

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 294**

21 Número de solicitud: 200930412

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **02.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2011**

Fecha de la concesión: **14.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **24.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**LAZARO BOLOS, JOSE MARIA;
VEGA JOSE, MIGUEL DE;
BLANCO DAVILA, LUIS;
SALAS FIGUERAS, MARGARITA y
MENCIA CABALLERO, MARIO**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **METODO PARA LA REPLICACIÓN, AMPLIFICACIÓN, O SECUENCIACIÓN DE UN ADN
MOLDE.**

57 Resumen:

Método para la replicación, amplificación o
secuenciación de un ADN molde.

La presente invención se encuadra dentro del campo
de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un
método para llevar a cabo la replicación, la
amplificación o la secuenciación de un ácido
desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo
{ph}29 y a un kit para llevar a cabo dicho método.

ES 2 351 294 B1

DESCRIPCIÓN

Método para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ y a un kit para llevar a cabo dicho método.

Estado de la técnica anterior

La única enzima requerida por el bacteriófago $\phi 29$ para replicar su genoma es su ADN polimerasa, una proteína monomérica de 66 KDa, capaz de catalizar tanto la iniciación de la replicación como la elongación de la cadena sintetizada. Para la iniciación, esta polimerasa se une a una proteína denominada "terminal" (TP), reconoce el extremo del ADN de $\phi 29$ y cataliza la formación de un complejo covalente TP-dAMP. Tras la polimerización de 10 nucleótidos, se disocia el heterodímero ADN polimerasa/TP y se lleva a cabo la elongación de la cadena naciente de ADN.

Las ADN polimerasas replicativas requieren la interacción con proteínas accesorias que estabilizan la unión entre la enzima y el ADN (Kuriyan y O'Donnell. *J Mol Biol.* 1993; 234: 915-925). Por otro lado, dichas ADN polimerasas necesitan acoplar la polimerización al desplazamiento de la cadena de ADN que no está siendo copiada, para lo cual requieren su asociación funcional a proteínas tipo helicasa. En este sentido, la ADN polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ presenta varias características funcionales intrínsecas que la hacen única:

a) Elevada procesividad (definida como el número de nucleótidos incorporados por evento de unión).

b) Alta capacidad de desplazamiento de cadena, lo que le permite replicar el genoma de dicho bacteriófago en ausencia de proteínas accesorias tipo helicasa. Estas dos características, procesividad y desplazamiento de cadena permiten que la ADN polimerasa de $\phi 29$ sea capaz de sintetizar cadenas de ADN de más de 70 kb de longitud (Blanco *et al.* *J Biol Chem.* 1989; 264: 8935-8940).

c) Alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena (Esteban *et al.* *J Biol Chem.* 1993; 268: 2719-2726).

Todas estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos de procesos isotérmicos (a temperatura constante) para la amplificación de ADN de doble cadena (ADNbc), basados en el uso de esta polimerasa. En una configuración simple, la capacidad de la ADN polimerasa de $\phi 29$ para usar ADN de cadena sencilla (ADNmc) circular permite una amplificación de ADN por el método del círculo rodante (o, RCA de las siglas en inglés de *rolling-circle amplification*), originando moléculas de ADNmc de gran longitud y que contienen más de 10 copias del molde circular (Blanco *et al.* *J Biol Chem.* 1989; 264: 8935-8940; US5001050, US5198543 y US5576204). En el procedimiento de amplificación de ADNbc desarrollado por Amersham Biosciences/Molecular Staging (Dean *et al.* *Genome Res.* 2001; 11: 1095-1099; Dean *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 5261-5266), la combinación del uso de la ADN polimerasa de $\phi 29$ con el de hexámeros (hexa-nucleótidos) cebadores de secuencias al azar, permiten obtener factores de amplificación de 10^4 - 10^6 partiendo de picogramos de ADN plasmídico circular [Templiphi™ de GE Healthcare] o de 10 nanogramos de ADN genómico [Genomiphi™ de GE Healthcare y Repli-G® de Qiagen]. Los productos originados son de alta calidad y pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa, habiéndose demostrado que la ADN polimerasa de $\phi 29$ es la enzima más robusta para este fin. El tampón habitual para llevar a cabo las reacciones de amplificación con la ADN polimerasa de $\phi 29$ contiene Tris-HCl (pH 7,5) más distintas concentraciones (en el orden milimolar) de NaCl o KCl y $MgCl_2$ (US20030207267). Sin embargo, a pesar de la bondad de estos protocolos en situaciones muy diversas, es una necesidad creciente el desarrollar otros que permitan partir de cantidades menores de ADN.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ y a un kit para llevar a cabo dicho método.

La ADN polimerasa del fago $\phi 29$ presenta varias características de gran interés para la amplificación de ADN como son: una elevada procesividad sin necesidad del concurso de ninguna proteína accesoria y una alta capacidad de desplazamiento de cadena que le permiten replicar el genoma de dicho bacteriófago en un solo evento de unión al ADN, así como una alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena. Estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos para la amplificación isotérmica de ADN, basados en el uso de esta polimerasa que permiten la obtención de productos de alta calidad que pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa. Sin embargo, existe una necesidad de protocolos que permitan la amplificación de ADN a partir de cantidades menores del mismo. La presente invención responde a esta necesidad mediante el desarrollo de un método de amplificación de ADN que mejora significativamente la especificidad y el rendimiento de la reacción.

En los ejemplos de esta patente se muestra que la adición simultánea de monolaurato de sorbitán polioxitilenado (Tween® 20) y una sal de amonio al tampón usado habitualmente para la amplificación con la ADN polimerasa de $\phi 29$,

por un lado, evita la amplificación inespecífica de ADN y, por otro, permite la amplificación detectable y específica a partir de cantidades límite de 0,1 femtogramos (fg) de ADN plasmídico y 10 fg de ADN genómico como molde.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:

- a) una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
- c) una sal de amonio,
- d) un tampón,
- e) cloruro magnésico,
- f) un cebador, y
- g) nucleósidos trifosfato.

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende los elementos (a)-(g) mencionados anteriormente y que además comprende una sal de potasio. Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

El término “ADN polimerasa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. Generalmente, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' de un cebador hibridado con una secuencia de ADN molde, y procede en dirección al extremo 5' de la hebra del ADN molde.

El término “ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ ”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier ADN polimerasa que contiene subdominios TPR1 y TPR2 en su dominio de polimerización, que proporcionan a la polimerasa la capacidad de acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento de cadena. Ejemplos de ADN polimerasas del tipo $\phi 29$ que pueden ser empleadas en la presente invención se seleccionan de la lista que comprende las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

El dominio exonucleasa de las ADN polimerasas del tipo $\phi 29$ es conocido y puede ser modificado para reducir la actividad exonucleasa reteniendo una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de cadena. Estas ADN polimerasas modificadas son especialmente útiles para secuenciar moléculas largas.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ presenta una modificación en el dominio exonucleasa, donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural o “wild type”. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada tiene menos del 1% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de entre 5 nM y 75 nM. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de entre 25 nM y 60 nM. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de aproximadamente 50 nM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 20) está a una concentración de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total

de la reacción. En una realización más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de aproximadamente 0,025% del volumen total de la reacción. Por “volumen total de la reacción”, se entiende el volumen resultante tras la adición del ADN molde a la mezcla de reacción.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es sulfato de amonio. En una realización más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de aproximadamente 45 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es cloruro de amonio. En una realización más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es acetato de amonio. En una realización más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización más preferida, el tampón está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón está a un pH de aproximadamente 7,5.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES. En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de aproximadamente 7,5.

En una realización preferida de este aspecto del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 25 mM y 50 mM. En una realización más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 30 mM y 45 mM. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de aproximadamente 40 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM. En una realización más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de aproximadamente 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM. En una realización más preferida, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro magnésico está aproximadamente a 10 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de entre 40 mM y 50 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de 45 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una más realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

El término “replicación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a partir de un ADN molde.

El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ADN molde.

El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ADN molde.

Por “poner en contacto” se entiende que el ADN molde y la mezcla de reacción se incuban en condiciones de extensión del cebador.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse, a la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de deoxinucleótidos en el ADN molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término “cebador específico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de deoxinucleótidos en el ADN molde que se quiere amplificar.

Por “complementaria” se entiende que el cebador puede hibridar con una región del ADN molde de forma que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferentemente, esa región tiene una complementariedad del 100% con una región del ADN molde. Esto es, cada nucleótido en la región de complementariedad con el cebador puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en el molde de hebra sencilla. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que cebadores que posean una región con complementariedad menor al 100% respecto al ADN molde funcionarán para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

El término “cebador arbitrario” se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde. Por lo general, en el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención se emplea una población de cebadores arbitrarios. El término “cebadores arbitrarios” se refiere a un conjunto de cebadores con una secuencia aleatoria y que se usan para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es específico.

En otra realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es arbitrario. Preferiblemente, el cebador arbitrario está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'. Y más pre-

feriblemente, el cebador arbitrario es un oligonucleótido de 6 nucleótidos, “hexanucleótido” o “hexámero” protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

La expresión “protegido frente a la acción de exonucleasas”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador modificado de forma que es resistente a la degradación nucleolítica por cualquier actividad exonucleasa 3'-5' presente en la ADN polimerasa.

En el método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención puede emplearse más de un cebador, pudiendo emplearse cebadores específicos y/o arbitrarios.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador está a una concentración de entre 2 μM y 100 μM . En una realización más preferida, el cebador está a una concentración de entre 20 μM y 80 μM . En una realización aún más preferida, el cebador está a una concentración de entre 40 y 60 μM . En una realización aún más preferida, el cebador están a una concentración de aproximadamente 50 μM .

El término “nucleósidos trifosfato”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y tres grupos fosfato.

El término nucleósidos trifosfato incluye desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. Preferiblemente, los desoxinucleósidos trifosfato son dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Aún más preferiblemente, estos cuatro dNTPs están en condiciones equimolares. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 100 μM y 800 μM . En una realización más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 200 μM y 600 μM . En una realización aún más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de aproximadamente 500 μM .

El término nucleósidos trifosfato también incluye didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, ddATP, ddCTP, ddITP, ddUTP, ddGTP, ddTTP, o derivados de los mismos.

En algunas realizaciones preferidas del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. El nucleótido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

El término “ADN molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN que puede servir como sustrato para la síntesis de una cadena de ADN complementaria; es decir, se refiere a una molécula de ADN que va a ser replicada, amplificada o secuenciada. En una realización preferida el ADN molde es ADN plasmídico. En otra realización preferida, el ADN molde es ADN genómico.

La replicación, la amplificación o la secuenciación del ADN molde se lleva a cabo en condiciones de extensión de cebador. La expresión “condiciones de extensión de cebador” hace referencia a las condiciones en que puede tener lugar la síntesis dependiente de ADN molde iniciada en un cebador.

La síntesis de un ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

Por “condiciones isotérmicas” se entiende temperatura esencialmente constante. Preferiblemente, la síntesis del ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención tiene lugar a una temperatura esencialmente constante. Más preferiblemente, a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 40°C, y aún más preferiblemente, de aproximadamente 30°C.

Son conocidos en el estado de la técnica un amplio número de métodos que permiten la amplificación de ADN. Algunos métodos requieren un proceso de ciclado térmico como, por ejemplo, pero sin limitarse, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros métodos no requieren un proceso de ciclado térmico, sino que se realizan a una temperatura esencialmente constante como, por ejemplo, pero sin limitarse, la amplificación por círculo rodante (RCA), la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación mediante lazo (LAMP). La amplificación de un ADN molde según el método de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

Preferiblemente, la amplificación del ADN molde según el método de amplificación de la presente invención tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), mediante amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende elementos apropiados para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención que comprende:

- a) una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
- c) una sal de amonio,
- d) un tampón, y
- e) cloruro magnésico.

Preferiblemente, dicha sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además una sal de potasio. Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además un cebador. En una realización más preferida, el cebador es un cebador arbitrario que está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además nucleósidos trifosfato. Por ejemplo, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además desoxinucleósidos trifosfato y/o un didesoxinucleósido trifosfato.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador marcado. El nucleósido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el efecto del Tween[®] 20 y del (NH₄)₂SO₄ en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb). Después de incubar a 30°C durante 5 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. A la izquierda, los fragmentos de ADN lineales obtenidos después de digestión del ADN de $\phi 29$ con *Hind*III, usados como marcadores de longitud del ADN.

Figura 2. Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN plasmídico (en el orden de femtogramos) por la ADN polimerasa de $\phi 29$ en presencia de Tween[®] 20 y (NH₄)₂SO₄. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween[®] 20 al 0,025% y de (NH₄)₂SO₄ 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 3. Muestra el efecto del ión NH₄⁺ en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween[®] 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada así como de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb). Después de incubar a 30°C durante 6 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 4. Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN genómico de *Bacillus subtilis* por la ADN polimerasa de $\phi 29$ en presencia de Tween[®] 20 y (NH₄)₂SO₄. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween[®] 20 al 0,025% y de (NH₄)₂SO₄ 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 5. Muestra la notable mejora que representa el añadir Tween[®] 20 al 0,025% y (NH₄)₂SO₄ 45 mM al actual tampón de reacción de un kit comercial para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de $\phi 29$ (Ilustra kit de General Electrics HealthCare). El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Ejemplos

Optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación de ADN con cebado múltiple por la ADN polimerasa de $\phi 29$

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Se ha mostrado que la ADN polimerasa de $\phi 29$ realiza una amplificación de 10^4 - 10^6 veces partiendo de varios picogramos de ADN circular. Para este fin se empleó un tampón de reacción que contiene Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, KCl 50 mM y $MgCl_2$ 10 mM (en lo sucesivo Tampón A). Después de probar la influencia de diferentes condiciones de detergentes y sales en la capacidad de amplificación de ADN de la ADN polimerasa de $\phi 29$, encontramos que la adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM al Tampón A mejora mucho la amplificación de cantidades limitadas de ADN aportado.

Condiciones de la reacción de amplificación de ADN plasmídico.- La mezcla de incubación contenía en 12,5 μ l de tampón A, 50 μ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500 μ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP), las cantidades indicadas de un ADN plasmídico (con un tamaño de 4,2 kbp) y, donde se indica, se adicionó $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM o Tween® 20 al 0,025% o una combinación de ambos. La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95°C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de $\phi 29$ 50 nM y se detuvo después de la incubación a 30°C mediante calentamiento a 65°C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 μ l de las reacciones, se digirió el ADN amplificado con la endonucleasa de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.

*Condiciones de la reacción de amplificación de ADN genómico.- La mezcla de incubación contenía en 12,5 μ l de tampón A, $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM, Tween® 20 al 0,025%, 50 μ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500 μ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP) y las cantidades indicadas de ADN genómico de *Bacillus subtilis* (con un tamaño de 4 Mpb). La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95°C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de $\phi 29$ 50 nM y se detuvo después de la incubación a 30°C mediante calentamiento a 65°C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 μ l de las reacciones y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.*

La Figura 1 muestra el efecto de añadir $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM y Tween® 20 al 0,025% en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico aportado. Como se muestra, la ADN polimerasa de $\phi 29$ no dio ningún producto de amplificación detectable con el Tampón A estándar cuando se usaron 100 fg de ADN aportado. En estas condiciones de reacción, la adición de Tween® 20 al 0,025% en ausencia de ADN causó la aparición de productos de ADN en forma de rastro, lo más probable como una consecuencia de la amplificación inespecífica de ADN causada por la hibridación y elongación de los cebadores hexámeros aleatorios. Se observó el mismo rastro con 10 fg de ADN aportado. Sin embargo, en presencia de 100 fg de ADN aportado, la adición de Tween® 20 al 0,025% permitió que la ADN polimerasa de $\phi 29$ produjera una cantidad detectable de plásmido amplificado. La producción total de ADN amplificado, específico o inespecífico, indica que la adición de Tween® 20 al 0,025% al Tampón A potencia la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$. Se observó un efecto similar con el detergente NP40. Por el contrario, otros detergentes analizados como Tritón X100 y Tritón X114 no potenciaban la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$ (no se muestra). La adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM al tampón A tenía dos consecuencias en el rendimiento y la especificidad de los productos amplificados: 1) no se detectó amplificación de ADN en ausencia de ADN aportado; 2) se obtuvieron por amplificación varios μ g de ADN plasmídico de unidad longitud, incluso cuando la cantidad de ADN aportado era tan baja como 10 fg. Como control, la adición de $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM al Tampón A no produjo ninguna mejora en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$.

Por lo tanto, podemos concluir que la adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM al Tampón A (en lo sucesivo Tampón B) produce una clara optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación con cebado múltiple de ADN circular por la ADN polimerasa de $\phi 29$, siendo ambos reactivos absolutamente necesarios para amplificar cantidades limitadas (10 fg) de ADN aportado. De hecho, como puede verse en la Figura 2, el uso de Tampón B permitió a la ADN polimerasa de $\phi 29$ sintetizar microgramos de ADN usando una cantidad de plásmido aportado tan baja como 0,1 fg (~24 moléculas) después de 6 horas de reacción. Como control de calidad, la digestión de los productos de amplificación con EcoRI generó fragmentos de ADNbc lineales de 4,2 kb, que indicaban que el producto de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original. De nuevo, el Tampón B también evitó la amplificación de ADN inespecífico (véase en la Figura 2 las calles correspondientes a las reacciones llevadas a cabo sin ADN aportado).

La Figura 3 muestra el efecto de los iones amonio y Tween® 20 al 0,025% en la mejora en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones anteriormente comentadas en

presencia Tween® 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada. Como se puede observar en la Figura 3 tanto el NH_4Cl como el $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ tuvieron un efecto similar al $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tanto en el rendimiento como en la especificidad de los productos amplificados. Este resultado indica que el efecto anteriormente descrito del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la amplificación de cantidades limitantes de ADN plasmídico es debido a los iones NH_4^+ .

Para determinar si las condiciones optimizadas descritas antes también se aplicaban a la amplificación de ADN genómico, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos realizados en presencia de concentraciones limitadas de ADN genómico de *B. subtilis* (4 Mpb de longitud). Como se muestra en la Figura 4, la presencia de Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM en el tampón B, por una parte evitaba la amplificación inespecífica de ADN (calles sin ADN aportado), y por otra parte, permitía a la ADN polimerasa de $\phi 29$ dar amplificación detectable y específica del ADN genómico incluso cuando se usaban 10 fg de ADN aportado, es decir, una cantidad 106 veces inferior a la recomendada en los actuales kits de amplificación genómica comerciales.

Para determinar si la adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM incrementa la eficiencia de amplificación de los actuales kits comerciales para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de $\phi 29$, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos de amplificación de ADN plasmídico descrito en las Figuras 1, 2 y 3. En la Figura 5 se muestra la notable mejora que representa el añadir Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al actual tampón de reacción del kit Illustra (GE HealthCare). Como se puede observar, siguiendo las recomendaciones del proveedor, con el kit Illustra sólo se puede amplificar de manera detectable en gel de agarosa cantidades de plásmido aportado iguales o superiores a 10 pg. Por el contrario, la adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mM al tampón de reacción del kit Illustra disminuye de manera notable la cantidad necesaria de ADN que puede amplificarse, observándose productos de amplificación desde 1 fg aportado de ADN plasmídico, suponiendo una mejora de cuatro órdenes de magnitud en la amplificación.

REIVINDICACIONES

1. Método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:
 - a) una ADN polimerasa del tipo ϕ 29,
 - b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
 - c) una sal de amonio,
 - d) un tampón,
 - e) cloruro magnésico,
 - f) un cebador, y
 - g) nucleósidos trifosfato.
2. Método según la reivindicación 1 donde la mezcla de reacción además comprende una sal de potasio.
3. Método según la reivindicación 2 donde la sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción.
5. Método según la reivindicación 4 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción.
6. Método según la reivindicación 5 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.
8. Método según la reivindicación 7 donde la sal de amonio es sulfato de amonio.
9. Método según la reivindicación 8 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM.
10. Método según la reivindicación 9 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM.
11. Método según la reivindicación 7 donde la sal de amonio es cloruro de amonio o acetato de amonio.
12. Método según la reivindicación 11 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM.
13. Método según la reivindicación 12 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: ϕ 29, Cp-1, PRD-1, ϕ 15, ϕ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o ABV.
15. Método según la reivindicación 14 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1.
16. Método según la reivindicación 15 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1.
17. Método según la reivindicación 16 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene la secuencia aminoacídica SEO ID NO: 1.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 presenta una modificación en el dominio exonucleasa y donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

19. Método según la reivindicación 18 donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada tiene menos del 1% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

20. Método según la reivindicación 19 donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 donde el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 donde el tampón está a un pH de entre 7 y 8,5.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM.

24. Método según la reivindicación 23 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 24 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM.

26. Método según la reivindicación 25 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 donde los nucleósidos trifosfato son dCTP, dGTP, dTTP y dATP.

28. Método según la reivindicación 27 donde los nucleósidos trifosfato dCTP, dGTP, dTTP y dATP se encuentran en cantidades equimolares.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 donde el cebador es arbitrario y está protegido contra la acción de exonucleasas.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 donde el ADN molde es ADN plasmídico.

31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 donde el ADN molde es ADN genómico.

32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 donde la amplificación se realiza a una temperatura esencialmente constante entre 25 y 40°C.

33. Método de amplificación de un ADN molde según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 donde la amplificación tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).

34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

35. Kit para llevar a cabo un método según las reivindicaciones 1 a 34 que comprende:

- a) una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
- c) una sal de amonio,
- d) un tampón, y
- e) cloruro magnésico.

36. Kit según la reivindicación 35 que además comprende una sal de potasio.

37. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 ó 36 que además comprende un cebador.

38. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 que además comprende el cebador según la reivindicación 29.

39. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38 que además comprende nucleósidos trifosfato.

40. Kit según las reivindicaciones 37 a 39 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

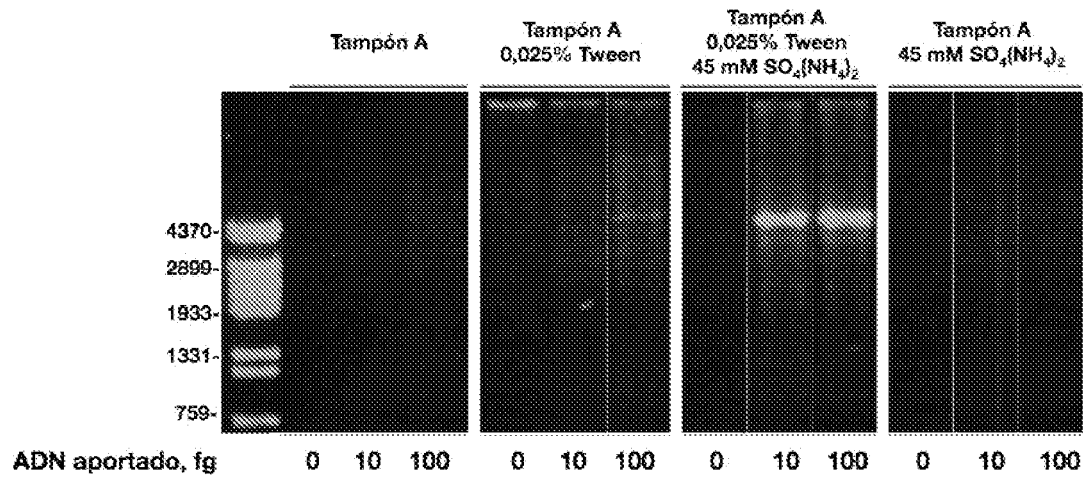


FIG. 1

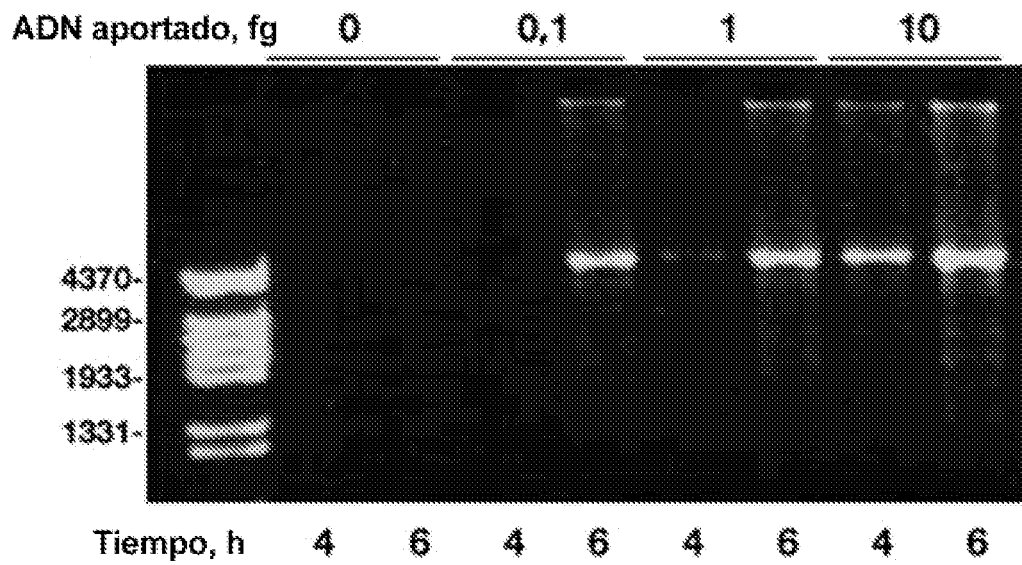


FIG. 2

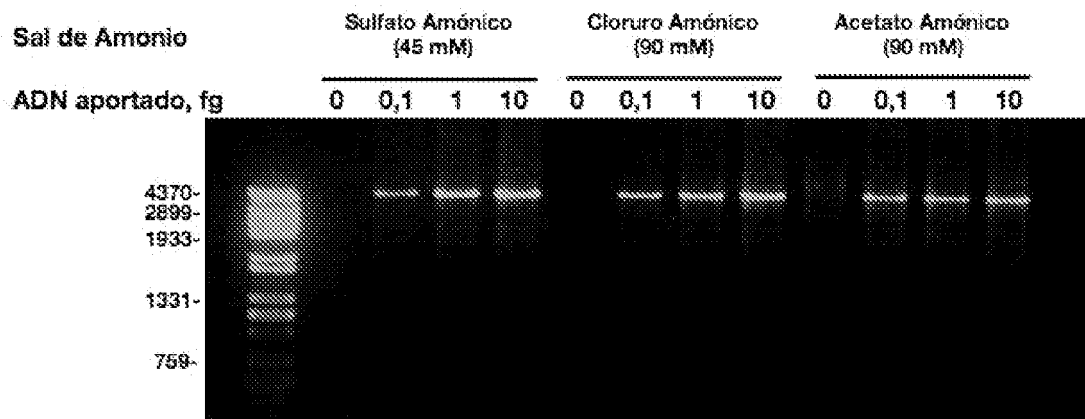


FIG. 3

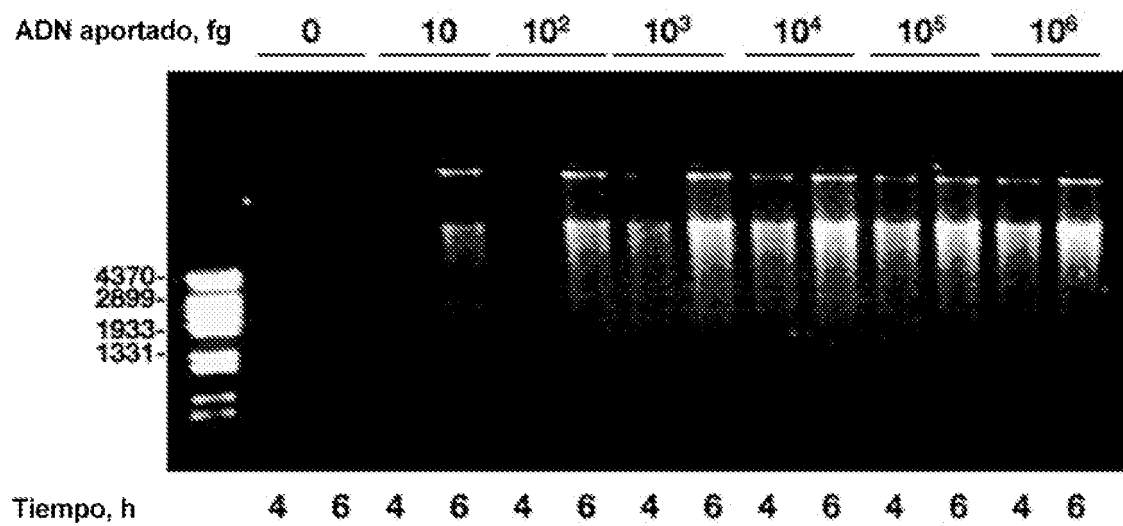


FIG. 4

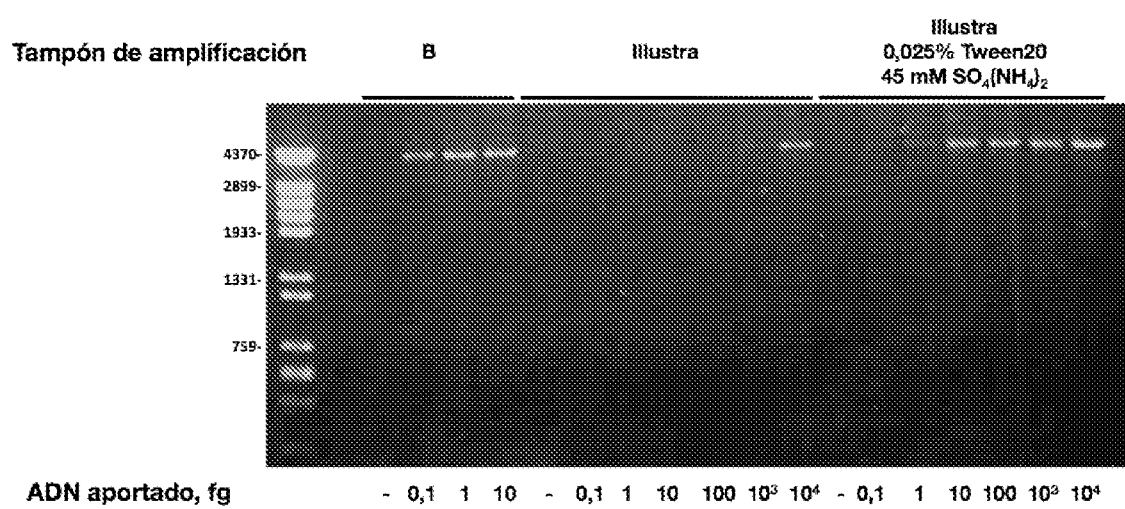


FIG. 5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Método para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.

<130> ES1641.386.2

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 572

<212> PRT

20 <213> Bacteriophage phi-29

<400> 1

25	Met	Pro	Arg	Lys	Met	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	Lys	Val	1	5	10	15
30	Glu	Asp	Cys	Arg	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Met	Asn	Ile	Glu	Asp	His	20	25	30	
35	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Met	Ala	Trp	Val	35	40	45	
40	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe	His	Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	50	55	60	
45	Ala	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe	Lys	Trp	Ser	Ala	65	70	75	80
50	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Arg	Met	Gly	Gln	85	90	95	
55	Trp	Tyr	Met	Ile	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	Lys	Ile	100	105	110	
60	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro	Val	Lys	115	120	125	
65	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Ile	Asp	130	135	140	
	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu	Glu	Tyr	145	150	155	160
	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Arg	Leu	Leu	Ile	165	170	175	
	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	Ser	Leu	180	185	190	

ES 2 351 294 B1

Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys Val Phe
 195 200 205
 5
 Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala Tyr Arg
 210 215 220
 10
 Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu Ile Gly
 225 230 235 240
 15
 Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln Met Tyr
 245 250 255
 20
 Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly Lys Tyr
 260 265 270
 Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg Cys Glu
 275 280 285
 25
 Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys Arg Ser
 290 295 300
 30
 Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly Glu Ile
 305 310 315 320
 35
 Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys Glu His
 325 330 335
 40
 Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe Lys Ala
 340 345 350
 45
 Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr Ile Lys
 355 360 365
 50
 Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met Leu Asn
 370 375 380
 55
 Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly Lys Val
 385 390 395 400
 60
 Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly Glu Glu
 405 410 415
 65
 Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile Thr Ala
 420 425 430
 Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Arg
 435 440 445

ES 2 351 294 B1

Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr Glu Ile
 450 455 460
 5
 Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Trp
 465 470 475 480
 10
 Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Val Lys Tyr Leu Arg Gln Lys Thr
 485 490 495
 15
 Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val Glu
 500 505 510
 20
 Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys Cys Ala
 515 520 525
 25
 Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys
 530 535 540
 30
 Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly
 545 550 555 560
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 565 570



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930412

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SHOAIB, M., BACONNAIS, S., MECHOLD, U. et al. Multiple displacement amplification for complex mixtures of DNA fragments. BMC Genomics. Septiembre 2008, Vol. 9, Nº 1, páginas 415-429. ISSN 1471-2164. En especial discusión, conclusiones y métodos.	1-3,7 8,11,14-40
Y		4-6
A		9,10,12,13
Y	HART, M. C., GREEN, D. H., BRESNAN, E., BOLCH, C. J. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of <i>Dinophysis</i> (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. Harmful Algae. Enero 2007, Vol. 6, Nº 2, páginas 271-287. ISSN 1568-9883. <Doi:10.1016/j.hal.2006.10.001>. En especial apartado 2.2.	4-6
A		1,7-13,21-24, 27-31,34,35,37-40
A	BLANCO, L., PRIETO, I., GUTIÉRREZ, J. et al. Effect of NH ₄ ⁺ ions on ϕ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. Journal of Virology. Diciembre 1987, Vol. 61, Nº 12, páginas 3983-3991. ISSN 0022-538X.	1-3,7-17,21-40
A	WO 2001025483 A2 (STRATAGENE) 12.04.2001, páginas 16-19; ejemplo 3.	1-13,21-31,34-40
A	US 5198543 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 30.03.1993, todo el documento.	1,7-24,27-35, 37-40
A	BLASCO, M. A., BLANCO, L., PARÉS, E., et al. Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage ϕ 29 DNA polymerase. Nucleic Acids Research. Agosto 1990, Vol. 18, Nº 16, páginas 4763-4770. ISSN 0305-1048. & Base de datos UniProt. Número de acceso Q38545, Versión 44. [en línea] 16.12.2008 [recuperado el 19.10.2010] Recuperado de Internet: <URL:http://www.ebi.ac.uk/uniprot/unisave/?help=0&session=/ebi/extserv/old-work/SESSION23172-1287478337-1&index=8&view=623246632&issue_date=16-DEC-2008>	1,14-17,21-24, 27-32,34,35,37-40

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.12.2010

Examinador
E. Relafío Reyes

Página
1/6

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-6, 9-13, 15-20, 22, 29, 30, 34-40	SI
	Reivindicaciones 1-3, 7, 8, 14, 21, 23-28, 31-33	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 9, 10, 12, 13	SI
	Reivindicaciones 1-8, 11, 14-40	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SHOAIB, M. et al. BMC Genomics. Septiembre 2008, Vol. 9, Nº 1, páginas 415-429.	15.09.2008
D02	HART, M. C. et al. Harmful Algae. Enero 2007, Vol. 6, Nº 2, páginas 271-287.	01.2007
D03	BLANCO, L. et al. Journal of Virology. Diciembre 1987, Vol. 61, Nº 12, páginas 3983-3991.	12.1987
D04	WO 2001025483 A2	12.04.2001
D05	US 5198543 A	30.03.1993
D06	BLASCO, M. A. et al. Nucleic Acids Research. Agosto 1990, Vol. 18, Nº 16, páginas 4763-4770.	08.1990

En D01 se optimiza un procedimiento para amplificar mezclas de moléculas de ADN genómico de pequeño tamaño. Para ello, se realiza una amplificación mediante MDA con la polimerasa de $\phi 29$.

D02 presenta un estudio sobre la diversidad génica de diversas especies del género *Dinophysis*, mediante la amplificación de una región del ADN ribosómico con las enzimas *Pfu* o *Taq*.

En D03 se muestra un estudio sobre el efecto de los iones NH_4^+ en la replicación de $\phi 29$. La adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, aumenta la replicación del virus, probablemente por la estabilización del complejo ADN polimerasa-proteína terminal. Los iones K^+ , también producen un incremento en la replicación de $\phi 29$, aunque en menor medida.

D04 divulga un procedimiento de amplificación de ADN en el que se utilizan simultáneamente las polimerasas *Pfu* y *Taq*. Con tal fin, ha de optimizarse la mezcla de reacción, para lo cual hay que tener en cuenta el tampón, el pH, la concentración de Tween 20, y la presencia de sales de potasio o de sulfato amónico, entre otros factores. La mezcla de reacción optimizada comprende 0,1% de Tween, MgCl_2 2,3 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 mM y pH 9,1.

En D05 se anticipa una polimerasa de $\phi 29$ con mutaciones en el dominio de la exonucleasa, quedando la actividad exonucleasa disminuida a menos del 0,1% con respecto a la enzima silvestre. La mezcla de reacción para las pruebas realizadas, comprende Tris-HCl pH 7,5, MgCl_2 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, cebadores y concentraciones equimolares de dTTP, dGTP, dCTP y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP. Los reactivos se incubaron a 30 °C durante 60 minutos.

D06 estudia cuatro mutantes de la ADN polimerasa de $\phi 29$ sensibles a temperatura. La secuencia Q38545 presenta un 100% de identidad con la SEQ. ID. NO. 1 de la solicitud.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente solicitud, es un método de replicación, amplificación o secuenciación de ADN, que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprenda: la ADN polimerasa de $\phi 29$, monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tween 20) del 0,01 al 0,03% del volumen total de la reacción; una sal de amonio (sulfato de amonio 40-50 mM, o cloruro amónico o acetato amónico 80-100 mM); un tampón (Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES) a pH 7-8,5; cloruro magnésico 5-15 mM; un cebador arbitrario protegido frente a las exonucleasas; dCTP, dGTP, dTTP y dATP en cantidades equimolares. Adicionalmente, esta mezcla puede incluir cloruro potásico o acetato potásico 40-60 mM, y estar marcado al menos a un cebador o un nucleósido trifosfato (reivindicaciones de la 1 a la 31 y 34). La reacción es a temperatura constante entre 25-40°C, produciéndose amplificaciones mediante círculo rodante (RCA), por desplazamiento múltiple (MDA), por desplazamiento de cadena (SDA) o mediante lazo (LAMP) (reivindicaciones 32 y 33). También se incluye un kit que comprende: una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$, monolaurato de sorbitán polioxietileno, una sal de amonio, un tampón, cloruro magnésico, una sal de potasio, un cebador arbitrario protegido contra las exonucleasas, y nucleósidos trifosfato, estando al menos marcado un nucleósido trifosfato o un cebador (reivindicaciones de la 35 a la 40).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 3, 7, 8, 14, 21, DE LA 23 A LA 28 Y DE LA 31 A LA 33

El objeto de la presente solicitud, de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 3, 7, 8, 14, 21, de la 23 a la 28 y 31, es un método de replicación, amplificación o secuenciación de ADN genómico, que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprenda: la polimerasa de $\phi 29$; monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20); sulfato de amonio; un tampón (Tris-Clorídrico, Tris-Acético o HEPES); cloruro magnésico entre 5 y 15 mM; un cebador; dCTP, dGTP, dTTP y dATP en cantidades equimolares; y cloruro potásico o acetato potásico entre 40 y 60 mM. La amplificación se realiza a temperatura constante entre 25 y 40 °C mediante MDA (reivindicaciones 32 y 33).

En D01 se optimiza un procedimiento para amplificar mezclas de moléculas de ADN genómico de pequeño tamaño. Para ello, se realiza una amplificación mediante MDA con la polimerasa de $\phi 29$ utilizando una mezcla de reacción que comprende: Tris-HCl; $MgCl_2$ 10 mM; $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM; ClK 50 mM; Tween 0,2%; dCTP, dGTP, dTTP y dATP en cantidades equimolares; y un cebador arbitrario. La reacción se produjo a 30°C durante 6 horas.

Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones de la 1 a la 3, 7, 8, 14, 21, de la 23 a la 28, y de la 31 a la 33, está anticipado de manera inequívoca en D01.

En consecuencia, las reivindicaciones de la 1 a la 3, 7, 8, 14, 21, de la 23 a la 28, y de la 31 a la 33, no cumplen el requisito de novedad.

1.2. REIVINDICACIONES DE LA 4 A LA 6, DE LA 9 A LA 13, DE LA 15 A LA 20, 22, 29, 30, Y DE LA 34 A LA 40

Las reivindicaciones de la 4 a la 6, de la 9 a la 13, de la 15 a la 20, 22, 29, 30, y de la 34 a la 40, son nuevas.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 3, 7, 8, 14, 21, DE LA 23 A LA 28, Y DE LA 31 A LA 33

En vista de los motivos expuestos en el apartado 1.1., las reivindicaciones de la 1 a la 3, 7, 8, 14, 21, de la 23 a la 28, y de la 31 a la 33, no presentan actividad inventiva.

2.2. REIVINDICACIONES DE LA 4 A LA 6

Esta solicitud tiene por objeto, según las reivindicaciones de la 4 a la 6, un método de replicación, amplificación o secuenciación de ADN, que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprenda: una polimerasa del tipo $\phi 29$, monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20) entre 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción, una sal de amonio, un tampón, cloruro magnésico, un cebador y nucleósidos trifosfato.

D01 se considera el documento más cercano, y anticipa la amplificación de ADN mediante MDA con la polimerasa $\phi 29$, en una mezcla de reacción que comprende: Tris-HCl, $MgCl_2$ 10 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM, ClK 50 mM, Tween 0,2%, nucleósidos trifosfato y un cebador.

La diferencia entre D01 y la presente solicitud, es que en la solicitud, la concentración de Tween 20 es del 0,01-0,03%, y en D01 del 0,2%.

El efecto técnico, es una optimización de las condiciones de amplificación, replicación o secuenciación de la polimerasa.

Por lo tanto, el problema a resolver es la mejora del procedimiento de replicación, amplificación o secuenciación de una muestra de ADN.

D02 anticipa un procedimiento de amplificación con las polimerasas *Pfu* o *Taq*. En ambos casos, las condiciones de la mezcla de reacción fueron Tris-HCl, $(NH_4)_2SO_4$ 20 mM, Tween 0,01% y $MgCl_2$ 3 mM.

Dado que la concentración de Tween del 0,01%, es eficaz en varios tipos de polimerasas, entre ellas la *Pfu*, perteneciente a la misma familia que las polimerasas de tipo $\phi 29$ (D02), un experto en la materia, intentaría optimizar el procedimiento de amplificación de ADN que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprenda: la polimerasa $\phi 29$, una sal de amonio, un tampón, cloruro magnésico, un cebador y nucleósidos trifosfato (D01), mediante la modificación de la concentración de Tween 20 al 0,01% (D02), con una expectativa razonable de éxito.

Por lo tanto, las reivindicaciones de la 4 a la 6 no cumplen el requisito de actividad inventiva.

2.3. REIVINDICACIONES 9, 10, 12 Y 13

Las reivindicaciones 9, 10, 12 y 13 tienen actividad inventiva.

2.4. REIVINDICACIONES 11, DE LA 15 A LA 20, 22, 29, 30 Y 34

El objeto de la presente solicitud, es un método de replicación, amplificación o secuenciación de ADN, que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprenda: una polimerasa del tipo $\phi 29$, monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20), una sal de amonio, un tampón, cloruro magnésico, un cebador y nucleósidos trifosfato, en la que: la sal de amonio es cloruro de amonio o acetato de amonio (reivindicación 11); la polimerasa presenta la secuencia SEQ. ID. NO. 1 (reivindicaciones de la 15 a la 17); la polimerasa no tiene actividad exonucleasa detectable (reivindicaciones de la 18 a la 20); el pH se encuentra entre 7 y 8,5 (reivindicación 22); el cebador es arbitrario y está protegido frente a las exonucleasas (reivindicación 29); el ADN molde es plasmídico (reivindicación 30) y al menos se encuentra marcado un nucleósido trifosfato o un cebador (reivindicación 34).

D01 divulga un procedimiento de amplificación de ADN por MDA con la polimerasa de $\phi 29$ en una mezcla de reacción que comprende Tris-HCl, $MgCl_2$ 10 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM, ClK 50 mM, Tween 0,2%, dCTP, dGTP, dTTP y dATP en concentraciones equimolares, y un cebador arbitrario. En este documento se afirma que la polimerasa $\phi 29$ se ha utilizado en la amplificación de ADN plasmídico (reivindicación 30).

Se considera que la elección de cloruro de amonio o acetato de amonio (reivindicación 11) en vez de sulfato de amonio como en D01, es una de las alternativas conocidas por el experto en la materia a la hora de aportar sales amonio a la mezcla de reacción. Así mismo, aunque en D01 no se especifique el pH de la reacción, el intervalo de pH entre 7 y 8,5, (reivindicación 22) es muy frecuente a la hora de realizar este tipo de reacciones, al igual que la protección del cebador frente a las exonucleasas (reivindicación 29) o el marcaje de los cebadores o de los nucleósidos trifosfato (reivindicación 34).

Por otro lado, dado que la secuencia de $\phi 29$ (reivindicaciones de la 15 a la 17), así como polimerasas modificadas que carezcan de la actividad exonucleasa (reivindicaciones de la 18 a la 20) están disponibles para el experto en la materia, su elección se considera una alternativa más a la hora de realizar el procedimiento reivindicado.

En consecuencia, las reivindicaciones 11, de la 15 a la 20, 22, 29, 30 y 34, no presentan actividad inventiva.

2.5. REIVINDICACIONES DE LA 35 A LA 40

Las reivindicaciones de la 35 a la 40 tienen por objeto, un kit que comprende: una ADN polimerasa de tipo $\phi 29$, Tween 20, una sal de amonio, un tampón, cloruro magnésico, una sal de potasio, un cebador arbitrario protegido frente a las exonucleasas, y nucleósidos trifosfato, estando marcado al menos un nucleósido o un cebador.

Dados los argumentos desarrollados en los puntos 2.1 y 2.4., las reivindicaciones de la 35 a la 40 no cumplen el requisito de actividad inventiva.