambos extremos.

4.3 Utilización de la invención

Como se indica aquí más arriba, una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, como la ARN polimerasa T7, es capaz de mediar el cebado de una plantilla de ADN para una reacción de elongación posterior por una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena. Sorprendentemente, este fenómeno ocurrió incluso si la plantilla de ADN no comprendía una secuencia de promotor T7 de consenso. También se descubrió que otras ARN polimerasas dependientes de ADN, como la ARN polimerasa SP6 y T3, inician la replicación de una plantilla de ADN en ausencia de una secuencia promotora de consenso SP6 o T3, respectivamente.

Por lo tanto, la invención proporciona el uso de una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única para proporcionar un cebador en una plantilla de ADN. Dicho uso de acuerdo con la invención comprende además preferiblemente amplificar dicha plantilla de ADN a partir del cebador mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena en presencia de desoxirribonucleótidos, preferiblemente en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos.

Como se indica aquí más arriba, dicha ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza cadenas es preferiblemente la ADN polimerasa Phi29, Bst y/o Vent.

Dicha plantilla de ADN puede ser cualquier molécula de ADN lineal o circular, incluyendo ADN plasmídico, ADN sintético, ADN mitocondrial y ADN genómico de bacteriófagos, virus, procariotas y eucariotas, incluido el humano.

La amplificación de dicha plantilla de ADN puede utilizarse con fines o aplicaciones biomédicas, de diagnóstico, forenses o terapéuticas. Los análisis genómicos, como la hibridación genómica comparativa, la genotipificación de loci polimórficos, la detección de mutaciones genéticas de enfermedades y la secuenciación de ADN, son importantes en la investigación biomédica, la medicina genómica, el diagnóstico y la ciencia forense. El uso diagnóstico también incluye la amplificación de plantillas de ADN de virus, bacterias y otros agentes microbiológicos de acuerdo con los métodos de la invención antes de la secuenciación de ADN o la detección de productos de amplificación mediante métodos adecuados.

Alternativamente, o además, dicho uso de una ARN polimerasa para proporcionar un cebador en una plantilla de ADN de acuerdo con la invención es en la secuenciación de ADN, incluyendo cualquier método, tecnología o proceso para determinar el orden preciso de nucleótidos en dicha plantilla de ADN.

Las aplicaciones terapéuticas del ADN, como la terapia genética o las vacunas de ADN, dependen de terapias basadas en ADN que incluyen vectores de expresión, oligonucleótidos para aplicaciones antisentido o de omisión de exones, señuelos de ADN, aptámeros de ADN y ADNzimas. El uso clínico de dichas terapias basadas en ADN requiere preparaciones de ADN altamente puras y con calidad controlada. Mientras que los oligonucleótidos relativamente cortos pueden sintetizarse químicamente hasta alcanzar una alta pureza, las moléculas de ADN más largas suelen aislarse como plásmidos a partir de cultivos de fermentación bacteriana. Dichos plásmidos deben aislarse a través de una pluralidad de diferentes etapas de procesamiento, incluidas extensas etapas de purificación para eliminar cualquier rastro de ADN genómico bacteriano, ARN, proteínas y endotoxinas. La amplificación de ADN sintético sin células de acuerdo con los métodos de la presente invención ofrece una alternativa simple, escalable y asequible para la producción de terapias basadas en ADN. Además, los métodos de la invención podrían adoptarse fácilmente para permitir la incorporación de nucleótidos modificados en terapias basadas en ADN que puedan mejorar sus efectos terapéuticos.

Alternativamente, dicho uso de acuerdo con la invención es en inmunoensayos en fase líquida y/o inmunohistoquímica. El cebado mediante una ARN polimerasa dependiente de ADN y la posterior amplificación mediante una ARN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena se pueden realizar en solución libre y sobre objetivos inmovilizados (amplificación en fase sólida). La inmunohistoquímica es un método que puede proporcionar información diagnóstica y pronóstica a partir de observaciones morfológicas y ensayos solubles. La amplificación de señales, empleando la conjugación de una plantilla de ADN con un componente en una reacción de hibridación, seguida de cebado por una ARN polimerasa dependiente de ADN y la posterior amplificación por una ARN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena, se puede aplicar para aumentar la sensibilidad y especificidad de la reacción de hibridación.

La fijación de una plantilla objetivo a un soporte sólido puede ser ventajosa y puede lograrse por medio de un polímero que sirve para fijar dicha plantilla objetivo a un soporte sólido. Dichos sustratos de estado sólido útiles en los métodos descritos pueden incluir cualquier material sólido al que se puedan acoplar nucleótidos. Esto incluye materiales como acrilamida, celulosa, nitrocelulosa, vidrio, poliestireno, acetato de vinilo de polietileno, polipropileno, polimetacrilato, polietileno, óxido de polietileno, vidrio, polisilicatos, policarbonatos, teflón, fluorocarbonos, nailon, caucho de silicona, polianhídridos, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, poliortoésteres, polipropilfumerato, colágeno, glicosaminoglicanos y poliaminoácidos. Los sustratos de estado sólido pueden tener cualquier forma útil, incluidas películas delgadas o membranas, perlas, botellas, platos, fibras, fibras tejidas, polímeros conformados, partículas y micropartículas. Una forma preferida para un sustrato de estado sólido es un portaobjetos de vidrio o una placa de microtitulación, como una placa estándar de 96 pocillos. Las realizaciones preferidas utilizan vidrio o plástico como soporte.

Dicha plantilla de ADN es preferiblemente una plantilla de ADN circular, lo que permite la amplificación por círculo rodante para mejorar la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos y/o en la inmunohistoquímica. La alta relación señal-ruido resultante lo hace adecuado para detectar, cuantificar y visualizar marcadores proteicos de baja abundancia, ADN viral y bacteriano en muestras clínicas, y como método de amplificación de señales en chip para la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo en ensayos de micromatrices de ADN y ARN.

Además, las técnicas de amplificación aquí presentadas se pueden aplicar a la construcción de nanoestructuras de ADN e hidrogeles de ADN.

4.4 Kit de piezas

La invención proporciona además un uso de un kit de partes, que comprende una parte que contiene una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, una parte que contiene una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena, o una combinación de dichas enzimas en una única solución lista para usar, como máximo 3 ribonucleótidos de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina, desoxirribonucleótidos y, opcionalmente, una parte que contiene un tampón adecuado, para la amplificación de una molécula de ADN plantilla. Dichos ribonucleótidos comprenden preferiblemente ATP, GTP o tanto ATP como GTP.

Dicho kit incluye opcionalmente además el suministro de un cebador que comprende al menos un oligonucleótido que es complementario a un tramo de nucleótidos en una molécula de ADN plantilla, una mezcla de oligonucleótidos aleatorios o una combinación de los mismos.

- 5 Dicho kit comprende además preferiblemente instrucciones para el uso de la ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única y la ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena para el cebado y la posterior amplificación de una plantilla de ADN.

- 10 Dicha plantilla de ADN puede ser cualquier molécula de ADN lineal o circular, incluyendo ADN plasmídico, ADN mitocondrial y ADN genómico de bacteriófagos, virus, bacterias, incluyendo arqueobacterias, protozoos tales como Amoebozoa, Choanozoa y Excavata, Chromista, incluyendo algas, y diatomeas, plantas, hongos y animales, incluyendo humanos. La amplificación de dicha plantilla genómica, preferiblemente la plantilla genómica completa, puede utilizarse para aplicaciones biomédicas y forenses, incluidas aplicaciones de diagnóstico.

La presente invención se describe además mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se presentan aquí sólo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ningún modo.

15 5. Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos generales.

- 20 Proveedores de reactivos: New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA, EE. UU.) para la ARN polimerasa T7 (M0251), la ARN polimerasa T3 (M0378), la ARN polimerasa SP6 (M0207), la ADN polimerasa Phi 29 (M0269), los ribonucleótidos (N0450), la mezcla de dNTP (N0447), XbaI (R0145, 20 U/μl), BsaI-HFv2 (R3733, 20 U/μl), PvuI-HF (R3150, 20 U/μl); Biolab Innovative Research Technologies (BLIRT; Gdansk, Polonia) para la ADN polimerasa Phi29 (EN-20); Thermo Fisher Scientific (TF, Bleiswijk, Países Bajos) para la ARN polimerasa T7 (EP0111), la ARN polimerasa T3 (EP0101), la ARN polimerasa SP6 (EP0131) y la ADN polimerasa Phi 29 (EP0091); a continuación se muestran los tampones madre disponibles comercialmente suministrados con las enzimas y utilizados en algunos de los ejemplos. Los hexámeros aleatorios que contienen dos enlaces fosforotioato 3' se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, OH, EE. UU.).

- 30 Plantillas de ADN: Los plásmidos de ADN circular bicatenario se purificaron a partir de Escherichia coli cultivos utilizando columnas Nucleobond o NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). El plásmido p3 es un constructo de expresión CMV-GFP de 5 kilobases que contiene una única secuencia de consenso del promotor T7 (5' TAATACGACTCACTATAG 3'); pGEM-7Zf+ (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU., en adelante denominado pGEM) es un vector de clonación estándar vacío de 3 kilobases que contiene una secuencia de consenso del promotor T7 y una secuencia de consenso del promotor SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3') en orientación inversa; pBlueScript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU., en adelante denominado pBSK) es un vector de clonación de fagémido de 3 kb ampliamente utilizado que alberga un promotor T7 y una secuencia de consenso del promotor T3 (5' AATTAACCCTCACTAAAG 3') en orientación inversa. El plásmido p53 es un vector de expresión de mamíferos CMV-GFP de 3.7 kilobases que carece de sitios promotores T7, T3 o SP6. El plásmido B327 (3.8 kilobase) se construyó a partir de p53 insertando sitios de restricción BsaI y secuencias de consenso del promotor T7 a cada lado del casete de expresión CMV-GFP en orientación inversa. Todos los plásmidos contienen una única secuencia de reconocimiento XbaI para la linealización. El ADN genómico HeLa (en adelante denominado ADNg) y el ADN circular monocatenario de M13mp18 se adquirieron de NEB (cat. N40065 y N4040S, respectivamente).

- 45 Condiciones estándar de amplificación: A menos que se especifique lo contrario, las condiciones de amplificación estándar se realizaron en tubos de PCR de 0.5 ml o 0.2 ml que contenían volúmenes de reacción de 20 μl de la siguiente manera. Las reacciones se prepararon en tampón Phi29 B 1x que contenía 33 mM de Tris-acetato (pH 7.9 a 37 °C), 66 mM de acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio, 0.1 % de Tween-20 y 1 mM de DTT, o en tampón Phi29 N 1x que contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5 a 25 °C), 10 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄ y 4 mM de DTT. Las mezclas de reacción se complementaron con 1 mM de dNTP (NEB, N0447) y 0.25 U/μl de ADN polimerasa Phi29 (Biolab Innovative Research Technologies, EN-20). En todos los experimentos se utilizaron premezclas que contenían todos los componentes comunes para minimizar la variación entre muestras. Cuando fue apropiado, se agregaron plantillas de ADN, hexámeros, ribonucleótidos y/o ARN polimerasas a las premezclas o a las reacciones individuales según se indicó. Todas las etapas de pipeteo se realizaron en hielo. Las mezclas de reacción se incubaron a 30 °C durante 16 horas o durante el tiempo indicado, seguido de inactivación térmica a 65 °C durante 10 minutos en un termociclador Peltier DNA Engine PTC-200 (MJ Research), equipado con dos unidades alfa de 30 pocillos para tubos de 0.5 mL o un termociclador T100 de 96 pocillos (Bio-Rad) para tubos de 0.2 ml.

55 Análisis de productos de amplificación de ADN: Después de la incubación y la inactivación térmica durante los tiempos indicados, las mezclas de reacción se diluyeron cinco veces en 5 mM de EDTA (pH 8.0) y se incubaron a 65 °C durante 30 minutos para solubilizar el pirofosfato de magnesio y el ADN de alto peso molecular que a

menudo formaba un precipitado tipo gel debido a la excesiva conversión de nucleótidos y la amplificación del ADN. Luego, los productos de reacción solubilizados se diluyeron una vez en agua para alcanzar una concentración final de 2 mM de EDTA y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

Análisis de restricciones: Para verificar los productos de amplificación, se digirieron de 3 a 5 µl de mezcla de reacción diluida con 5 unidades de XbaI o BsaI en tampón CutSmart (New England Biolabs, 50 mM de acetato de potasio, 20 mM de Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnesio, 100 µg/ml de BSA, pH 7.9 a 25 °C). Después de una incubación durante 1 hora a 37 °C, se agregaron 4 µl de tampón de carga 6x (NEB; Ipswitch, MA, EE. UU.) y los productos de digestión se analizaron en gel de agarosa.

Electroforesis en gel: Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1 % que contenía bromuro de etidio y se sometieron a análisis electroforético en tampón TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Para la referencia y estimación del tamaño de los fragmentos de ADN, se utilizó una escalera de ADN de 1 kb (NEB, N3232). Los productos de digestión por amplificación y/o restricción se visualizaron utilizando un transiluminador UV y se capturaron en una plataforma de imágenes ProXima 10 Phi.

Ejemplo 2

Para investigar si las ARN polimerasas podían iniciar el cebado específico de la amplificación del ADN al unirse a su secuencia promotora cognada, se probaron diferentes plantillas de ADN plasmídico que contenían ninguna, una o dos secuencias promotoras de consenso para diferentes ARN polimerasas, como se indica en la Tabla 1, en una reacción de amplificación estándar.

Las reacciones de amplificación estándar se configuraron en un tampón B 1x Phi29 que contenía 0.25 U/µl de Phi29, 1 mM de dNTP, 0.5 mM de ribonucleótidos GTP/ATP, 10 ng de ADN plantilla o agua y 50 µM de hexámeros (parte superior izquierda de la Figura 1A), 0.5 U/µl de ARN polimerasa T7 (parte superior derecha), 0.5 U/µl de ARN polimerasa T3 (parte inferior izquierda) o 0.5 U/µl de ARN polimerasa SP6 (parte inferior derecha de la Figura 1A). Después de una incubación de 16 horas a 30 °C, los productos de reacción se diluyeron y linealizaron mediante digestión con la enzima de restricción XbaI antes del análisis mediante electroforesis en gel. Inesperadamente, a pesar de la alta especificidad ampliamente descrita de la ARN polimerasa T7 para su secuencia promotora cognada, se descubrió que las ARN polimerasas T7 permiten de manera eficiente cebar la amplificación de ADN para una plantilla de ADN sin dicha secuencia promotora (plásmido p53, filas 2). Los plásmidos que contienen una sola secuencia de promotor T7 (p3, filas 3) o que contienen dos secuencias de promotor T7 en orientación inversa (pB327, filas 4), se amplificaron igualmente bien en presencia de la ARN polimerasa T7, lo que sugiere que el cebado ocurre independientemente de la secuencia de promotor T7. Sorprendentemente, también se descubrió que las ARN polimerasas T3 y SP6, que también se sabe que son estrictamente específicas para sus respectivas secuencias promotoras, permitían de manera eficiente el cebado de todas las plantillas de ADN plasmídico utilizadas, independientemente de la presencia de sus secuencias promotoras cognadas.

Este experimento, además de otros ejemplos descritos a continuación, indica que las ARN polimerasas permiten la amplificación del ADN sin cebadores. Dada la simplicidad del método y la amplia disponibilidad de las enzimas y componentes de reacción utilizados, el método de amplificación de ADN de la presente invención puede resultar una herramienta valiosa en diversas aplicaciones, tales como fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos.

Tabla 1. Plantillas de ADN.

Fila No.	Plásmido	Tamaño (kb)	Promotor T7	Promotor T3	Promotor SP6
1	-				
2	P53	3.7	-	-	-
3	P3	5	1		
4	pB327	3.8	2		
5	pBSK	3	1	1	
6	pGEM	3	1		1

Para analizar y confirmar más a fondo si efectivamente el cebado por las ARN polimerasas ocurre independientemente de sus secuencias promotoras, se amplificó el plásmido pB327 (que contiene dos promotores T7) en condiciones de amplificación estándar en presencia de hexámeros aleatorios, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3 o ARN polimerasa SP6, en ausencia o en presencia de ribonucleótidos

purinérgicos. Cada reacción contenía los siguientes componentes: 1 mM de dNTP (NEB, N0447) y 0.25 U/μl de Phi29 (Blirt, EN20) en tampón de reacción Phi29 1x B. Las reacciones 2 y 3 (que corresponden a la numeración de filas en la Figura 1B) se complementaron con 50 μM de hexámeros aleatorios, las reacciones 4 y 7 se complementaron con 0.5 U/μl de ARN polimerasa T7, mientras que las reacciones 5 y 6 se complementaron con 0.5 U/μl de ARN polimerasa T3 o 0.5 U/μl de ARN polimerasa SP6, respectivamente. Las reacciones 2 a 5 se complementaron además con ribonucleótidos GTP y ATP (0.5 mM cada uno) y, por último, todas las reacciones se proporcionaron con 10 ng de ADN plantilla pB327. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 16 h, seguido de análisis de restricción BsaI y electroforesis en gel. Como referencia, se incluyeron 200 ng de ADN plantilla no amplificado pB327 en el análisis de restricción para verificar los patrones de restricción obtenidos (fila 8 en la Figura 1B).

Como se muestra, tanto los hexámeros como las ARN polimerasas permiten cebar la amplificación del ADN plantilla, aunque los hexámeros parecen ser muy eficaces para cebar el ADN plasmídico nativo. Aunque el ADN plantilla pB327 utilizado contiene solo dos secuencias de consenso del promotor para la ARN polimerasa T7, también se descubrió que la ARN polimerasa T3 y SP6 preparaban de manera eficiente la amplificación del ADN de pB327. Si se esperaba que la ARN polimerasa T7 se uniera a sus secuencias promotoras cognadas y provocara la amplificación del ADN desde los sitios promotores, se habría esperado una amplificación exponencial dada la orientación inversa de los sitios promotores T7. Sin embargo, es claro que la intensidad de los productos amplificados en la reacción preparada por la ARN polimerasa T7 no excede la de la reacción preparada por la ARN polimerasa T3 o SP6 (compare las filas 4, 5 y 6), lo que nuevamente indica que el cebado por las ARN polimerasas ocurre independientemente de sus secuencias promotoras cognadas. Curiosamente, en ausencia de ribonucleótidos, no se observó ningún producto de amplificación en una mezcla de reacción con la ARN polimerasa T7 (comparar las filas 4 y 7), lo que nos impulsó a investigar más a fondo la dependencia de los ribonucleótidos.

Ejemplo 3

Para investigar si el cebado observado de la amplificación de ADN por las ARN polimerasas depende de ribonucleótidos específicos o de concentraciones de los mismos, se establecieron reacciones de amplificación estándar en las que solo se varió el tipo de ARN polimerasa o el tipo(s) de ribonucleótidos (Figura 2A). Cada reacción contenía 1 mM de dNTP, 10 ng de ADN plantilla p53 y 0.25 U/μl de Phi29 (BLIRT EN20) en 1x tampón de reacción Phi29 B. Se añadieron ARN polimerasas T7, T3 o SP6 a la mezcla de reacción a 0.5 U/μl. Se agregaron ribonucleótidos a reacciones individuales como se indica en la Figura 2A. Para analizar los resultados, se analizaron 0.5 μl de cada producto de reacción en gel de agarosa. Como se puede ver en la Figura 2A, las tres ARN polimerasas permiten el cebado de la amplificación del ADN a menos que no esté presente ningún ribonucleótido. Curiosamente, el UTP parece ser muy ineficaz para el cebado por las ARN polimerasas, mientras que el uso de GTP y/o ATP produce los mayores rendimientos. Por lo tanto, se prefiere incluir al menos un ribonucleótido purinérgico en el método de la presente invención.

Las concentraciones óptimas de ribonucleótidos purinérgicos para el cebado de la amplificación de ADN por las ARN polimerasas se establecieron titulando una mezcla de GTP y ATP de 1 mM a 4 μM cada uno (Figura 2B). Cada reacción contenía 1 mM de dNTP, 10 ng de ADN plantilla pB327, 0.25 U/μl de Phi29 (BLIRT, EN20) en tampón de reacción Phi29 B 1x y 0.5 U/μl de ARN polimerasa T7, T3 o SP6. Como control negativo, se añadió agua en lugar de ribonucleótidos. Con concentraciones de GTP/ATP tan bajas como 15 micromolar, todavía se observó fácilmente la amplificación de ADN, lo que indica que los ribonucleótidos son esenciales pero pueden usarse en el método de la presente invención en una concentración muy baja en comparación con los desoxinucleótidos.

Normalmente, la unión de oligonucleótidos o cebadores hexaméricos aleatorios al ADN bicatenario requiere una etapa de desnaturalización adicional en el que el ADN plantilla se desnaturaliza mediante tratamiento térmico o alcalino para permitir el recocido de los cebadores. Estos pasos requieren equipos y/o tampones adicionales, pero lo que es más importante, estos pasos adicionales aumentan el riesgo de contaminación por ADN exógeno y pueden afectar gravemente la calidad del ADN plantilla. Para establecer si el cebado por las ARN polimerasas también requiere la desnaturalización del ADN plantilla, el plásmido pB327 se mezcló con un exceso de hexámeros aleatorios y se dejó en su forma nativa de doble cadena o se desnaturalizó durante 5 minutos a 95 °C y se enfrió lentamente para permitir el apareamiento de los cebadores hexaméricos con el ADN plantilla. Para minimizar los efectos de confusión de un posible autocebado debido a mellas en el ADN plantilla, el plásmido pB327 se trató primero con exonucleasa T5. Para este fin, se incubaron 3 μg de pB327 con 30 unidades de exonucleasa T5 (NEB, M0363) en tampón CutSmart durante 2 horas a 37 °C y se purificó en una columna NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Las reacciones se realizaron en condiciones estándar con una concentración final de 0.5 ng/μl de ADN plantilla, 50 μM de hexámeros aleatorios y 0.5 mM de GTP/ATP en cada reacción. Se añadieron ARN polimerasas a 0.5 U/μl como se indica encima de cada fila en la Figura 3. Se incubaron alícuotas separadas de mezclas de reacción completas a 30 °C y las reacciones de amplificación se detuvieron en los puntos de tiempo indicados mediante una inactivación térmica de 10 minutos a 65 °C y almacenamiento a -20 °C hasta un análisis posterior. Los productos de reacción se digirieron con XbaI antes del análisis mediante electroforesis en gel. Los productos de reacción digeridos migran al tamaño esperado de pB327 linealizado (3.8 kb) y la intensidad de las bandas aumenta con el tiempo. Como se

puede concluir de la Figura 3, la amplificación eficiente mediante hexámeros aleatorios requiere la desnaturalización del ADN plantilla (comparar las filas 1 y 5), mientras que la adición de ARN polimerasas permite el cebado y amplificación tanto del ADN plantilla nativo como del desnaturalizado. Esto implica que el uso de ARN polimerasas en la amplificación de ADN elimina la necesidad de una etapa de desnaturalización, lo que hace que el proceso sea verdaderamente isotérmico.

Ejemplo 4

La actividad de transcripción de las ARN polimerasas dependientes de ADN, como las ARN polimerasas T7, T3 y SP6, es altamente específica para sus respectivas secuencias promotoras, y esta región de unión se reconoce como un dúplex bicatenario (Golomb et al., 1977. J Virol 21: 743-752; Stump and Hall, 1993. Nucleic Acids Res 21: 5480-5484; Maslak and Martin, 1993. Biochemistry 32: 4281-4285; Li et al., 1996. Biochemistry 35: 3722-3727). La presente invención ilustra que la ARN polimerasa también puede funcionar para preparar la amplificación del ADN, y que esto ocurre inesperadamente en ausencia de una secuencia promotora. Para establecer si el cebado por las ARN polimerasas también ocurre en plantillas de ADN monocatenario, se establecieron reacciones de amplificación estándar utilizando ADN del fago M13mp18 monocatenario como plantilla. M13mp18 (NEB, N4040) es una molécula de ADN circular monocatenaria de 7.2 kilobases, que comprende un único sitio de reconocimiento XbaI, que permite la linealización de M13mp18 después de replicarse en una molécula bicatenaria. La secuencia M13mp18 (accesión Genbank X02513) carece de secuencias de promotor T7, T3 o SP6. Para probar la amplificación de ADN, se establecieron condiciones de reacción estándar utilizando 1 ng/μl de ADN plantilla monocatenario M13mp18 y 0.5 mM de GTP/ATP en tampón Phi29 1x (New England Biolabs). Los productos de reacción se digirieron con XbaI y se analizaron mediante electroforesis en gel. Como se muestra en la Figura 4, los productos de reacción digeridos migran al tamaño esperado de M13mp18 linealizado (7.2 kb), lo que indica que la plantilla M13mp18 monocatenaria se replica y amplifica fielmente en ADN bicatenario mediante cebado con hexámeros y ARN polimerasa. La banda superior de la Figura 4 corresponde a los pocillos de los geles de agarosa, que probablemente representan concatémicos monocatenarios de alto peso molecular de la plantilla M13mp18. Este ejemplo ilustra que las ARN polimerasas, además de funcionar independientemente de sus secuencias promotoras, también pueden preparar de manera eficiente la replicación y amplificación de plantillas de ADN monocatenario.

Ejemplo 5

La amplificación del genoma completo (WGA) es una técnica poderosa para amplificar pequeñas cantidades de ADN genómico para su posterior procesamiento, análisis o secuenciación. La mayoría de los kits disponibles comercialmente emplean métodos basados en PCR (por ejemplo, SMARTer[®] PicoPLEX[®], Takara Bio USA, Mountain View, CA; GenomePlex[®] Kits WGA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o utilice amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) como GenomiPhi[™] (GE Healthcare, Chicago, IL) y REPLI-g (Qiagen, Hilden, Alemania). Una característica común de estos kits es que se basan en el uso de cebadores aleatorios u oligonucleótidos semidegenerados. Una de las desventajas de estos métodos es que la plantilla de ADN genómico debe desnaturalizarse para que los cebadores se asocien y preparen la amplificación. En los casos en que sólo se dispone de cantidades minúsculas o de ADN antiguo (como por ejemplo en la ciencia forense o la arqueología), la desnaturalización de muestras de ADN valiosas puede resultar perjudicial para el análisis posterior. Otra desventaja de utilizar cebadores aleatorios o semialeatorios es la amplificación sesgada del ADN plantilla. Esto puede provocar pérdida de información, errores de secuenciación debido a un cebado incorrecto o una amplificación no específica por autocebado de oligonucleótidos aleatorios (ver, por ejemplo, Hansen et al., 2010. Nucleic Acids Res 38: e131; van Gurp et al., 2013. PLoS ONE 8: e85583; Sabina and Leamon, 2015. Methods Mol Biol 1347: 15-41). Recientemente se informó sobre un nuevo método para la amplificación del genoma que utiliza una primasa-polimerasa (PrimPol) aislada de *Thermus thermophilus* HB27 (Richer et al., 2016. Nature Comm 7: 13296), que posee actividad primasa intrínseca sin necesidad de cebadores oligonucleótidos añadidos exógenamente. Sin embargo, este método todavía requiere la desnaturalización del ADN plantilla antes de la amplificación, y la enzima utilizada no está ampliamente disponible. Para analizar la capacidad de la ARN polimerasa para iniciar la amplificación del ADN genómico nativo no desnaturalizado, se utilizó ADN genómico HeLa nativo como plantilla. La amplificación se realizó en condiciones de amplificación estándar en un tampón Phi29 1x (New England Biolabs) que contenía 0.5 mM de GTP/ATP y 50 μM de hexámeros aleatorios, 0.5 U/μl de ARN polimerasas como se indica, o una combinación de 50 μM de hexámeros aleatorios y 0.5 U/μl de ARN polimerasa (Figuras 5A y 5B). Como plantilla para la amplificación se utilizó 1 ng/μl de ADN genómico HeLa nativo (NEB, N4006) y se realizaron reacciones idénticas con y sin plantilla (Figuras 5A y 5B). Después de la amplificación, se analizaron 1 μl de productos de amplificación no digeridos en un gel de agarosa al 0.7 %. Como se muestra en la Figura 5A, todas las reacciones excepto el control sin cebado en la fila 1, dieron como resultado productos de amplificación con una banda de ADN principal que migraba alrededor de 50-70 kb, lo que se considera la longitud máxima del producto para la polimerización de ADN mediada por Phi29. Las muestras que contienen hexámeros aleatorios (filas 2, 6-8) muestran intensidades más altas y parecen contener más ADN amplificado.

Sin embargo, como se puede concluir de los controles sin plantilla en la Figura 5B, la mayoría de los productos amplificados en presencia de hexámeros aleatorios parecen ser artefactos, probablemente resultantes del autocebado y la extensión por hexámeros aleatorios. Por el contrario, ninguna reacción de control de plantilla

amplificada en presencia únicamente de ARN polimerasas carece de productos de amplificación no específicos (filas 3-5). Esto sugiere firmemente que el cebado mediante ARN polimerasas produce una amplificación específica del ADN genómico nativo, lo que la convierte en una alternativa superior a los métodos WGA existentes.

5 Ejemplo 6

También se investigó si las ARN polimerasas modifican la cinética de la amplificación de ADN cebada con hexámeros aleatorios o pueden mejorar el rendimiento del producto. Para este fin, se realizaron reacciones de amplificación estándar en tampón Phi29 1x (Biolab Innovative Research Technologies) que contenía 50 μ M de hexámeros, 0.5 mM de GTP/ATP y 10 ng de plásmido pB327 por reacción. La premezcla de reacción se dividió en cuatro partes y se complementó con agua (solo hexámeros, panel superior izquierdo) o con 0.5 U/ μ l de las ARN polimerasas indicadas (Figura 6A). En los puntos de tiempo indicados, se detuvieron las reacciones y se analizaron cantidades iguales de productos de amplificación mediante digestión con XbaI y electroforesis en gel. Para cuantificar la cinética, se determinaron las intensidades de las bandas utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012. Nature Methods 9: 671-675) y analizados gráficamente en Microsoft Excel (Figura 6B). Claramente, la adición de una ARN polimerasa aumentó drásticamente el rendimiento general de las reacciones de amplificación y los rendimientos máximos se alcanzan mucho más rápido que con hexámeros solos. El rendimiento máximo se determinó por el agotamiento de dNTP en la mezcla de reacción o por los efectos inhibidores del pirofosfato que se forma durante la polimerización de dNTP, y este estado parece alcanzarse entre 8 y 16 horas para las ARN polimerasas T7 y T3, y algo antes para la ARN polimerasa SP6.

Los kits de amplificación de ADN isotérmico disponibles comercialmente generalmente utilizan cebadores hexaméricos aleatorios en concentraciones muy altas (50 o incluso 100 μ M), que representan un enorme exceso molar sobre los productos de amplificación. Para investigar si esta concentración se puede reducir en presencia de una ARN polimerasa sin pérdida de rendimiento, se probaron una cantidad fija de ARN polimerasa T7 y cantidades variables de hexámeros aleatorios en reacciones de amplificación estándar. Para permitir la hibridación aleatoria de hexámeros con ADN plantilla, en este experimento se utilizó ADN plasmídico p53 desnaturalizado por calor como molde. Además, esta plantilla no incluye ninguna secuencia promotora de consenso para la ARN polimerasa T7. Después de 16 horas de incubación a 30 °C, los productos de reacción se analizaron en gel. A menos que estuviera presente la ARN polimerasa T7, no se observó amplificación de ADN sin hexámeros aleatorios (Fig. 6C; primeras filas de la serie). Además, el rendimiento máximo en presencia de la ARN polimerasa T7 parece alcanzarse en concentraciones de hexámeros de 20 μ M, mientras que en ausencia de la ARN polimerasa, las reacciones que contienen incluso 100 μ M no han alcanzado rendimientos máximos de amplificación. Esto indica que la adición de una ARN polimerasa y ribonucleótidos mejora fuertemente la amplificación del ADN dependiente del cebador.

Ejemplo 7

Para confirmar que los métodos de la invención también funcionan con enzimas similares de otros proveedores y para probar la solidez del método inventado, se establecieron condiciones de reacción estándar utilizando 10 ng de ADN del plásmido p53 como plantilla y ADN polimerasa Phi29 de tres proveedores diferentes. Además, se incluyeron ARN polimerasas de dos proveedores diferentes y se probaron todas las combinaciones posibles (Figura 7A). Las reacciones en el panel a. comprenden 0.25 U/ μ l de polimerasa Phi29 de Bliirt; las reacciones en el panel b. comprenden 0.25 U/ μ l de polimerasa Phi29 de New England Biolabs, y las reacciones en el panel c. comprenden 0.25 U/ μ l de polimerasa Phi29 de Thermo Fisher. Las tres ADN polimerasas se utilizaron en combinación con el tampón de reacción del proveedor correspondiente. Los productos de reacción se digirieron con XbaI y se analizaron mediante electroforesis en gel. Como se ilustra en la Figura 7A, las seis ARN polimerasas probadas permiten un cebado eficiente de la amplificación de ADN, comparable al cebado mediante hexámeros aleatorios (compare el fila 2 y las filas 3 a 8 en cada panel). Además, las ADN polimerasas Phi29 de tres proveedores diferentes amplificaron eficientemente el ADN plantilla (comparar los paneles a-c), lo que indica que el método de la invención funciona con una variedad de polimerasas de diferentes proveedores. Las diferentes intensidades de los productos de amplificación entre filas sugieren que ciertas combinaciones de una ARN polimerasa y una ADN polimerasa del mismo proveedor o de diferentes proveedores pueden funcionar mejor que otras. Para probar aún más la solidez del método, se realizó una amplificación de ADN preparada con ARN polimerasa en dos tampones con composiciones significativamente diferentes: tampón Phi29 N que contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5 a 25 °C), 10 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄ y 4 mM de DTT (denominado "tampón Tris-HCl" en la Figura 7B) o en el tampón Phi29 B que contiene 33 mM de Tris-acetato (pH 7.9 a 37 °C), 66 mM de acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio, 0.1 % de Tween-20 y 1 mM de DTT (denominado "tampón Tris-acetato" en la Figura 7B). Todos los demás componentes de la reacción se mantuvieron idénticos: 1 mM de dNTP, 0.5 ng/ μ l de ADN plasmídico p53, 0.25 U/ μ l de polimerasa Phi29 (Bliirt, EN20), 0.5 mM de GTP/ATP. Las reacciones se cebaron añadiendo 50 μ M de hexámeros aleatorios (filas 1 y 5), o 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T7 de Thermo Fisher (filas 2 y 6), o 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa T3 de Thermo Fisher (filas 3 y 7), o 0.5 U/ μ l de ARN polimerasa SP6 de Thermo Fisher (filas 4 y 8) y se incubaron a 30 °C durante 16 horas para permitir la amplificación del ADN. Los productos de reacción se digirieron con XbaI y se analizaron mediante electroforesis en gel. Como se muestra en la Figura 7B, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento entre las diferentes series de tampones. Los

ejemplos presentados abogan por un método de amplificación robusto, que no depende de ningún proveedor de enzimas específico ni de ninguna composición de tampón.

Ejemplo 8.

Las aplicaciones terapéuticas del ADN, como la terapia genética o las vacunas de ADN, requieren preparaciones de ADN altamente puras y con secuencia verificada, libres de contaminantes. Por lo tanto, la amplificación de ADN sintético sin células de acuerdo con los métodos de la invención puede ofrecer una alternativa simple y asequible para la amplificación y producción de terapias basadas en ADN. Alternativamente, los métodos de la invención pueden usarse en el proceso de secuenciación de ADN, preferiblemente cuando están presentes cantidades limitadas de ADN plantilla. La producción de ADN funcional se probó amplificando un vector de expresión de GFP en diversas condiciones y transfectando productos de amplificación digeridos en células para el análisis de expresión. Las secuencias de ADN de los productos de amplificación se verificaron mediante secuenciación de Sanger.

Materiales y métodos

Amplificación: El ADN para estudios de transfección se produjo en condiciones de reacción estándar utilizando 10 ng de p53 como ADN plantilla. La amplificación se inició agregando 50 µM de hexámeros aleatorios con o sin 0.5 mM de GTP/ATP (para excluir una posible influencia de los ribonucleótidos en los estudios de expresión), o con 0.5 mM de GTP/ATP y 0.5 U/µl de ARN polimerasa T7, 0.5 U/µl de ARN polimerasa T3 o 0.5 U/µl de ARN polimerasa SP6. Los productos de amplificación del plásmido p53 se digirieron con PvuI (NEB, R3150) durante 2 h a 37 °C. El plásmido p53 contiene un único sitio de reconocimiento de PvuI en la estructura del vector, de modo que la digestión con PvuI da como resultado plásmidos linealizados de longitud completa que comprenden un casete de expresión intacto que impulsa la expresión de GFP. Después de la digestión, los fragmentos de ADN lineal se purificaron utilizando NucleoSpin Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), se eluyeron en 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA y se midió la concentración de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher).

Cultivo celular y transfecciones: Las células renales embrionarias humanas (HEK293, ATCC CRL-1573) y las células de melanoma de ratón (B16F10, ATCC CRL-6475) se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo de tejidos en medio IMDM (ThermoFisher-Gibco, 21980-032) suplementado con 5 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS, Sigma-Aldrich, F0804) y 1 % de mezcla de penicilina-estreptomicina (Lonza, 17-602E). Un día antes de las transfecciones, se sembraron 20*10E3 células HEK293 o 4*10E3 B16-F10 en 100 µl de medio IMDM por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. Al día siguiente, se realizaron transfecciones por triplicado utilizando el reactivo de transfección Saint-DNA (SD-2001-01, Synvolux Products, Leiden, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, el Saint-DNA se calibró a temperatura ambiente y se agitó en un vórtex durante 30 segundos. Para cada pocillo, 50 ng de producto RCA digerido y purificado con PvuI se combinaron con 1 µl de Saint-DNA en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Lonza, 17-516F) durante 5 minutos a temperatura ambiente, en un volumen total de 10 µl. Se añadieron complejos (10 µl) a cada pocillo y las células se colocaron en una incubadora de CO2. Después de 48 h, las células se enjuagaron una vez con PBS, se recolectaron mediante tratamiento con tripsina (ThermoFisher-Gibco) y se lavaron dos veces con tampón FACS que comprendía PBS y 0.5 % de albúmina de suero bovino (BSA, Biowest, P6154). La expresión de GFP se analizó en un Guava EasyCyte 5HT (Merck-Millipore, Burlington, MA, EE. UU.). Los datos se analizaron con GuavaSoft 3.3 (Merck).

Secuenciación de ADN: Para verificar la identidad y fidelidad de la incorporación de nucleótidos durante la amplificación, se realizó la secuenciación de los productos RCA utilizando la secuenciación Sanger. Para este fin, el plásmido pB327 se amplificó en condiciones de amplificación estándar en presencia de hexámeros aleatorios o de una ARN polimerasa. Cada reacción contenía los siguientes componentes: 1 mM de dNTP, 0.5 mM de GTP/ATP, 0.25 U/µl de Phi29 (Bliirt, EN20) y 10 ng de plantilla de ADN plasmídico pB327 en tampón de reacción Phi29 1x N. El cebado se inició con 50 µM de hexámeros aleatorios, 0.5 U/µl de ARN polimerasa T7, 0.5 U/µl de ARN polimerasa T3 o 0.5 U/µl de ARN polimerasa SP6, como se indica en la Tabla 2 a continuación. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 16 h, seguido de digestión con XbaI y purificación utilizando columnas NucleoSpin Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La secuenciación de ADN fue realizada por Baseclear B.V. (Leiden, Países Bajos) utilizando un cebador de secuenciación directa específico pB327 y BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Fisher Scientific, Landsmeer, Países Bajos), en un analizador genético ABI 3730 ((Fisher Scientific, Landsmeer, Países Bajos).

Resultados

Para comparar la eficiencia de la transfección y la expresión de los productos de reacción, el ADN plantilla p53 se amplificó en condiciones estándar en presencia de hexámeros aleatorios o ARN polimerasas. El plásmido p53 comprende un casete de expresión con un promotor CMV, una proteína fluorescente verde (GFP) y una señal poli-A de beta-globina, lo que permite el monitoreo de la expresión de una sola célula mediante citometría de flujo.

Como se ilustra en la Figura 8, paneles de la izquierda, todos los productos de amplificación se transfectaron eficientemente tanto en células HEK293 (hasta un 90 %) como en células B16F10 (hasta un 70 %), sin diferencias apreciables en el número de células transfectadas. Los niveles de expresión, evaluados por el nivel de fluorescencia de GFP por célula, tampoco mostraron diferencias significativas entre los productos de ADN transfectados. Esto indica que (1) la inclusión de ribonucleótidos, si los hay, en la reacción de amplificación no afecta la transcripción de los productos de amplificación, y (2) que el cebado de la amplificación de ADN por las ARN polimerasas de acuerdo con el método de la presente invención proporciona ADN puro y funcional adecuado para la expresión en células y posibles propósitos terapéuticos de los mismos.

Tabla 2. Fidelidad de la amplificación del ADN

Cebado mediante	Nombre del archivo de secuencia	Identidad ^a	Puntuación Phred Q15/Q20 ^b
Hexámero	V190491058	100 %	525/522
T7 RNAP	V190491059	100 %	522/519
T3 RNAP	V190491060	100 %	530/528
SP6 RNAP	V190491061	100 %	528/525

^a La identidad se refiere a la similitud de la secuencia de bases en comparación con la plantilla de ADN original pB327. ^b Los valores Q15 representan el número de bases llamadas correctamente con una certeza del 96.8 % o superior. Para los valores Q20 la confiabilidad es del 99 % o superior.

Los resultados de la secuenciación (ver Tabla 2) mostraron que la preparación mediante ARN polimerasas puede replicar y amplificar fielmente el ADN plantilla, donde los productos de amplificación son 100 % idénticos en secuencia de ADN al ADN plantilla original. Esto sostiene que el método de la invención también puede utilizarse para fines de secuenciación de ADN.

Ejemplo 9

Para fines de terapia genética, la expresión sostenida y la reproducibilidad son factores importantes para el éxito. Para investigar y comparar *in vivo* la expresión genética del ADN lineal sintético: a los ratones se les inyectaron por vía intradérmica los días 0 y 41 cantidades equimolares de ADN plasmídico (ADNp, 10 ug) o ADN lineal (ADNln, 5.4 ug) que codifica la luciferasa de luciérnaga, o con solución salina tamponada con fosfato como control (n = 4 por grupo). La actividad de la luciferasa se midió con un sistema *in vivo* de imágenes espectro IVIS. (Perkin Elmer) en los puntos de tiempo indicados. La actividad de la luciferasa fue comparable en ratones inyectados con ADN plasmídico o ADN lineal, y ambos comenzaron aproximadamente en 2.0×10^7 fotones/s (p/s) y disminuyendo a aproximadamente 1.0×10^6 p/s después de un mes (Figura 9). Una segunda inyección de ADN dio como resultado niveles y cinéticas similares de actividad de luciferasa tanto para el ADN plasmídico como para el ADN lineal, lo que indica que el ADN lineal sintético, producido por el método de la presente invención, es activo *in vivo*, y comparable al ADN plasmídico.

Ejemplo 10

Materiales y métodos

Ratones y estirpes de células tumorales: Los ratones C57BL/6 (Jico) y los ratones albinos B6 (cepa B6/Rj-Tyrc/c) se adquirieron en el laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EE. UU.) y Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia), respectivamente. Los ratones se alojaron en condiciones que cumplieran con la normativa FELASA y todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal holandés y de acuerdo con sus directrices. B16-OVA, un derivado de la estirpe celular de melanoma B16-F10 transfectada de forma estable con ovoalbúmina, se mantuvo en un medio de cultivo compuesto por IMDM (ThermoFisher-Gibco, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con un 8 % de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) en presencia de L-glutamina, penicilina y estreptomycin (todos de ThermoFisher-Gibco) en una incubadora humidificada con CO₂ (37 °C, 5 % de CO₂).

Producción de ADN lineal para estudios *in vivo*. Se amplificó el ADN plasmídico circular que codifica los epítomos de la luciferasa de luciérnaga o B16-OVA flanqueados por sitios de la enzima de restricción Bsal *in vitro* por el método de la invención. Los casetes de expresión que carecen de las secuencias de la estructura principal del plásmido se obtuvieron a partir de productos de amplificación concatémicos mediante digestión con Bsal (NEB, Ipswich, MA, EE. UU.) y se ligaron a oligos de horquilla resistentes a nucleasas (IDT, Coralville, OH, EE. UU.) durante 8 ciclos de 1 h a 37 °C y 1 h a 16 °C, para obtener ADN lineal con extremos cerrados (ADNln). Luego se agregó la exonucleasa T5 (NEB, Ipswich, MA, EE. UU.) durante 16 h a 37 °C para eliminar la estructura principal del vector y los productos no ligados. ADN plasmídico producido por E. coli. El cultivo

bacteriano y el ADN lineal se purificaron dos veces con columnas Nucleobond Xtra maxi EF (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y se resuspendieron en tampón Tris-EDTA al 10 %.

Imágenes de bioluminiscencia *in vivo*: Los días 0 y 41, a ratones albinos B6 se les inyectaron intradérmicamente en la base de la cola dosis equimolares de ADN plasmídico o ADN lineal que codificaba luciferasa. El grupo de control recibió el mismo volumen de PBS. Para imágenes de bioluminiscencia *in vivo*: a los ratones se les inyectó por vía subcutánea 150 mg/kg de D-luciferina (Synchem; Cat. No. bc219). Después de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano y la obtención de imágenes se realizó utilizando el generador de imágenes para animales pequeños IVIS Spectrum (PerkinElmer). La señal de luz utilizando un filtro abierto y un tiempo de adquisición automático se cuantificó en la base de la cola de los ratones utilizando regiones de interés de tamaño fijo a lo largo de todo el experimento. El análisis de imágenes y la cuantificación de la luminiscencia se realizaron utilizando el software LivingImage (PerkinElmer).

Vacunación en ratones, respuesta inmunitaria y exposición tumoral: El día 0, a ratones machos C57BL/6 (3 grupos de 8 ratones cada uno) se les inyectaron intradérmicamente 30 µl de solución de NaCl al 0,9 % que contenía cantidades equimolares (4.3 pmol) de moléculas de ADN. El primer grupo fue vacunado con 10 µg de ADN plasmídico circular (3.6 kB) que codifica múltiples antígenos, incluido un epítipo específico de OVA. El segundo grupo fue vacunado con 5.4 µg de ADN lineal (1.9 kb), amplificado a partir del mismo vector plasmídico utilizado en el primer grupo pero que carecía de las secuencias de la estructura principal bacteriana, y el tercer grupo (control) se dejó sin tratamiento. Dos semanas después de la vacunación, se extrajo sangre de todos los ratones, se trató con tampón de lisis de eritrocitos y se tiñó con tetrámeros H2-Kb/SIINFEKL conjugados con PE que se produjeron en las instalaciones de tetrámeros LUMC, Leiden, Países Bajos, para detectar células T CD8 específicas de OVA. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un BD LSRII (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) y el software FlowJo (FlowJo LLC). Los datos analizados se graficaron en el software GraphPad Prism (San Diego, CA, EE. UU.). El día 21 después de la vacunación, a los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 50.000 células B16-OVA. El crecimiento del tumor se controló cada 3-4 días y el tamaño del tumor se calculó como (largo x ancho x ancho)/2. Los ratones portadores de tumores de más de 1000 mm³ o con una úlcera sangrante fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂.

Resultados

Los métodos de la invención son particularmente adecuados para la producción rápida y económica de ADN puro, por ejemplo para la producción de vacunas personalizadas contra el cáncer. Para investigar si el ADN lineal sintético induce la activación de células T y la protección tumoral, ratones C57BL/6 neófitos de 6 a 8 semanas de edad recibieron una única vacunación intradérmica con cantidades equimolares de ADN plasmídico (ADNp, 10 µg) o ADN lineal (ADNln, 5.4 µg) que codifica epítopos de OVA. Los ratones de un grupo de control no recibieron tratamiento (n = 8 por grupo). Se realizó tinción de tetrámero y citometría de flujo en sangre periférica el día 14 después de la vacunación para detectar la inducción de células T específicas de OVA. Como se muestra en la Figura 10A, la vacunación con ADN plasmídico o ADN lineal resultó en una inducción significativa y comparable de células T, específicas para el epítipo OVA que está codificado dentro de las vacunas. A continuación, los mismos ratones fueron inoculados con células tumorales B16-OVA (50.000 células/ratón) 21 días después de la vacunación y se siguió el crecimiento del tumor. La figura 10B muestra que todos los ratones no tratados (con una excepción) murieron en el plazo de un mes debido al crecimiento del tumor. Por el contrario, la vacunación con ADN plasmídico (10 µg) o ADN lineal (5.4 µg) resultó en una protección casi completa contra el crecimiento del tumor. Los ratones sobrevivientes permanecieron libres de tumores durante el resto del experimento (más de 100 días).

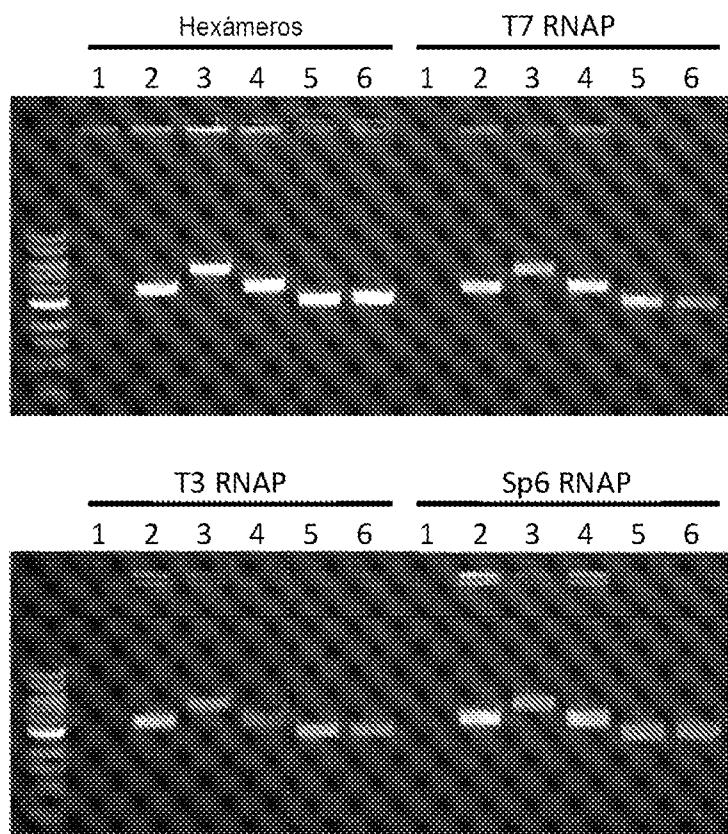
REIVINDICACIONES

1. 1. Un método para amplificar una molécula de ADN plantilla, que comprende
 - a) proporcionar una molécula de ADN plantilla;
 - b) proporcionar una ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de las ARN polimerasas de subunidad única, una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena y una combinación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos;
 - c) incubar dichos materiales en un tampón adecuado y durante un período de tiempo adecuado para permitir la replicación y amplificación de dicha molécula de ADN plantilla,en el que la preparación por dicha ARN polimerasa dependiente del promotor ocurre independientemente de una secuencia promotora de consenso.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única se selecciona del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la ADN polimerasa se selecciona entre Phi29, Bst, Vent ADN polimerasa o una combinación de las mismas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dichos ribonucleótidos comprenden como máximo tres ribonucleótidos, de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina, tal como adenina o guanina, o una combinación de las mismas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la replicación y la amplificación comprenden además proporcionar al menos un oligonucleótido complementario a la molécula de ADN plantilla, una mezcla de oligonucleótidos aleatorios o una combinación de los mismos.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos una especie de nucleótidos o ribonucleótidos está modificada o marcada, preferiblemente con una etiqueta detectable.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el producto amplificado se detecta por fluorescencia y/o por medios químicos, por ejemplo mediante una sonda marcada con biotina o fluoróforo, y/o mediante amplificación en presencia de un dNTP conjugado con fluoróforo.
8. Uso de una ARN polimerasa dependiente de promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, para iniciar el cebado en una plantilla de ADN y, opcionalmente, amplificar la plantilla de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN que desplaza la cadena en presencia de desoxirribonucleótidos, en el que el inicio del cebado ocurre en presencia de como máximo tres ribonucleótidos, de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el inicio del cebado se realiza en presencia de 2 o 3 ribonucleótidos seleccionados entre GTP, ATP y CTP.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para amplificar una molécula de ADN monocatenario o bicatenario en forma lineal o circular, incluido el ADN genómico.
11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para la amplificación de ADN con fines terapéuticos, que incluye pero no se limita a terapia génica y vacunas.
12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, con fines forenses o de diagnóstico, por ejemplo en genotipificación, secuenciación de ADN, en la detección de ADN viral o bacteriano, o en la detección de una mutación de ácido nucleico.
13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que la ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única se selecciona del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas.
14. Uso de un kit de partes que comprende una ARN polimerasa dependiente de promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única, una ADN polimerasa dependiente de ADN con desplazamiento de cadena, o una mezcla de las mismas, como máximo 3 ribonucleótidos de los cuales al menos un ribonucleótido tiene una nucleobase de purina, desoxirribonucleótidos y, opcionalmente, una parte que contiene un tampón adecuado, para la amplificación de una molécula de ADN plantilla.

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la ARN polimerasa dependiente del promotor de la familia de ARN polimerasas de subunidad única se selecciona del grupo de ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 o variantes de las mismas.

Figura 1

1A



1B

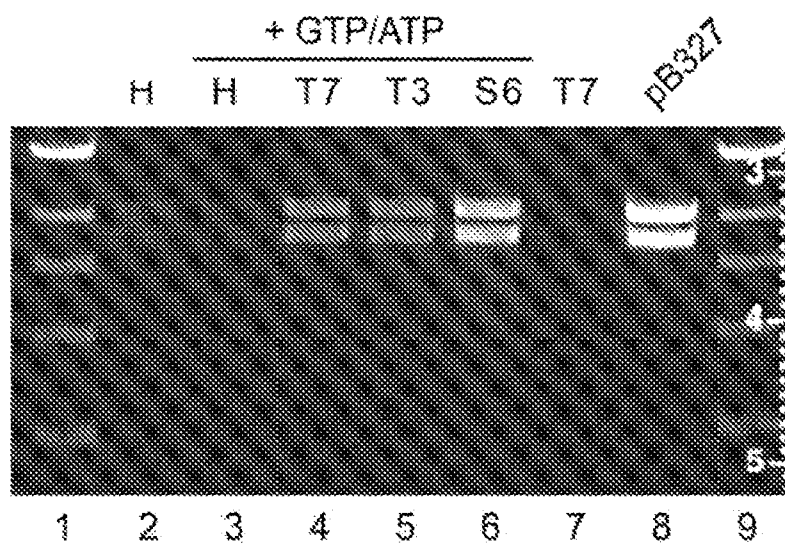
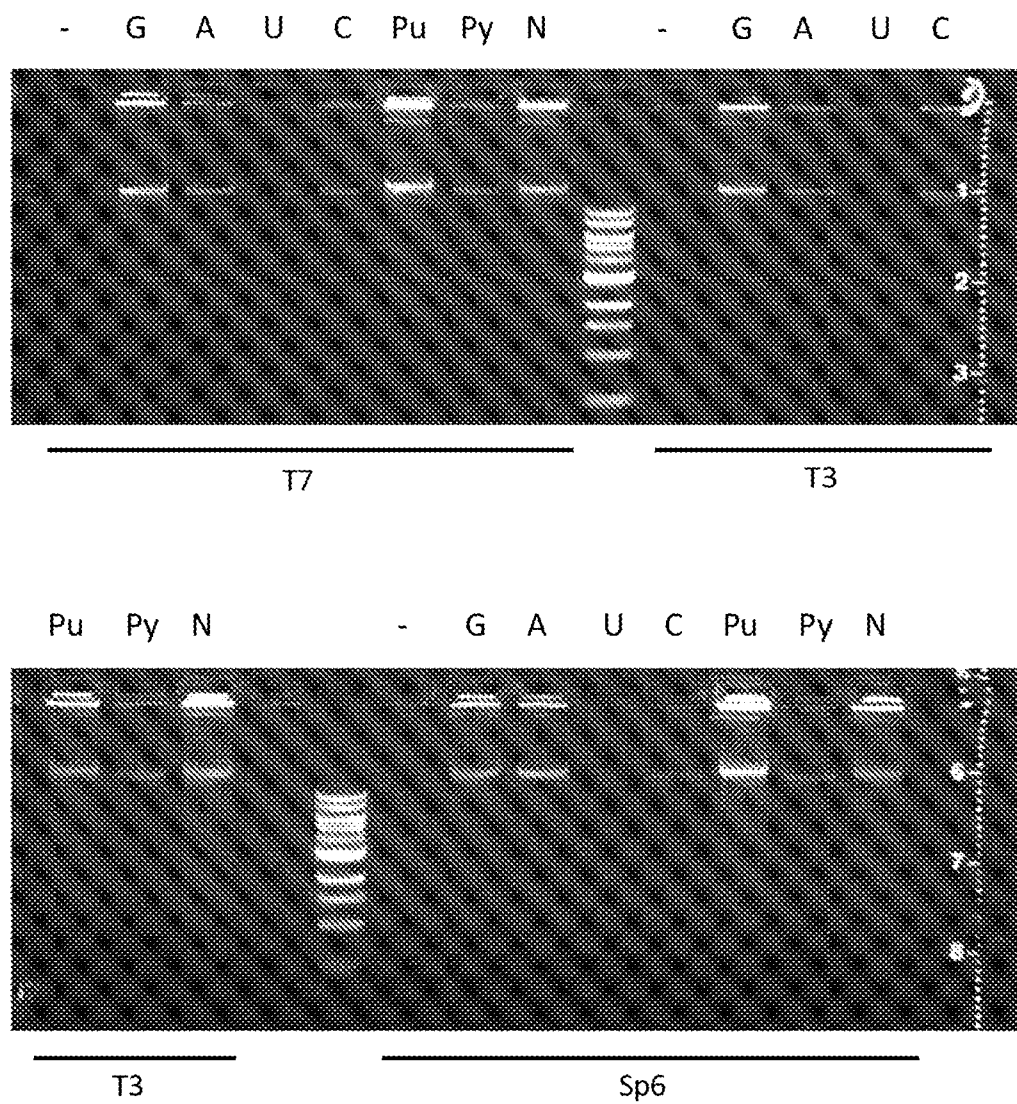


Figura 2

2A



2B

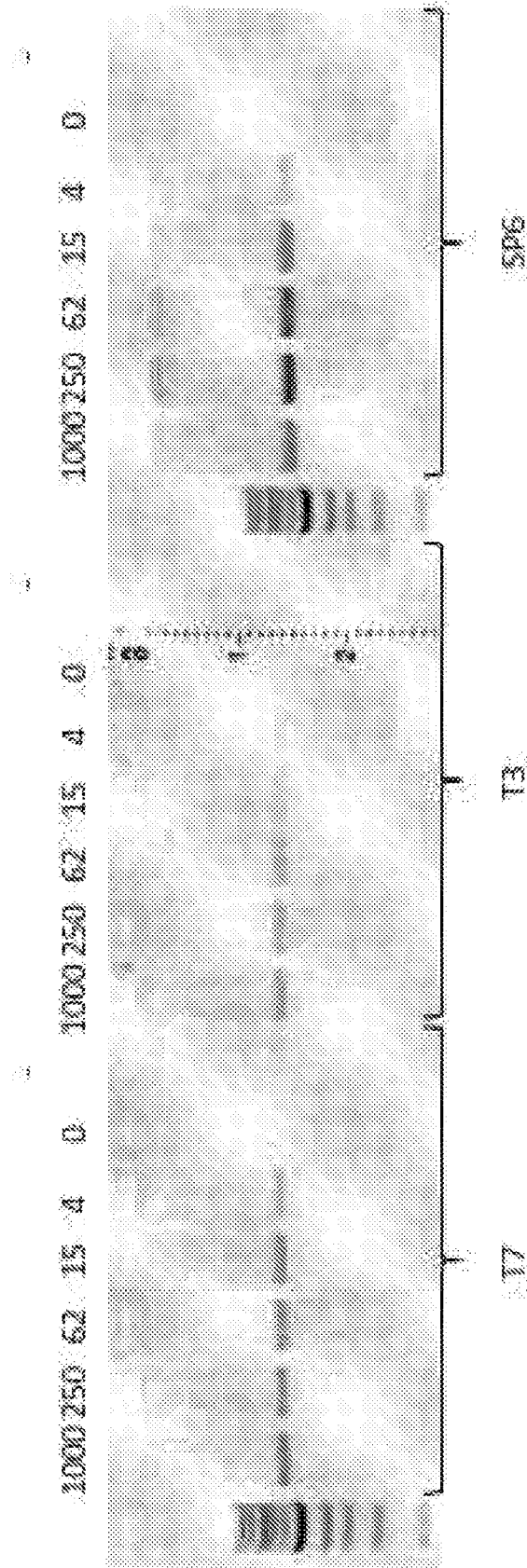


Figura 3

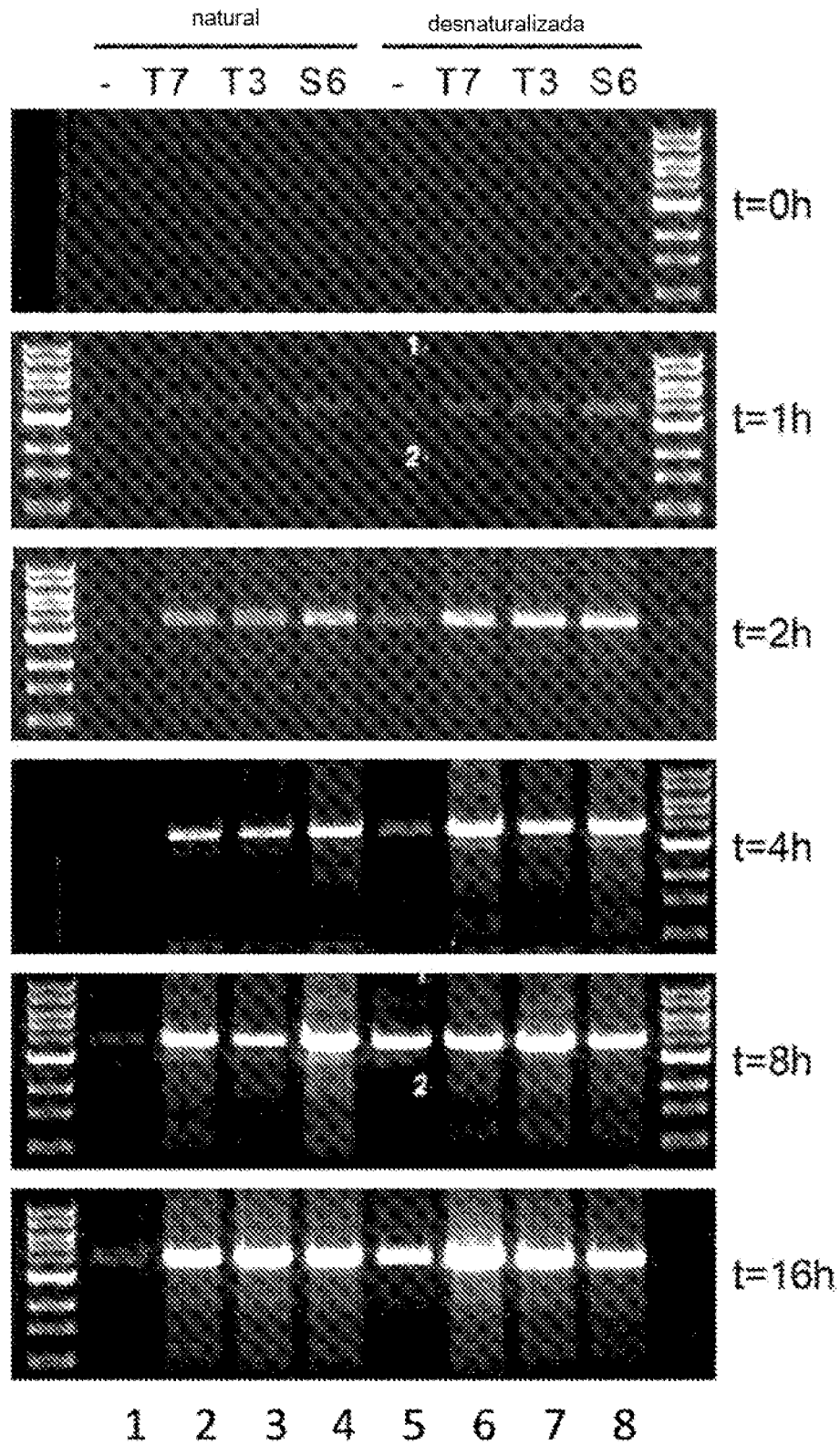


Figura 4

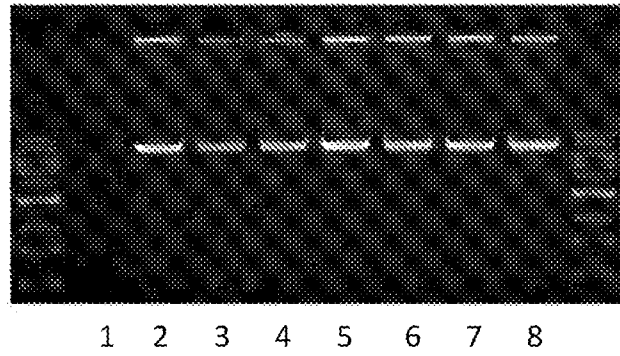
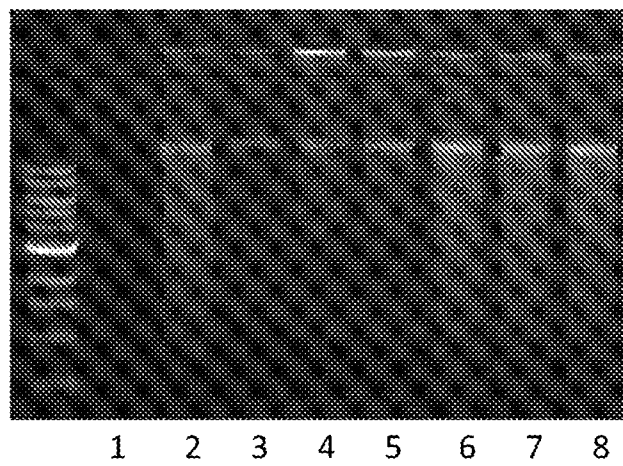


Figura 5

5A

HeLa genómico



5B

Control sin plantilla

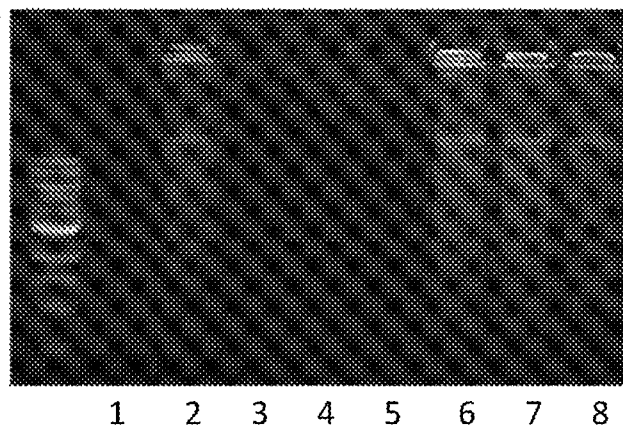
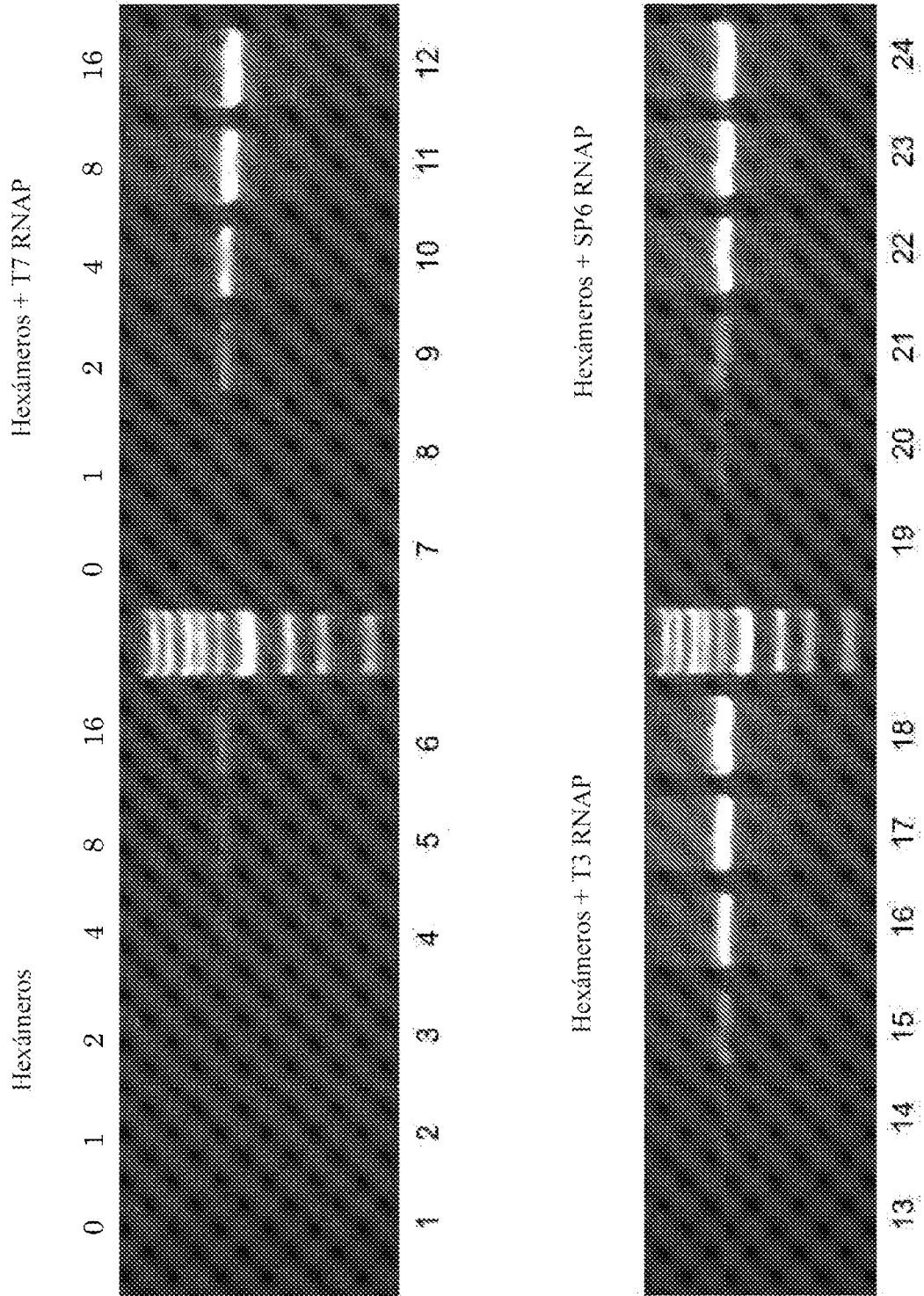
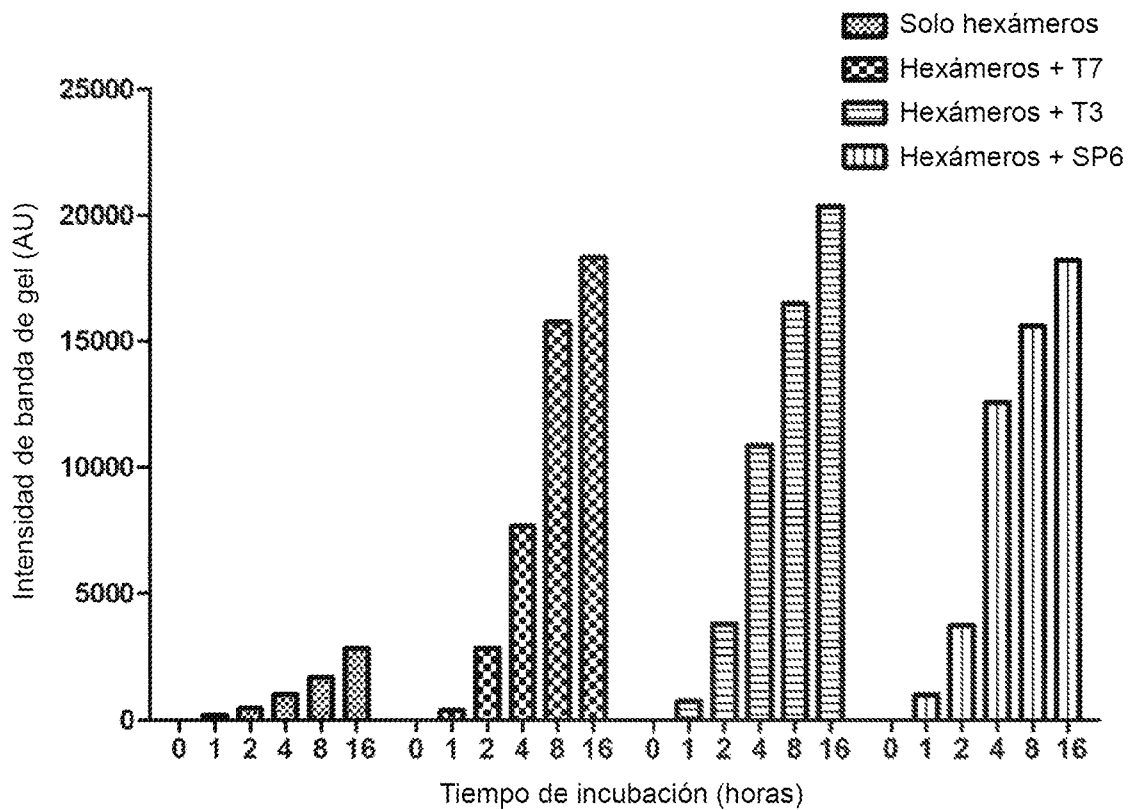
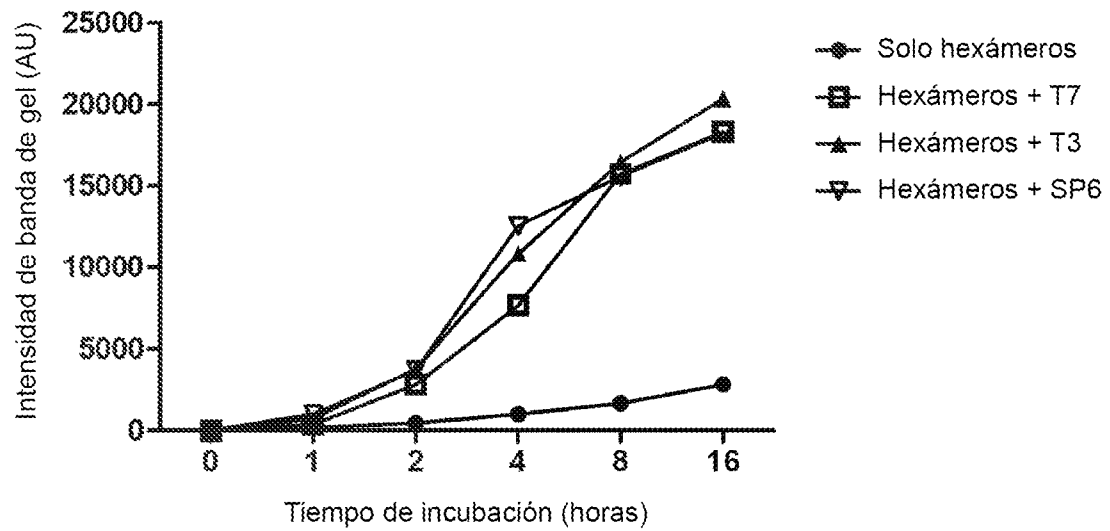


Figura 6

6A



6B



6C

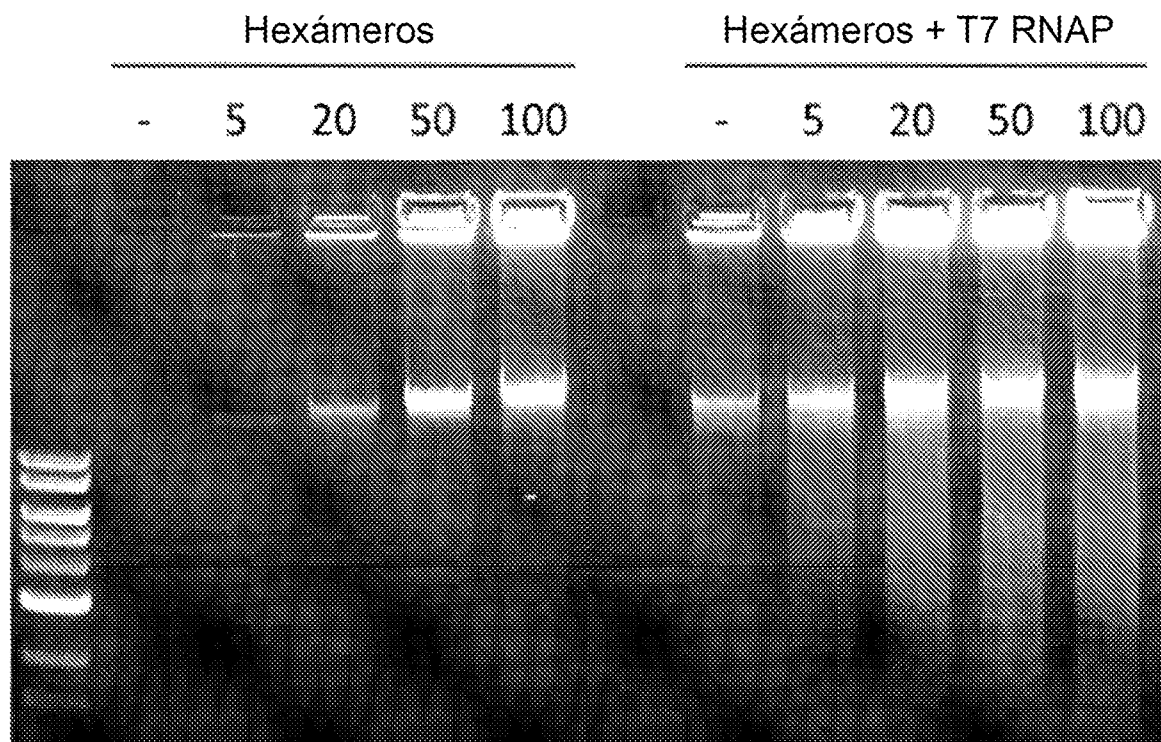
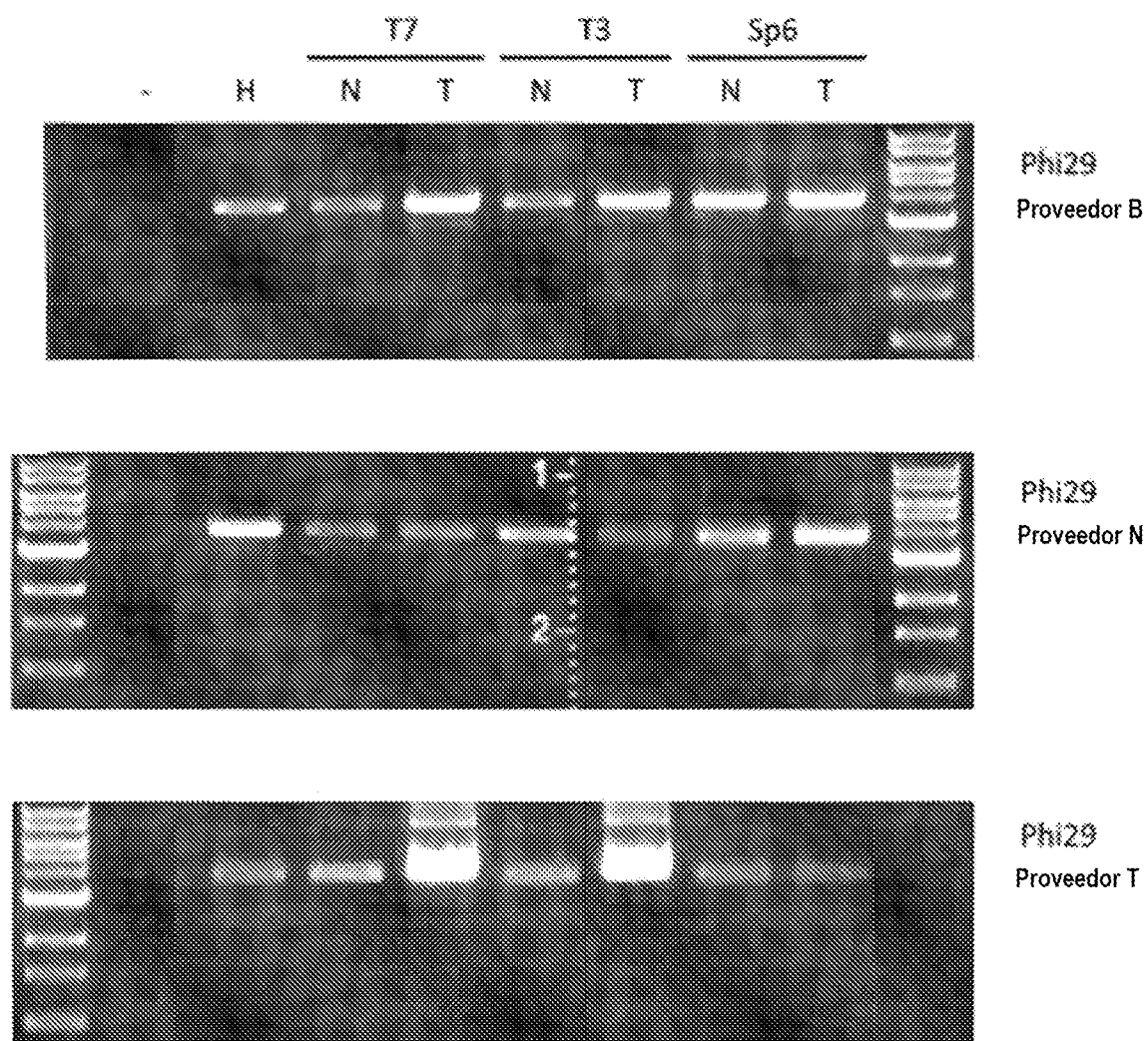


Figura 7

7A



7B

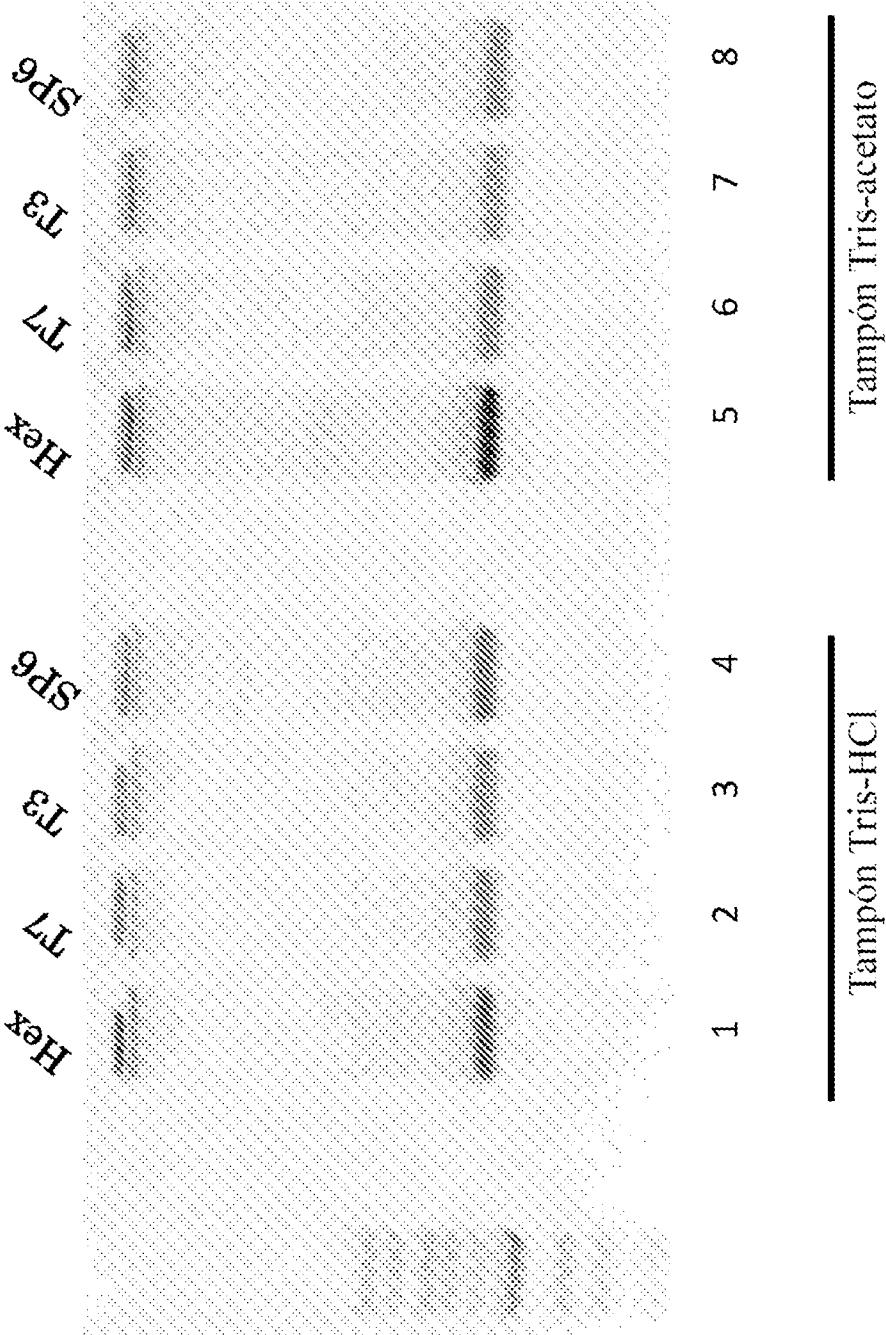


Figura 8

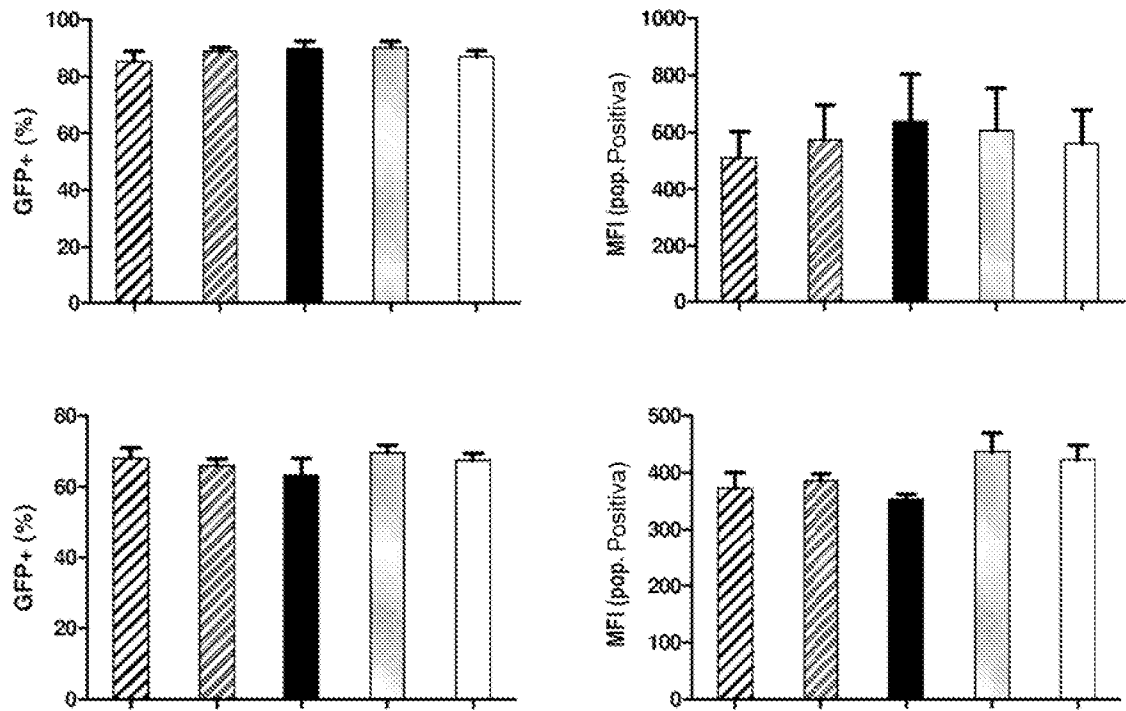


Figura 9

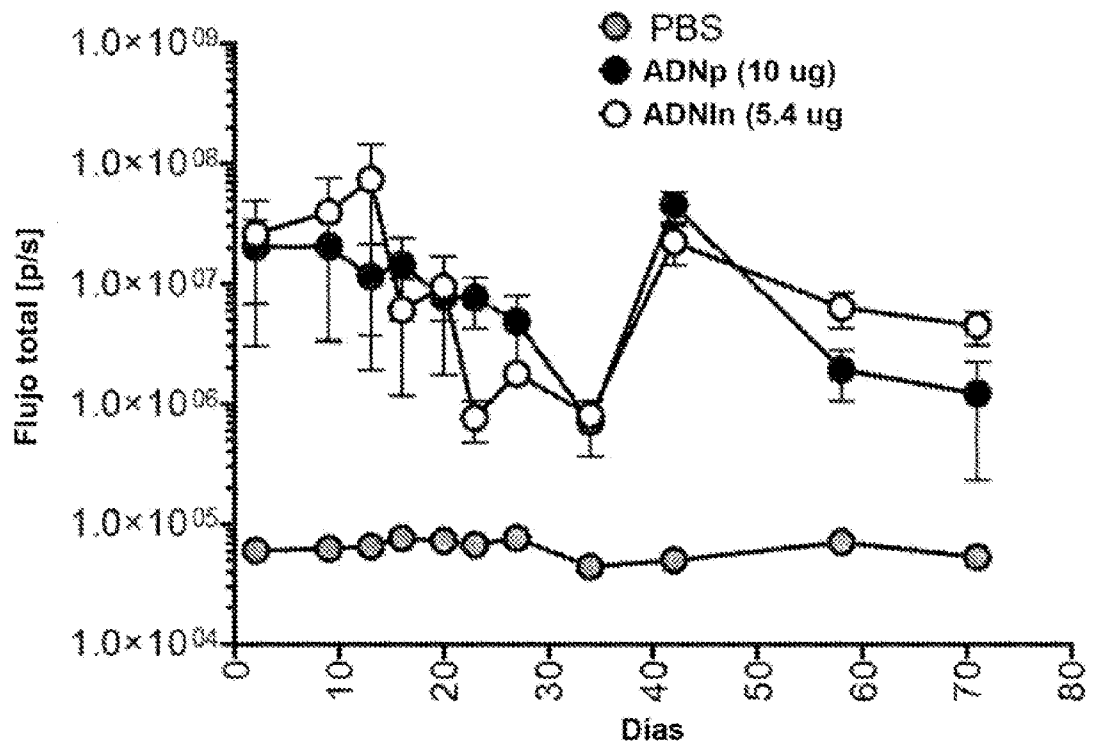
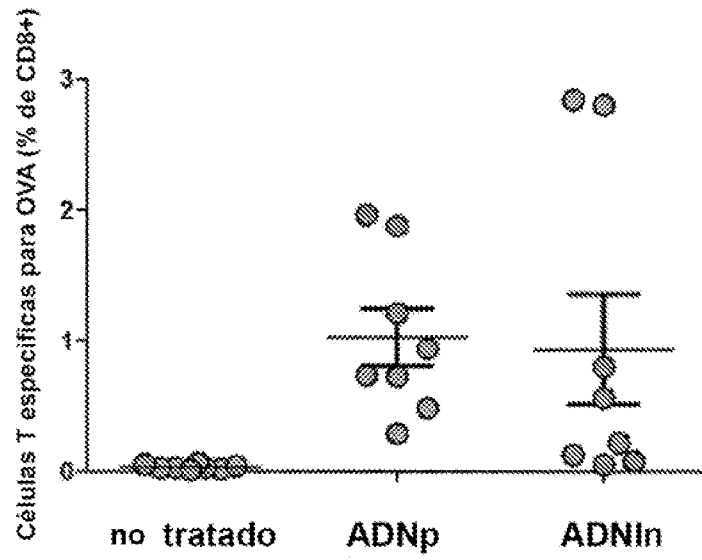


Figura 10

A



B

