

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 295**

21 Número de solicitud: 201130288

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **03.03.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.09.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
Avda. María Luisa s/n; Palacio-Pabellón de Perú
41013 Sevilla, ES**

72 Inventor/es:
**SALAS FALGUERAS, MARGARITA;
MENCIA CABALLERO, MARIO;
DE VEGA JOSÉ, MIGUEL;
LAZARO BOLOS, JOSE M^a y
GELLA MONTERO, PABLO**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN BASADO EN LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN DEL
BACTERIOFAGO ϕ 29 Y SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS ASOCIADAS.**

57 Resumen:

Método de amplificación de ADN basado en los
orígenes de replicación del bacteriófago ϕ 29 y
secuencias nucleotídicas asociadas.

La presente invención se refiere a un método de
amplificación de ADN basado en los orígenes de
replicación del bacteriófago ϕ 29, así como a las
construcciones génicas, vectores y oligonucleótidos
que pueden emplearse en dicho método para
amplificar una secuencia exógena de interés.

ES 2 387 295 A1

DESCRIPCIÓN

Método de amplificación de ADN basado en los orígenes de replicación del bacteriófago $\phi 29$ y secuencias nucleotídicas asociadas.

5 La presente invención pertenece al campo de la Biología Molecular y se refiere a un método de amplificación de ADN basado en los orígenes de replicación del bacteriófago $\phi 29$, así como a las construcciones génicas, vectores y oligonucleótidos que pueden emplearse en dicho método para amplificar una secuencia exógena de interés.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Las técnicas de amplificación de ADN son de gran importancia para la biología molecular. Las más utilizadas son la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA). Aunque la PCR tiene la ventaja de ser muy eficaz y generar segmentos definidos de ADN, no es capaz de amplificar secuencias de más de 20 kilobases (Kb) de longitud.

15 A pesar de que los métodos más comunes de comenzar la replicación del ADN son aquellos en los que se usa como cebador una molécula de ADN o de ARN, la síntesis de ADN también puede comenzar utilizando una proteína como cebador. Este tipo de sistemas inician la síntesis de ADN utilizando como receptor del primer enlace fosfodiéster, el grupo OH de un residuo específico de serina, treonina o tirosina presente en una proteína determinada, en lugar del grupo 3' OH de una ribosa. Esta proteína se denomina generalmente proteína terminal (TP), ya que queda unida covalentemente al extremo 5' del ADN. Se han hecho estudios sobre toda una serie de sistemas relativos a la replicación de ADN mediante iniciación con TP, tales como algunos bacteriófagos ($\phi 29$, Nf, GA-1, PRD1 o Cp-1), plásmidos lineales provenientes de bacterias (pSCL y pSLA2), ADN mitocondrial, ADN de levaduras y ADN de plantas, cromosomas bacterianos (*Streptomyces* sp.) y ADN de virus de mamíferos (Adenovirus) (Salas, M. 1991. Annu. Rev. Biochem. 60, 39-71).

20 También se han descrito métodos *in vivo* para generar cadenas lineales de ADN con TP unida a los extremos 5' para plásmidos de *Streptomyces* (Shiffman, D. y Cohen, S. N. 1992. Proc Natl Acad Sci USA 89, 6129- 33) y para Adenovirus (Crouzet, J et al, 1997 Proc Natl Acad Sci USA 94, 1414- 9). Estos métodos parten de la observación de que un ADN que contiene las secuencias adecuadas pero que carece de TP unida puede, tras la transformación y selección en el huésped apropiado, adquirir dentro de la célula las TP necesarias para replicarse y mantenerse de modo estable. La obtención de un TP-ADN conlleva realizar los pasos de clonación adecuados para que en el plásmido se den las señales requeridas para llevar a cabo la replicación basada en la TP. Seguidamente, la construcción de ADN ha de someterse a un proceso de clonación y selección en un huésped adecuado y, finalmente, el ADN ha de extraerse del mismo y purificarse para el propósito deseado. Todos estos pasos pueden limitar el tamaño y restringir el tipo de secuencias que se pueden clonar, mantener y obtener de modo estable. Hasta la fecha ninguno de estos sistemas se ha utilizado para producir cantidades sustanciales de TP-ADN para diversos usos en biología molecular.

25 Respecto a la aproximación *in vitro*, el sistema más eficaz es el basado en la replicación del ADN de $\phi 29$. Gutiérrez et al, (Nucleic Acids Research 1988. 16 (13); 5895-5914) describen el análisis de los orígenes mínimos de iniciación y replicación *in vitro* en los extremos izquierdo y derecho del ADN del bacteriófago $\phi 29$, y que dichos orígenes mínimos comprenden los 12 nucleótidos terminales. Dentro de estos 12 nucleótidos, los 3 nucleótidos terminales no pueden ser mutados sin disminuir la eficiencia de iniciación y replicación, mientras que la secuencia en posiciones menos terminales no es tan necesario que sea exacta. También se describen la iniciación y la replicación de ADN *in vitro* basada en los orígenes de replicación de $\phi 29$ en presencia de la ADN polimerasa de $\phi 29$ y de la TP de $\phi 29$, pero no se refiere a la amplificación de ADN.

35 WO9010064 describe un método para amplificar una secuencia de ADN de hasta varios cientos de Kb flanqueada por los orígenes de replicación de $\phi 29$, específicamente los 12 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN de $\phi 29$ a un lado y los 12 nucleótidos del extremo derecho del ADN de $\phi 29$ al otro, en presencia de la ADN polimerasa de $\phi 29$ y de la TP de $\phi 29$. WO9010064 describe oligonucleótidos que comprenden los 12 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN de $\phi 29$. Sin embargo, el método descrito en WO9010064 se basa en los resultados de Gutiérrez et al (1988), que no se refieren a la amplificación de ADN, sino a la replicación de ADN. Los resultados expuestos en Blanco et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol 91; 12198-12202), demuestran que la amplificación de ADN descrita en WO9010064 no es posible y que, por tanto, lo descrito en esta patente en cuanto a la amplificación de ADN es erróneo, ya que la amplificación de ADN no puede llevarse a cabo con tan solo los 12 nucleótidos del extremo del ADN de $\phi 29$.

40 Blanco et al (1994), describen que para la amplificación eficiente *in vitro* del ADN de $\phi 29$ es necesaria la presencia, no solo de la ADN polimerasa y la TP de $\phi 29$, sino también de cantidades elevadas de las proteínas p5 y p6 de $\phi 29$.

45 El hecho de que la TP esté unida covalentemente al genoma de $\phi 29$ que se va a amplificar hace que la reacción de amplificación sea mucho más eficiente. No se conoce aún si la unión covalente de la TP a los extremos del ADN de $\phi 29$ es imprescindible para que se produzca la amplificación de dicho ADN, ni si sería posible amplificar mediante el mismo sistema un ADN heterólogo que no lleva TP unida a sus extremos.

El genoma del $\phi 29$ es conocido desde los años 80 (Yoshikawa e Ito, 1982 Gene 17, 323-335; Garvey et al, 1985 Gene 40, 301-309; Vlcek y Paces, 1986 Gene 46, 215-225).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 El inicio de la replicación, partiendo de moldes con extremos de ADN de $\phi 29$ que carecen de proteína terminal (TP), es mucho menos eficaz que el inicio llevado a cabo con el genoma de $\phi 29$ como molde, puesto que el genoma, junto con los extremos adecuados, contiene la TP unida covalentemente al fosfato 5' de los extremos de ambas cadenas de ADN.

10 La presente invención muestra algo que no se había hecho hasta ahora y prueba experimentalmente la amplificación de ADN *in vitro* comparando la del el genoma de $\phi 29$ que lleva TP covalentemente unida en sus extremos (TP-ADN) y otros moldes con regiones terminales del ADN de $\phi 29$, pero sin TP, empleando la maquinaria mínima de amplificación de $\phi 29$.

Los autores de la presente invención han definido que para que un ADN lineal pueda ser objeto de amplificación mediante el sistema de $\phi 29$, ha de tener extremos del ADN de $\phi 29$ totalmente funcionales, dispuestos en la orientación correcta y unidos en un solo fragmento de ADN.

15 Los orígenes mínimos de replicación del ADN de $\phi 29$ descritos en el presente trabajo no necesitan tener la TP unida covalentemente a los extremos 5' para ser funcionales en amplificación y pueden unirse al ADN que se desea amplificar mediante diferentes métodos comunes en biología molecular, como son ligación, recombinación o clonación.

El proceso de replicación y el de amplificación *in vitro* del ADN lleva estudiándose décadas y ha sido necesario llevar a cabo experimentalmente cada reacción para conocer con certeza los requerimientos mínimos para que dichas replicación y amplificación fuesen funcionales.

20 El presente trabajo expone un método para amplificar isotérmicamente y de modo definido fragmentos grandes de ADN mediante su inserción entre dos secuencias de ADN que contienen los orígenes mínimos de replicación del ADN del bacteriófago $\phi 29$. Este método genera productos que poseen TP unida covalentemente a los extremos 5' del ADN amplificado, puesto que la TP se utiliza como "iniciador universal" para todas las amplificaciones realizadas mediante este sistema.

25 La extremadamente alta procesividad intrínseca y la capacidad para acoplar la polimerización al desplazamiento de banda de la ADN polimerasa de $\phi 29$, le permiten llevar a cabo amplificaciones de ADN de gran longitud.

30 Los amplicones de TP-ADN resultantes pueden utilizarse directamente en aplicaciones para las que la presencia de la TP es beneficiosa o necesaria como, por ejemplo, transformación de células, transferencia o terapia génica de ADN *in vivo*, evolución de proteínas *in vitro* mediante ADN-display, transformación bacteriana, secuenciación, genotipado, etc. Como alternativa, la TP se puede eliminar utilizando distintas reacciones conocidas por el experto en la materia. En lo que a la TP paterna se refiere, se ha demostrado que no es absolutamente esencial para la amplificación. La TP paterna es aquella que está unida al extremo del ADN parental, que se va a replicar o amplificar. Para que se inicie la replicación o la amplificación es necesario que se incorpore una nueva TP, que se llama TP iniciadora (Figura 1).

35 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una construcción génica adaptada para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena y que comprende al menos una secuencia nucleotídica que comprende los siguientes tres elementos en el siguiente orden:

a) al menos una secuencia nucleotídica que comprende un origen de replicación del ADN del bacteriófago $\phi 29$, cuyo extremo terminal va seguido por,

b) al menos un punto de corte de la secuencia nucleotídica,

40 c) al menos una secuencia nucleotídica que comprende un origen de replicación del ADN del bacteriófago $\phi 29$ en orientación opuesta a la de la secuencia nucleotídica de (a).

El término "construcción génica", tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula de ADN que ha sido artificialmente ensamblada. La construcción génica está adaptada para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena, que puede ser cualquier secuencia nucleotídica de interés.

45 El ADN del bacteriófago $\phi 29$ es lineal y de doble cadena, y en cada uno de sus extremos tiene un origen de replicación, que se llaman izquierdo y derecho. Un origen de replicación del ADN del bacteriófago $\phi 29$ es la secuencia nucleotídica de uno de los extremos del genoma del bacteriófago $\phi 29$, en la que se inicia la replicación de dicho genoma. El extremo terminal de un origen de replicación es aquel en el que se une la TP.

Un punto de corte es una región en la secuencia nucleotídica que, debido a su secuencia, es susceptible de ser cortada.

50 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, las secuencias nucleotídicas de los tres elementos

están yuxtapuestas o superpuestas. Más preferiblemente, las secuencias nucleotídicas de los tres elementos están yuxtapuestas.

5 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, (b) es al menos una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia diana de corte de una enzima de restricción. Preferiblemente, la enzima de restricción da lugar a extremos romos o a extremos 3' protuberantes. Más preferiblemente, da lugar a extremos romos.

10 Un punto de corte de una secuencia nucleotídica puede tener distintas formas. Además de con enzimas de restricción, una secuencia nucleotídica puede cortarse con enzimas de reparación, o generando un sitio abásico y después tratando la secuencia nucleotídica con una AP (apurínica/apirimidínica) endonucleasa. La secuencia nucleotídica también se podría cortar introduciendo un ribonucleótido y luego eliminándolo por tratamiento con álcali. Otra forma posible de cortar sería introducir en la secuencia nucleotídica dos sitios de corte, uno en cada hebra, para enzimas que producen incisiones de cadena simple.

El sistema de amplificación de ϕ 29 basado en el vector pETORPHIBae (SEQ ID NO: 3) presentado en los ejemplos de esta memoria puede generar eficazmente productos de amplificación a partir de moldes que tienen extensiones de banda simple de 5 nucleótidos en el extremo 3'.

15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la construcción génica es un vector circular. Preferiblemente, el tamaño de la construcción génica es de entre 4.800 y 10.000 pares de bases (bp).

20 Un vector es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético de interés a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente una vez son introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano o los vectores episomales de mamíferos. Otros vectores pueden integrarse en el genoma de la célula huésped y replicarse así junto con el genoma celular.

25 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 de las secuencias nucleotídicas de (a) y (c) son del mismo extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, el extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el izquierdo. Preferiblemente, el extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el derecho.

30 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 de la secuencia nucleotídica de (a) y el origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 de la secuencia nucleotídica de (c) son de extremos distintos del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, un origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el izquierdo y el otro origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el derecho.

35 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica que comprende el origen izquierdo de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 comprende entre 65 y 200 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, comprende entre 65 y 72 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.

40 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica que comprende el origen derecho de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 comprende entre 125 y 250 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, comprende entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la construcción génica además comprende al menos un sitio de clonación múltiple (MCS).

El término sitio de clonación múltiple (MCS) se refiere a una pequeña secuencia nucleotídica que contiene las secuencias diana de numerosas enzimas de restricción.

45 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la construcción génica además comprende al menos un marcador. Preferiblemente, el marcador es un gen de resistencia a un antibiótico. Preferiblemente, el antibiótico es ampicilina o kanamicina.

50 El término "marcador", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para un péptido marcador o una proteína marcadora, que permiten comprobar que el vector ha sido correctamente transfectado o transducido y que sus secuencias se expresan correctamente. El marcador puede ser una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína fluorescente o un gen de resistencia a un antibiótico, que se emplean para seleccionar las células que llevan el vector.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el punto de corte es la secuencia nucleotídica diana de corte de la enzima de restricción Dra I o Bae I.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la construcción génica comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o una variante biológicamente equivalente.

5 Una variante biológicamente equivalente de una secuencia nucleotídica es aquella secuencia nucleotídica que tiene la misma actividad biológica, es decir, que comprende los mismos elementos o comprende elementos equivalentes que presentan la misma función.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la construcción génica del primer aspecto de la invención para la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena.

10 Es importante distinguir el proceso de replicación de una secuencia nucleotídica, del proceso de amplificación de una secuencia nucleotídica. Mientras que la replicación es un proceso lineal, la amplificación es un proceso exponencial, de forma que la cantidad de moléculas de ADN que se obtiene con una reacción de amplificación es muy superior a la que se obtiene con una reacción de replicación.

15 Los autores de la presente invención han demostrado que es posible conseguir una amplificación *in vitro* eficiente mediante la maquinaria de replicación del ADN de ϕ 29, utilizando como molde un ADN lineal, con orígenes mínimos de replicación del ADN de ϕ 29 pero sin TP unida covalentemente a sus extremos. El ADN insertado entre los orígenes del ADN de ϕ 29 puede ser heterólogo. Los requisitos mínimos del sistema *in vitro*, en lo que se refiere a proteína y secuencias de ADN, que se corresponden con el origen mínimo de 68 bp del extremo izquierdo de ϕ 29, se muestran en la Fig. 11. Como se describe en Gutiérrez et al, (Nucleic Acids Research 1988. Vol 16 (13); 5895-5914) los últimos 12 bp de los extremos del ADN ϕ 29 son necesarios para iniciar la replicación y para la elongación. Esta secuencia de ADN de 20 12 bp es activa como origen de replicación en presencia de TP y de ADN polimerasa sin ninguna otra proteína presente, de modo que el reconocimiento del origen ha de llevarse a cabo, si no por completo, sí en su mayor parte, mediante el heterodímero TP-ADN polimerasa. Aunque este complejo es capaz de iniciar la replicación con baja eficiencia, dicha replicación se ve en gran medida estimulada por la presencia de p6. En el origen mínimo de 68 bp de ϕ 29 existe un sitio de unión de p6 de gran afinidad, entre los nucleótidos 35 y 68 respecto al extremo. Este sitio de nucleación es necesario y suficiente para obtener estimulación de amplificación mediada por esta proteína. Otra proteína esencial para la 25 amplificación del ADN es la p5, que tiene afinidad por ADN de cadena simple sin especificidad de secuencia.

30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica que consiste en entre 65 y 130 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, consiste en entre 67 y 72 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, el extremo 5' del oligonucleótido del tercer aspecto de la invención está fosforilado.

35 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el oligonucleótido comprende la secuencia nucleotídica diana de una enzima de restricción o la secuencia nucleotídica resultante del corte con una enzima de restricción, en posición 3' respecto de la secuencia nucleotídica que consiste en entre 65 y 130 nucleótidos o en entre 67 y 72 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del oligonucleótido del tercer aspecto de la invención para la construcción de una secuencia nucleotídica recombinante lineal donde una secuencia nucleotídica exógena que se quiere amplificar está flanqueada por secuencias nucleotídicas que comprenden la secuencia nucleotídica que consiste en entre 65 y 130 nucleótidos o 67 y 72 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.

40 Los autores de la presente invención han observado que el grupo fosfato situado en los extremos 5' de los orígenes de replicación es también imprescindible para que ocurra la amplificación del ADN, especialmente para el proceso de elongación. La adición de una pequeña molécula, como un grupo propilo, al fosfato 5' impide la utilización del origen para la amplificación.

45 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método de amplificación de ADN que comprende al menos las siguientes etapas:

a) obtener una molécula de ADN lineal que comprende la secuencia de ADN a amplificar flanqueada en ambos extremos por:

i) la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29, quedando el extremo terminal de dicho origen en el extremo del ADN lineal, o por

50 ii) la secuencia del origen de replicación derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29, quedando el extremo terminal de dicho origen en el extremo del ADN lineal, o por

iii) la secuencia del origen de replicación derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29 por un lado y la del izquierdo por otro,

quedando el extremo terminal de dichos orígenes en los dos extremos del ADN lineal;

b) amplificar la secuencia de ADN lineal obtenida en la etapa (a).

5 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, en la amplificación de la etapa (b) se emplean una ADN polimerasa, una proteína terminal (TP), una proteína de unión a ADN de cadena simple (SSB) y una proteína de unión a ADN de cadena doble (DBP). Preferiblemente, se emplean las proteínas ADN polimerasa, TP, p5 y p6 del bacteriófago ϕ 29 o cualquier variante bioequivalente de dichas proteínas.

10 Una variante bioequivalente de una proteína o una variante biológicamente equivalente de una proteína es aquella proteína que tiene la misma actividad biológica, es decir, que presenta la misma función, que en el presente caso puede ser la actividad ADN polimerasa, la actividad cebadora en el caso de de la TP, la unión a ADN de cadena doble en el caso de p6 o la unión a ADN de cadena sencilla en el caso de p5.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la secuencia de ADN a amplificar tiene un tamaño de entre 500 bp y 100.000 bp.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la secuencia de ADN lineal obtenida en la etapa (a) tiene fosforilados los dos extremos 5'.

15 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN ϕ 29 comprende entre 65 y 200 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, comprende entre 67 y 72 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.

20 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la secuencia del origen de replicación derecho del ADN ϕ 29 comprende entre 125 y 250 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29. Preferiblemente, comprende entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29 comprende entre 65 y 200 nucleótidos o entre 67 y 72 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29 y la secuencia del origen de replicación derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29 comprende entre 125 y 250 nucleótidos o entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.

25 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la etapa (b) se realiza a una temperatura inferior a 30° C, preferiblemente inferior a 27° C, y más preferiblemente entre 20° C y 25° C.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, en la etapa (a) se emplea la construcción génica del primer aspecto de la invención. En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, en la etapa (a) se emplea el oligonucleótido del tercer aspecto de la invención.

30 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena que comprende al menos una construcción génica según el primer aspecto de la invención, al menos un oligonucleótido según el tercer aspecto de la invención o ambos.

En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, la construcción génica comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

35 En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, el kit además comprende una ADN polimerasa, una TP, una proteína de unión a ADN de cadena simple (SSB) y/o una proteína de unión a ADN de cadena doble (DBP). Preferiblemente, la ADN polimerasa, la TP, la proteína de unión a ADN de cadena simple (SSB) y/o la proteína de unión a ADN de cadena doble (DBP) son la ADN polimerasa, TP, p5 y/o p6 del bacteriófago ϕ 29 o una variante bioequivalente de dichas proteínas.

40 En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, el kit además comprende al menos uno de los elementos de la siguiente lista: desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , ditiotreitól (DTT), glicerol, albúmina de suero bovino (BSA) y tampón Tris-HCl con pH entre 6,5 y 8.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit del sexto aspecto de la invención para la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena.

45 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. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de replicación del ADN de $\phi 29$ cebado por proteína terminal (TP). La TP iniciadora y la paterna se muestran en negro y gris, respectivamente. Las diferentes fases de la replicación se indican a la derecha de la figura.

5 **Figura 2.** Construcción génica que presenta los orígenes de replicación del ADN de $\phi 29$. A. El plásmido pETORPHI se construyó clonando entre los sitios Sac I y Hind III de pET28b un fragmento de ADN sintetizado por Genescript que contiene fragmentos fusionados de 194 pares de bases (bp) y 191 bp provenientes de los extremos izquierdo y derecho, respectivamente, del genoma de $\phi 29$. B. Los extremos se invirtieron con una orientación “extremo a extremo” de forma que se genera un sitio Dra I en el punto de unión, como se muestra en la figura. “Ori L” y “Ori R” indican los orígenes del ADN de $\phi 29$ izquierdo y derecho, respectivamente. C. Muestra el fragmento de ADN que produce la linearización del plásmido con Dra I, que tiene los extremos del ADN de $\phi 29$ orientados correctamente. MCS1 y MCS 2 denotan los sitios múltiples de clonación 1 y 2.

10 **Figura 3.** La amplificación de pETORPHI es más eficaz a 22° C. Se muestran las bandas de ADN en un gel de agarosa, obtenidas en los ensayos de amplificación. Se indican las cantidades en nanogramos (ng) de plásmido pETORPHI o de moldes de TP-ADN de $\phi 29$ que se emplearon en los ensayos de amplificación. Se indican tanto las temperaturas de incubación, como la ausencia o presencia de p6. Las reacciones incubadas a 30° C contenían p6 en todos los casos. Se utilizaron 37,5 ng de TP y 25 ng de ADN polimerasa. Se indica el tamaño de las bandas amplificadas: 19 kilobases (Kb) para $\phi 29$ TP-ADN y 5,8 Kb para pETORPHI cortado con Dra I. Los factores de amplificación calculados a 22° C fueron de 80 veces para TP-ADN y de 24 veces para pETORPHI.

15 **Figura 4.** La amplificación requiere dos extremos del ADN de $\phi 29$ en la misma molécula. El plásmido pETORPHI se cortó con las enzimas que se indican en la figura. A. Muestra los fragmentos resultantes de la digestión de pETORPHI con las enzimas Dra I y Mlu I o Pvu I. B. Muestra las bandas de ADN en un gel de agarosa, resultantes de la reacción de amplificación utilizando $\phi 29$ TP-ADN o los diferentes fragmentos del plásmido como molde. Se muestran las cantidades empleadas en ng de TP-ADN de $\phi 29$ o de fragmentos de plásmido pETORPHI. Las bandas que corresponden al plásmido cortado con Mlu I o Pvu I, además de Dra I son de 4,6 y 4,4 Kb, respectivamente. Los factores de amplificación fueron de 109 veces para TP-ADN y de 40 veces para pETORPHI.

20 **Figura 5.** La cinética de amplificación de pETORPHI es similar a la del genoma de $\phi 29$. A. Muestra los productos de las reacciones de amplificación en un gel de agarosa. Estas reacciones contenían 25 ng de $\phi 29$ TP-ADN o pETORPHI cortado con Dra I, se incubaron a 22° C durante los tiempos que se especifican y se detuvieron añadiendo SDS al 0,1% y EDTA 10 mM. Las cantidades de TP y de ADN polimerasa fueron 37,5 ng y 25 ng, respectivamente. B. Las bandas de los gels del experimento descrito en A se cuantificaron por “fosforimager” y los valores obtenidos se representaron en función del tiempo. Los valores absolutos están representados en el apartado B. C. Representación de los valores cuantificados en B normalizados respecto al valor a 1 hora (h). El factor de amplificación para TP-ADN fue de 32 veces y para pETORPHI, de 14 veces.

25 **Figura 6.** Muestra que la cantidad mínima de molde necesaria para la amplificación es de 5 ng. Las reacciones de amplificación se establecieron con las cantidades indicadas en ng de TP-ADN de $\phi 29$ o de plásmido pETORPHI cortado con Dra I, y se incubaron durante 2 h a 22° C. El factor de amplificación para 5 ng fue de 309 veces para TP-ADN y de 141 veces para pETORPHI.

30 **Figura 7.** Muestra que un fragmento de 68 bp, proveniente del extremo izquierdo del ADN de $\phi 29$ es un origen de amplificación eficiente. A. El plásmido pETORPHI68L se construyó cortando pETORPHI con Dra I y EcoR I para eliminar el fragmento de 191 bp, correspondiente al extremo derecho del genoma de $\phi 29$, y se sustituyó por un fragmento de ADN de 68 bp, proveniente del extremo izquierdo del genoma $\phi 29$ (cuadro de la izquierda). B. Para la reacción de amplificación, pETORPHI68L se cortó con Dra I y la reacción se incubó a 22° C con 25 ng del molde correspondiente. Los números 1 y 2 de los carriles con pETORPHI68L, se corresponden con dos clones diferentes de este plásmido. El control negativo en ausencia de molde se indica como -. Como controles positivos se emplearon TP-ADN y pETORPHI.

35 **Figura 8.** La ligación de un fragmento de ADN de 68 bp proveniente del extremo izquierdo del genoma de $\phi 29$, a los dos extremos de un fragmento heterólogo de ADN, permite la amplificación de dicho ADN heterólogo. A. Se ensamblaron fragmentos de ADN correspondientes al origen de 68 bp del extremo izquierdo del genoma de $\phi 29$, partiendo de oligonucleótidos de cadena simple que generaban extremos cohesivos para las enzimas BsmB I (indicado como 68L) y EcoO109 I (indicado como 68L'). El plásmido pEYFP-N1Bsm se cortó con BsmB I y EcoO109 I y los fragmentos de este plásmido se incluyeron en una reacción de ligación con los oligonucleótidos 68L y 68L' descritos. B. La amplificación requiere la presencia de los extremos del genoma de $\phi 29$ en ambos extremos del ADN heterólogo, puesto que solamente se observa amplificación cuando el molde es el producto de la ligación del ADN heterólogo con los oligonucleótidos 68L y 68L'. Las ligaciones se llevaron a cabo bien con los oligonucleótidos 68L y 68L' y el fragmento 1 del plásmido pEYFP-N1Bsm (carriles 1 y 2 indicados como 68L-ADN-68L'), o bien con sólo uno de los oligonucleótidos más el fragmento 1 (carriles 1 y 2 indicados como 68L-ADN), y también en ausencia del fragmento 1 y con los dos tipos de oligonucleótidos, como control (carriles 1 y 2 indicados como 68L y 68L'). En las reacciones de

amplificación se utilizaron como molde alícuotas de las ligaciones de modo que cada reacción contuviera el mismo número de moles para el fragmento perteneciente al plásmido de 4 Kb y para pETORPHI.

5 **Figura 9.** El grupo fosfato en posición 5' es necesario para la amplificación. A. Muestra las bandas de ADN obtenidas en las reacciones de amplificación de partes alícuotas de pETORPHI tratadas con fosfatasa Antártica (+Pasa), con adenosín trifosfato (ATP) y polinucleótido kinasa de T4, después de la fosfatasa (+Pasa +PNK), o sometidas al mismo procesamiento que las muestras tratadas pero sin añadir enzimas (pETORPHI*). En todos los casos la cantidad de pETORPHI presente en las reacciones fue de 25 ng. Como control negativo se empleó una reacción en ausencia de ADN molde. B. Se realizaron las mismas ligaciones descritas en la figura 8B. Además, los oligonucleótidos se diseñaron para no presentar modificación alguna en sus extremos 5' (-), estar fosforilados en 5' (P), o tener un grupo propilo unido al fosfato en 5' (Prop), o los oligonucleótidos sin modificar se trataron con ATP y polinucleótido kinasa de T4 tras la ligación (+PNK). Los carriles 1 indican que únicamente se empleó el oligonucleótido 68L en la ligación y los carriles 2 indican que se emplearon los dos oligonucleótidos (68L y 68L'). C. Esquema de las estructuras químicas, situadas en el extremo 5' de los oligonucleótidos sin modificar (-), modificados con un grupo fosfato (P), modificados con un grupo propilo unido al fosfato (Prop), así como unidos a la serina de la TP, a través del grupo fosfato.

10 **Figura 10.** Muestra que un derivado de pETORPHI llamado pETORPHIBae, linearizado con Bae I es eficaz como molde para la amplificación. A. Esquema del sitio de reconocimiento de Bae I (subrayado) y de los sitios de corte (flechas) y posición de los orígenes de $\phi 29$ (en mayúsculas) en pETORPHIBae. B. Muestra las bandas de ADN resultantes de las reacciones de amplificación empleando TP-ADN y pETORPHI como controles positivos, ausencia de ADN como control negativo (-) y el plásmido pETORPHIBae linearizado con Bae I tal cual y con distintos tratamientos indicados como "Pretrat" y "Klenow". "Pretrat" indica que pETORPHIBae linearizado con Bae I se pretrató durante 5 minutos (min) con la ADN polimerasa de $\phi 29$, tras lo cual se añadió el resto de los componentes de la reacción excepto la TP, que se añadió 5 min después. "Klenow" indica que pETORPHIBae linearizado con Bae I se trató durante 10 min con la enzima Klenow en presencia de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), se inactivó dicha enzima y se añadió el resto de los componentes a la reacción. Se emplearon alícuotas de 25 ng de pETORPHIBae linearizado con Bae I en las tres reacciones de amplificación.

15 **Figura 11.** Muestra los requisitos de los orígenes del ADN de $\phi 29$ para la amplificación *in vitro*. Se muestra el origen del extremo izquierdo de 68 bp del ADN de $\phi 29$. Las 12 bp, situadas en el mismo extremo (rectángulo) son necesarias para que se produzcan las reacciones de iniciación y elongación llevadas a cabo por la ADN polimerasa de $\phi 29$, que forma un heterodímero constituido por ADN polimerasa (representada con forma de óvalo) unida a TP en función de iniciador (Inic. representada con forma de rectángulo). El grupo fosfato, situado en el extremo 5' (P) ha resultado ser esencial para realizar la amplificación *in vitro*. La proteína p6 (hexágono) y las secuencias de alta afinidad (rectángulo situado entre las posiciones 35 bp y 68 bp) son necesarias para estimular la iniciación por parte de esta proteína. Para realizar la amplificación, se necesita la SSB (rombo) para unirse a la cadena de ADN desplazada, representada con trazo discontinuo.

35 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia del método de amplificación de la invención, así como de las secuencias nucleotídicas empleadas para llevar a cabo dicho método.

EJEMPLO 1: Diseño de un plásmido que genera los extremos funcionales del ADN de $\phi 29$ al ser linearizado.

40 Diseñamos el plásmido descrito en la figura 2A, denominado pETORPHI (SEQ ID NO: 1). El plásmido pETORPHI se construyó clonando entre los sitios Sac I y Hind III de pET28b (SEQ ID NO: 11) un fragmento de ADN sintetizado por Genescript que contiene fragmentos fusionados de 194 pares de bases (bp) y 191 bp provenientes de los extremos izquierdo y derecho, respectivamente, del genoma de $\phi 29$. Los extremos se invirtieron con una orientación "extremo a extremo" de forma que se genera un sitio de restricción único de Dra I en el punto de unión, como se muestra en la figura 2B. El plásmido pETORPHI posee un "backbone" que no contiene ningún sitio de restricción de Dra I, un sitio de multiclonación (MCS), un origen de replicación (Ori) de tipo pUC, un marcador que consiste en un gen de resistencia a kanamicina y las secuencias de los extremos derecho e izquierdo del ADN del genoma de $\phi 29$ que llegan hasta los pares de bases (bp) 191 y 194 desde el extremo, respectivamente (SEQ ID NO: 12 Y SEQ ID NO. 13, respectivamente). Tras cortar el plásmido con Dra I, los dos extremos del plásmido linearizado son idénticos a los dos extremos del ADN de $\phi 29$ hasta las posiciones ya mencionadas (figura 2C).

EJEMPLO 2: Amplificación utilizando el plásmido linearizado pETORPHI como molde.

Comprobamos la capacidad del plásmido pETORPHI cortado con Dra I (en adelante pETORPHI) para servir de molde en la amplificación iniciada con proteína terminal (TP) mediante las proteínas ADN polimerasa, p5 y p6 de $\phi 29$.

55 Como se aprecia en la figura 3, en el cuadro de la izquierda, al incubar la reacción de amplificación a 30° C durante 2 horas y utilizar el genoma de $\phi 29$ con la TP unida a sus extremos 5', obtenemos un producto amplificado en la posición esperada. Al usar el pETORPHI como molde se obtiene menos cantidad de producto correcto (5,8 Kb), y se produce

más cantidad de material de menor peso molecular. Sorprendentemente, cuando llevamos a cabo la reacción de amplificación a 22° C disminuyó la presencia de estos productos de menor peso molecular. En ausencia de p6 existe cierta cantidad de productos correctos amplificados, aunque la reacción no alcanzó su nivel máximo, ni siquiera partiendo de 100 ng de genoma de ϕ 29 o de plásmido como molde. En presencia de p6 la reacción alcanzó una meseta con 25 ng de genoma de ϕ 29 o con la misma cantidad de pETORPHI, y también la mayoría del ADN amplificado está en la posición adecuada, sin apenas dejar productos de menor peso molecular. Todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo a 22° C. La cuantificación de las bandas de ADN se realizó mediante “fosforimager”. Los factores de amplificación calculados son 80 veces para el genoma del fago y 24 veces para el plásmido pETORPHI.

Para comprobar si se trataba de productos de amplificación o de replicación lineal, se separaron en dos moléculas los orígenes del ADN de ϕ 29 del plásmido pETORPHI, de modo que ambos fragmentos de ADN no pudiesen ser susceptibles de amplificación exponencial puesto que cada molécula de ADN contendría sólo uno de los orígenes de replicación de ϕ 29 y, por tanto, produciría una replicación lineal. Se eligieron dos enzimas, Mlu I y Pvu I, que cortan una vez cada una en pETORPHI, generando conjuntos de fragmentos de unos 4,7 y 1,2 Kb, y 1,4 y 4,5 Kb, respectivamente, al utilizarse estas enzimas junto con Dra I, como se puede ver en la figura 4A. Se trataron partes alícuotas del plásmido pETORPHI linearizado con Dra I, bien con Mlu I o con Pvu I, o con el tampón de restricción como control, y se utilizaron como moldes en la reacción de amplificación. La figura 4B muestra que en cualquiera de los casos en los que separamos los dos extremos del plásmido pETORPHI, la cantidad de ADN amplificado disminuye drásticamente, unas 30 veces, si se compara con la señal obtenida utilizando pETORPHI. Incluso cuando los fragmentos se cortan con las dos enzimas independientemente y se mezclan en la reacción de amplificación para comprobar si éstos se hibridan o complementan (figura 4A, carril Dra Mlu +Pvu), el resultado es casi idéntico al obtenido con fragmentos cortados sólo con una enzima. El plásmido pETORPHI sin cortar no produce señal. Asimismo, se comprobó que los diferentes moldes tuvieran orígenes activos en lo que al inicio de replicación se refiere para asegurar que los defectos de la amplificación se deben solamente a que los dos orígenes se separan en dos moléculas.

Los resultados indican que el plásmido pETORPHI está dando lugar a una verdadera amplificación, utilizando los orígenes situados en ambos extremos de la molécula.

EJEMPLO 3: Cinética de la amplificación.

Se llevaron a cabo experimentos de amplificación detectando los productos en el transcurso del tiempo y se compararon los resultados obtenidos empleando el genoma de ϕ 29 o pETORPHI como molde. La figura 5A muestra que con ambos moldes se obtiene un perfil muy parecido con pequeñas cantidades de productos generados hasta los 30 minutos (min), y luego se alcanza, gradualmente, un máximo a los 60 min con el genoma ϕ 29 o la mitad del máximo con pETORPHI. Llegado ese punto, pETORPHI continúa generando productos durante otros 60 min. La cuantificación mediante “fosforimager” demostró que la cantidad de TP-ADN sintetizado aumenta hasta los 60 min, donde se alcanza el punto de saturación para la amplificación de TP-ADN (Figura 5B). En el caso del vector pETORPHI, la amplificación continúa hasta alcanzar la saturación a los 120 min. Los valores obtenidos hasta los 60 min normalizados asignando el valor a 60 min como unidad, son prácticamente superponibles para el genoma de ϕ 29 y pETORPHI (Figura 5C). Esto indica que hasta los 60 min la reacción de amplificación procede de un modo muy similar para el TP-ADN de ϕ 29 y pETORPHI, con la diferencia de que con el TP-ADN a los 60 min ya se ha alcanzado la saturación mientras que con pETORPHI todavía se sigue generando producto de amplificación durante una hora más. Tiempos más largos de incubación, de hasta 5 horas (h), no supusieron un aumento del producto total generado tanto con TP-ADN de ϕ 29 como con pETORPHI.

EJEMPLO 4: Cantidad mínima de molde necesaria para la amplificación.

Se determinó la cantidad mínima de molde necesaria para realizar la amplificación. La figura 6 muestra que al usar el genoma de ϕ 29 como molde, la cantidad mínima que permite que la amplificación se lleve a cabo son 5 ng, y la cantidad de producto que se obtiene es muy similar utilizando de 10 a 25 ng de molde, lo cual indica que la reacción de amplificación está próxima a saturación en ese intervalo de concentración de molde. Con 1 ng no se obtiene amplificación. Al utilizar pETORPHI como molde los resultados son similares. En este caso, se emplearon 3,3 veces más moléculas de molde que con el genoma de ϕ 29. Es importante resaltar que, al iniciarse la reacción, pETORPHI no tiene la TP paterna, mientras que el genoma de ϕ 29 sí la tiene, y la TP aumenta la afinidad de los extremos respecto a la maquinaria de replicación.

EJEMPLO 5: Origen mínimo de replicación.

La longitud mínima de ADN de ϕ 29 que permite actividad de replicación estimulada mediante p6 corresponde a los últimos 68 bp del extremo izquierdo del genoma de ϕ 29. Esto incluye la repetición invertida de 6 bp (5' AAAGTA 3') y las secuencias de 35 a 68 bp del extremo izquierdo que constituyen sitios de alta afinidad para la unión de p6.

Se sustituyó el segmento de 194 bp, correspondiente al extremo derecho del genoma de ϕ 29 de pETORPHI, por el origen mínimo de replicación de 68 bp del extremo izquierdo, descrito anteriormente, para obtener el denominado pETORPHI68L (SEQ ID NO: 2) (Figura 7A).

El fragmento de 68 bp se clonó con orientación invertida, regenerando el sitio de restricción de Dra I como en pETORPHI, para poder tener los extremos del ADN de ϕ 29 cuando pETORPHI68L es linearizado con Dra I. La figura 7B muestra que la capacidad de pETORPHI68L para servir como molde de amplificación es la misma que la del pETORPHI original.

5 **EJEMPLO 6: Amplificación tras la ligación con oligonucleótidos que incluyen los orígenes mínimos del ADN de ϕ 29.**

10 Tras comprobar que un fragmento de 68 bp del extremo izquierdo del ADN de ϕ 29 es un origen de amplificación eficaz, podemos diseñar oligonucleótidos que, después de someterse a hibridación, generen el fragmento de 68 bp como ADN de cadena doble al cual se puede añadir la secuencia que interese, como por ejemplo, extensiones de ADN de cadena simple para ligarlas a extremos de un ADN exógeno, obtenido tras la digestión con enzimas de restricción. Mediante este proceso, se pueden generar oligonucleótidos de ADN de ϕ 29 con los que se une el origen mínimo de replicación de ϕ 29 a cualquier ADN lineal que se elija para ser amplificado.

15 Por mutagénesis dirigida, se introdujo la secuencia de la diana de la enzima de restricción BsmB I, en el plásmido pEYFP-N1 (SEQ ID NO: 14) (Clontech) en la posición 4.702 para generar el plásmido pEYFP-N1Bsm (SEQ ID NO: 15). Posteriormente, se cortó el plásmido pEYFP-N1Bsm con las enzimas BsmB I y EcoO109 I, que reconocen secuencias únicas en ese vector. Asimismo, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos sintéticos (SEQ ID NO: 7 Y SEQ ID NO: 8), de modo que después de que se produjera la hibridación, cada par formaría el ADN de cadena doble de 68 bp del origen mínimo de ϕ 29 además de extensiones cortas de cadena simple que permiten la ligación a uno u otro de los extremos que se obtienen al cortar el plásmido pEYFP-N1Bsm con las enzimas BsmBI o EcoO109I, respectivamente (Figura 8A). Se eligieron estas enzimas porque generan extremos asimétricos y, con ello, se evita la autoligación de oligonucleótidos que contienen el mismo extremo cohesivo y también la ligación cruzada entre sitios BsmB I y EcoO109 I. De este modo, tras la hibridación, cada par de oligonucleótidos puede ligarse al extremo de restricción complementario del plásmido, pero no con el otro extremo, o con el otro par de oligonucleótidos, o autoligarse. Por otro lado, este planteamiento basado en la restricción hace innecesario purificar por gel los fragmentos de ADN o los productos de ligación. Una vez producida la reacción de ligación, la ligasa se inactivó y la muestra se trató con adenosín trifosfato (ATP) y polinucleótido kinasa de T4.

20 La utilización de los ADNs resultantes de las reacciones de ligación como moldes sólo permite la amplificación real de uno de los productos de la ligación, el fragmento de plásmido pEYFP-N1Bsm de 3.885 bp (Figura 8A, fragmento 1), ligado a los dos oligonucleótidos cuya secuencia comprende las 68 bp del extremo izquierdo del ADN de ϕ 29. Este producto genera una única banda de 4.021 bp que se corresponde con el esquema: ϕ 29 68L- BsmBI-pEYFP-N1 Fragmento 1-EcoO109I- ϕ 29 68L.

25 El otro fragmento (Fig. 8A, fragmento 2) no se liga a los oligonucleótidos y, por tanto, no se amplifica. Como se muestra en la Figura 8B, sólo la ligación que contiene todos los componentes adecuados genera una banda amplificada de la longitud apropiada, mientras que las reacciones de control llevadas a cabo con mezcla de ligación en ausencia de los oligonucleótidos (68L-ADN) o que sólo contengan los dos oligonucleótidos (68L y 68L', sin fragmentos de plásmido) no produjeron el producto amplificado correcto. Tras cuantificación por "fosforimager" calculamos que la banda amplificada, obtenida del producto de ligación, correspondía al 50% de las moléculas presentes en la banda pETORPHI. Los resultados corroboran que es posible ligar orígenes mínimos de ADN de ϕ 29 a un ADN heterólogo para obtener TP-ADN con la longitud adecuada mediante el sistema de replicación de ϕ 29, sin necesidad de purificar por gel o clonar.

35 **EJEMPLO 7: El grupo fosfato situado en los extremos 5' del ADN es necesario para la amplificación.**

40 Durante los experimentos llevados a cabo con oligonucleótidos conteniendo los orígenes mínimos de ϕ 29, como se ha descrito anteriormente, observamos que los extremos de ADN de ϕ 29 que contenían oligonucleótidos no fosforilados en el extremo 5' no servían de molde para la amplificación. Por ello, sometimos los productos de la ligación a tratamiento con ATP y polinucleótido kinasa de T4 y entonces sí observamos amplificación de los moldes obtenidos por ligación de los oligonucleótidos anteriormente mencionados. En el apartado anterior, para evitar la ligación de los extremos del ADN de ϕ 29 consigo mismo a través de sus extremos romos, los oligonucleótidos que utilizamos estaban previamente desfosforilados y, tras la ligación, se trataron con ATP y polinucleótido kinasa de T4. Para confirmar la importancia del grupo fosfato 5' en el proceso de amplificación realizamos el experimento que muestra la figura 9A. Se cortó una parte alícuota de pETORPHI con Dra I y se trató con fosfatasa Antártica (New England Biolabs). A continuación, una mitad de la muestra se trató con ATP y polinucleótido kinasa de T4 y la otra mitad se trató sólo con el tampón de kinasa, como control. Después de precipitar las muestras y someterlas al protocolo de amplificación, observamos que la muestra tratada solo con fosfatasa no dio lugar a ningún producto amplificado; en cambio, tanto pETORPHI control como pETORPHI tratado con kinasa tras la fosfatasa, dieron como resultado la cantidad de productos amplificados típica tras utilizar pETORPHI como molde (Figura 9).

45 Para explorar la selectividad de la maquinaria de replicación hacia los extremos 5' de los orígenes de replicación de ϕ 29, se sintetizaron tres oligonucleótidos con la secuencia del origen izquierdo de 68 bp de ϕ 29 (SEQ ID NO: 5) y diferentes modificaciones en el extremo 5'. De los tres oligonucleótidos, uno no estaba fosforilado, otro se fosforiló en el

extremo 5' y al otro se añadió un grupo propilo unido a través del fosfato 5'. Este último oligonucleótido está diseñado para imitar la estructura química que se une al fosfato en 5' cuando la TP está unida covalentemente al ADN (Figura 9C). Después de hibridados para formar el origen izquierdo de replicación de 68 bp, estos oligonucleótidos se ligaron al Fragmento 1 del plásmido pEYFP-N1 (Figura 8A) y se comprobó la capacidad de los productos resultantes para servir de molde en la amplificación. Los resultados mostrados en la figura 9B demuestran de nuevo que el ADN que se genera tras la ligación del oligonucleótido desfosforilado no es un buen molde para llevar a cabo la amplificación (carril -); en cambio, el ADN ligado al oligonucleótido fosforilado (carril P) o el ADN fosforilado tras la ligación (carril + PNK) son moldes funcionales; por otra parte, el oligonucleótido sintetizado con un grupo propilo unido a fosfato 5' (carril Prop) no dio lugar a amplificación. Estos resultados demuestran que se pueden utilizar oligonucleótidos con el origen de replicación de ϕ 29 fosforilados para ligarlos a un ADN heterólogo y así obtener la amplificación del conjunto, siendo un requerimiento importante para la amplificación el que los extremos 5' de los orígenes estén fosforilados.

EJEMPLO 8: Linerización de pETORPHI con la enzima Bae I.

Se preparó un derivado de pETORPHI, llamado pETORPHIBae (SEQ ID NO: 3), en el que se insertó un sitio de restricción Bae I justo en la unión de los extremos del ADN de ϕ 29, y con ello se eliminó el sitio Dra I. Bae I corta la cadena doble de ADN en dos puntos diferentes, separados por 33 bp, tiene su sitio de reconocimiento aproximadamente en el medio de los mismos y corta el ADN de forma independiente de la secuencia situada en los puntos de digestión correspondientes. El corte con Bae I deja extensiones de 5 nucleótidos de banda simple en los dos extremos 3' resultantes (Figura 10A). Para comprobar el efecto de extensiones en los extremos 3' de los orígenes de replicación de ϕ 29 en la eficiencia de la amplificación se realizó la amplificación mediante tres aproximaciones distintas: (i) reacción de amplificación en condiciones estándar tras el tratamiento con Bae I (carril pETORPHIBae); (ii) pretratamiento de pETORPHIBae cortado con Bae I con la ADN polimerasa de ϕ 29 en presencia de dNTPs, para eliminar las extensiones 3', y añadir después la TP y el resto de los componentes de la reacción; y (iii) pretratamiento con la ADN polimerasa Klenow y nucleótidos durante 10 min, también para generar extremos romos, y después añadir los componentes para llevar a cabo una reacción estándar de amplificación. Tal y como se muestra en la Figura 10B, los planteamientos (i) y (iii) dan lugar a una amplificación muy similar a la obtenida con pETORPHI, mientras que el pretratamiento con la ADN polimerasa de ϕ 29 dio un peor resultado, quizá a causa de la gran actividad de la exonucleasa de esta enzima.

EJEMPLO 9: Construcciones génicas.

Genescript sintetizó un fragmento de ADN correspondiente a los extremos del ADN del bacteriófago ϕ 29 hasta las posiciones 194 y 191 bp, contando desde los extremos izquierdo y derecho, respectivamente, del genoma de ϕ 29. El fragmento se diseñó con los extremos del ADN de ϕ 29 fusionados en orientación opuesta y formando un sitio de restricción Dra I. El fragmento se obtuvo clonado en el plásmido pUC57 (pUC57ORPHI) (SEQ ID NO: 4). El plásmido pETORPHI (SEQ ID NO: 1) se construyó mediante clonación entre los sitios Sac I y Hind III de pET28b (SEQ ID NO: 11), de un fragmento de ADN extraído de pUC57ORPHI utilizando las mismas enzimas de restricción. De este modo se consigue un sitio único Dra I en pETORPHI y este sitio está en la unión exacta entre los orígenes de replicación de ϕ 29.

Para construir pETORPHI68L (SEQ ID NO: 2) se diseñaron oligonucleótidos que, después de hibridados, conformaron los últimos 68 bp del extremo izquierdo del ADN de ϕ 29, además de una extensión AATT para permitir la ligación a sitios EcoR I (SEQ ID NO: 6).

pETORPHI se digirió con Dra I y EcoR I, para eliminar del vector el fragmento de 191 bp correspondiente al extremo derecho del ADN de ϕ 29, y el fragmento de 68 bp del extremo izquierdo del genoma se clonó para reemplazar el fragmento eliminado. pETORPHIBae (SEQ ID NO: 3) se creó mediante el corte de pETORPHI con Dra I y la inserción de un oligonucleótido fosforilado de doble cadena que tiene un sitio de reconocimiento para Bae I (SEQ ID NO: 9 como cadena directa y SEQ ID NO: 10 como cadena inversa). De esta forma, el sitio de corte para esa enzima se localiza en una posición inmediatamente adyacente a los extremos terminales de los orígenes de ϕ 29 en la cadena 5', mientras que deja una extensión de 5 nucleótidos en la cadena 3' (Figura 10A).

EJEMPLO 10: Digestiones enzimáticas, reacciones de ligación y desfosforilación.

La digestión de los vectores con la enzima Dra I se llevó a cabo normalmente durante 4 h, utilizando el tampón 4 de New England Biolabs, excepto en los casos en los que había de realizarse digestiones múltiples con las enzimas Dra I, Mlu I y/o Pvu I; en estos casos utilizamos el tampón 3 de New England Biolabs y 0,1 mg/ml de BSA.

La digestión con Bae I se realizó con el tampón 4 de New England Biolabs, al que se le añadió 0,1 mg/ml de BSA y 20 μ M concentración final de S-adenosilmetionina.

Todas las enzimas se inactivaron después de las reacciones mediante incubación a 65 ó 80° C, según la enzima. En todos los casos los cortes de restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. En todos los experimentos de amplificación se incluyeron puntos de control sin ADN pero con los correspondientes tampones de restricción.

5 En los experimentos en los que la ligación era necesaria, el plásmido pEYFP-N1 se cortó con BsmB I y EcoO109 I con el tampón 3 de New England Biolabs durante 8 h, luego se purificó con columnas de Qiagen y se sometió a ligación en una proporción de 1:4 junto con los oligonucleótidos hibridados para formar ADN de cadena doble. Tras inactivar la ligasa, calentándola a 65° C durante 20 min, las muestras se utilizaron como molde en reacciones de amplificación sin ningún otro tratamiento, a menos que se especifique lo contrario.

10 La desfosforilación se realizó con fosfatasa Antártica de New England Biolabs, añadiendo su tampón correspondiente e incubándola a 37° C durante 15 min, con inactivación posterior mediante incubación a 65° C durante 20 min. Después de este tratamiento, las muestras se precipitaron con etanol, en presencia de 20 µg de glicógeno como transportador, para eliminar el tampón de la fosfatasa. Después de la precipitación de las muestras, estas se resuspendieron de nuevo en tampón de ligasa y se utilizaron directamente en los experimentos de amplificación. En los casos en los que se indica, las muestras se trataron con ATP y polinucleótido kinasa de T4 de New England Biolabs, en tampón de ligasa de T4 a 37° C durante 30 min y esta enzima también se inactivó mediante incubación a 65° C durante 20 min.

EJEMPLO 11: Ensayo de Amplificación.

15 Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl, en tampón A 1X (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5% glicerol, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA) con suplemento de (NH₄)₂SO₄ hasta 20 mM y una concentración final de 100 µM cada uno de los nucleótidos: dCTP, dGTP, dTTP y dATP, [α-³²P]dATP (1 µCi), 15 µg φ29 SSB (p5) (40 µM), 10 µg p6 (27 µM), 20 ng de ADN polimerasa de φ29 (13 nM) y 20 ng de φ29 TP (26 nM), a menos que se especifique lo contrario, y las cantidades indicadas de vector o TP-ADN como molde.

20 Las reacciones se iniciaron añadiendo el resto de los componentes al molde y la TP, previamente mezclados, y se permitió que las reacciones procedieran durante 2 h a 22° C. Las reacciones se pararon añadiendo EDTA 10 mM y SDS 0,1% como concentraciones finales. Las muestras se secaron, se resuspendieron en 50 µl de 0,5 M NaOH y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%, en presencia de NaOH. Mostramos los resultados típicos de al menos 3 experimentos independientes.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica adaptada para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena que comprende al menos una secuencia nucleotídica que comprende los siguientes tres elementos en el siguiente orden:
- 5 a) un origen de replicación del bacteriófago ϕ 29, que comprende al menos 68 nucleótidos del extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29, cuyo extremo terminal va seguido por,
- b) al menos un punto de corte de la secuencia nucleotídica,
- c) origen de replicación del bacteriófago ϕ 29, que comprende al menos 68 nucleótidos del extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29, en orientación opuesta a la de la secuencia nucleotídica de (a).
- 10 2. La construcción génica según la reivindicación anterior donde las secuencias nucleotídicas de los tres elementos están yuxtapuestas o superpuestas.
3. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las secuencias nucleotídicas de los tres elementos están yuxtapuestas.
4. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde (b) es al menos una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia diana de corte de una enzima de restricción.
- 15 5. La construcción génica según la reivindicación anterior donde la enzima de restricción da lugar a extremos romos o a extremos 3' protuberantes.
6. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la construcción génica es un vector circular.
- 20 7. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el tamaño es de entre 4.800 y 10.000 pares de bases (bp).
8. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 de las secuencias nucleotídicas de (a) y (c) son del mismo extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
9. La construcción génica según la reivindicación anterior donde el extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el izquierdo.
- 25 10. La construcción génica según la reivindicación 6 donde el extremo del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el derecho.
11. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 de la secuencia nucleotídica de (a) y el origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 de la secuencia nucleotídica de (c) son de extremos distintos del ADN del bacteriófago ϕ 29.
- 30 12. La construcción génica según la reivindicación anterior donde un origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el izquierdo y el otro origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 es el derecho.
13. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 11 o 12 donde la secuencia nucleotídica que comprende el origen izquierdo de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 consiste en entre 68 y 200 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
- 35 14. La construcción génica según la reivindicación anterior donde la secuencia nucleotídica que comprende el origen izquierdo de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 consiste en 68 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
15. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 a 12 donde la secuencia nucleotídica que comprende el origen derecho de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 consiste en entre 125 y 250 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.
- 40 16. La construcción génica según la reivindicación anterior donde la secuencia nucleotídica que comprende el origen derecho de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29 consiste en entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.
17. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende al menos un sitio de clonación múltiple.
- 45 18. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende al menos un marcador.

19. La construcción génica según la reivindicación anterior donde el marcador es un gen de resistencia a un antibiótico.
20. La construcción génica según la reivindicación anterior donde el antibiótico es ampicilina o kanamicina.
21. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el punto de corte es la secuencia nucleotídica diana de corte de la enzima de restricción Dra I o Bae I.
- 5 22. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o una variante biológicamente equivalente.
23. Uso de la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena.
- 10 24. Un oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica que consiste en entre 68 y 130 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
25. El oligonucleótido según la reivindicación anterior que comprende la secuencia nucleotídica que consiste en 68 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
26. El oligonucleótido según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde el extremo 5' está fosforilado.
- 15 27. El oligonucleótido según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores que comprende la secuencia nucleotídica diana de una enzima de restricción, o la secuencia nucleotídica resultante del corte con una enzima de restricción, en posición 3' respecto de la secuencia nucleotídica que consiste en entre 68 y 130 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
- 20 28. Uso del oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 para la construcción de una secuencia nucleotídica recombinante lineal donde una secuencia nucleotídica exógena que se quiere amplificar está flanqueada por secuencias nucleotídicas que comprenden la secuencia nucleotídica que consiste en entre 68 y 130 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
29. Método de amplificación de ADN que comprende al menos las siguientes etapas:
- a) obtener una molécula de ADN lineal que comprende la secuencia de ADN a amplificar flanqueada en ambos extremos por:
- 25 i) la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29, que comprende al menos 68 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29, quedando el extremo terminal de dicho origen en el extremo del ADN lineal, o por
- 30 ii) la secuencia del origen de replicación derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29, que comprende al menos 68 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29, quedando el extremo terminal de dicho origen en el extremo del ADN lineal, o por
- 35 iii) la secuencia del origen de replicación derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29, que comprende al menos 68 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29, por un lado y la del izquierdo, que comprende al menos 68 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29, por otro, quedando el extremo terminal de dichos orígenes en los dos extremos del ADN lineal;
- b) amplificar la secuencia de ADN lineal obtenida en la etapa (a).
30. El método según la reivindicación anterior donde en la amplificación de la etapa (b) se emplean las proteínas ADN polimerasa, TP, p5 y p6 del bacteriófago ϕ 29 o cualquier variante bioequivalente de dichas proteínas.
31. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde la secuencia de ADN a amplificar tiene un tamaño de entre 500 bp y 100.000 bp.
- 40 32. El método según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores donde la secuencia de ADN lineal obtenida en la etapa (a) tiene fosforilados los dos extremos 5'.
33. El método según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores donde la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN ϕ 29 consiste en entre 68 y 200 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
- 45 34. El método según la reivindicación anterior donde la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN ϕ 29 consiste en 68 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29.
35. El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 donde la secuencia del origen de replicación derecho del ADN ϕ 29 consiste en entre 125 y 250 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.

36. El método según la reivindicación anterior donde la secuencia del origen de replicación derecho del ADN ϕ 29 consiste en entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.
- 5 37. El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 donde la secuencia del origen de replicación izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29 consiste en entre 68 y 200 nucleótidos del extremo izquierdo del ADN del bacteriófago ϕ 29 y la secuencia del origen de replicación derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29 consiste en entre 125 y 250 nucleótidos o entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del ADN del bacteriófago ϕ 29.
38. El método según cualquiera de las nueve reivindicaciones anteriores donde la etapa (b) se realiza a una temperatura inferior a 30° C, preferiblemente inferior a 27° C, y más preferiblemente entre 20° C y 25° C.
- 10 39. El método según cualquiera de las diez reivindicaciones anteriores caracterizado por que en la etapa (a) se emplea la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
40. El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 38 caracterizado por que en la etapa (a) se emplea el oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27.
- 15 41. Kit para la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena que comprende al menos una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, al menos un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 o ambos.
42. El kit según la reivindicación anterior donde la construcción génica consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o una variante biológicamente equivalente..
- 20 43. El kit según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores que además comprende la ADN polimerasa, la TP, la proteína de unión a ADN de cadena simple (SSB) y/o la proteína de unión a ADN de cadena doble (DBP) son la ADN polimerasa, TP, p5 y/o p6 del bacteriófago ϕ 29 o una variante bioequivalente de dichas proteínas.
44. El kit según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores que además comprende al menos uno de los elementos de la siguiente lista: desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , ditioneitol (DTT), glicerol, albúmina de suero bovino (BSA) y tampón Tris-HCl con pH entre 6,5 y 8.
- 25 45. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 46 para la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena.

FIG. 1

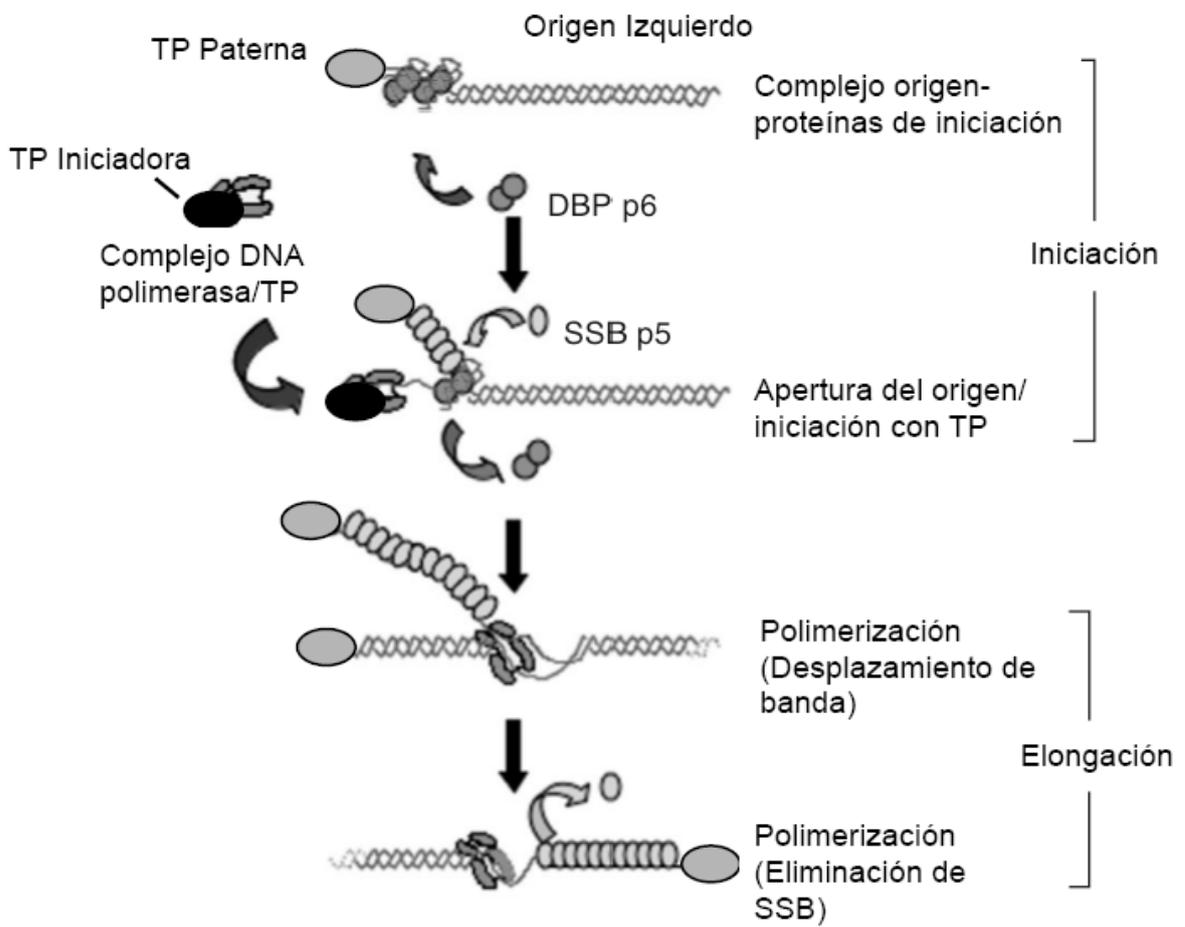


FIG. 3

30 °C



22 °C

- p6

p6

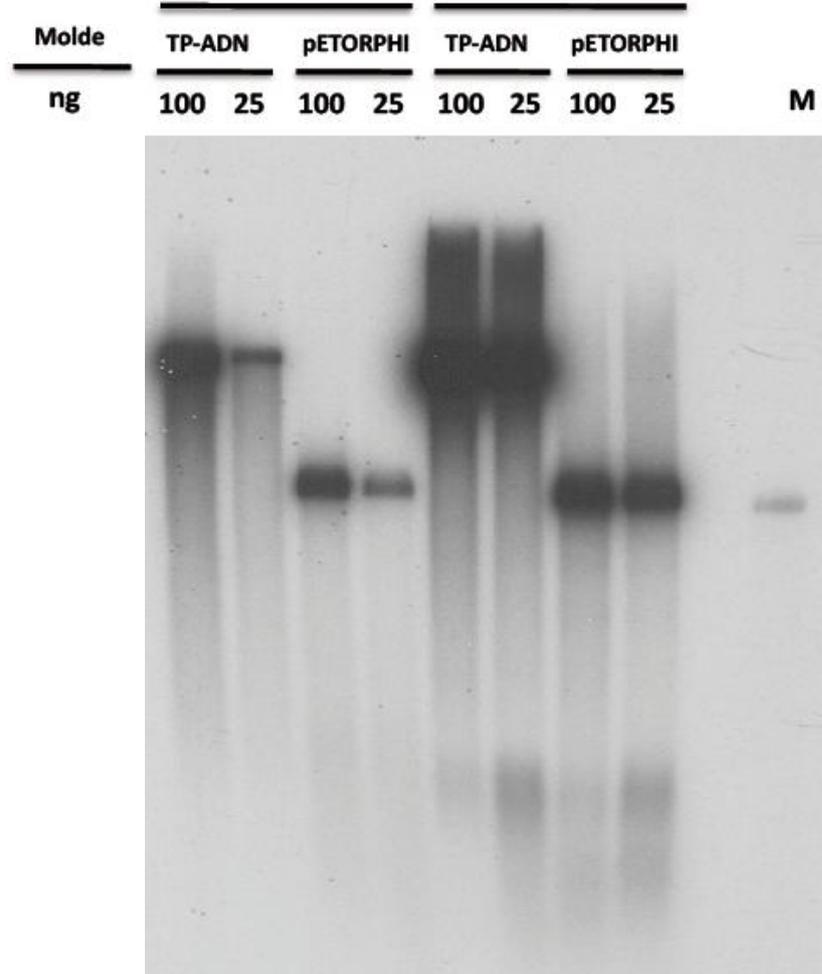


FIG. 4A

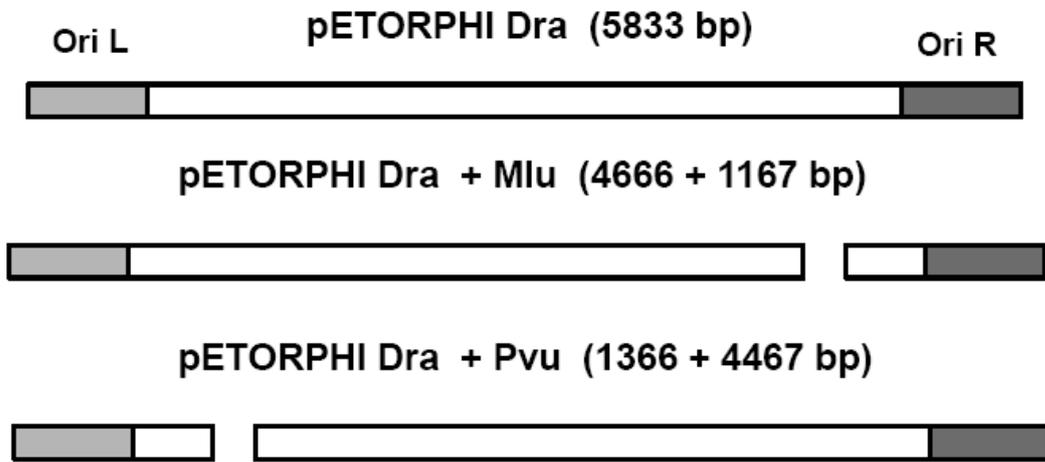


FIG. 4B

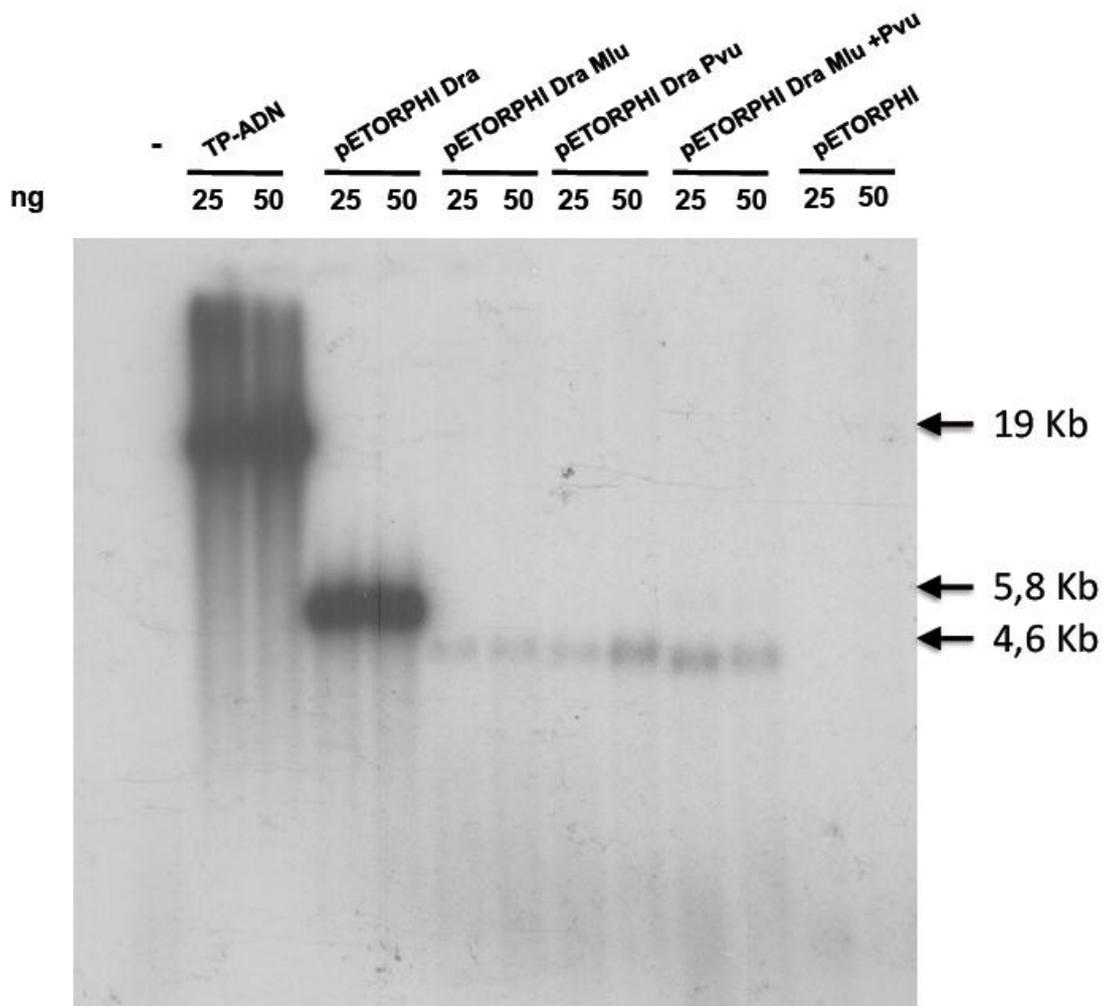


FIG. 5A

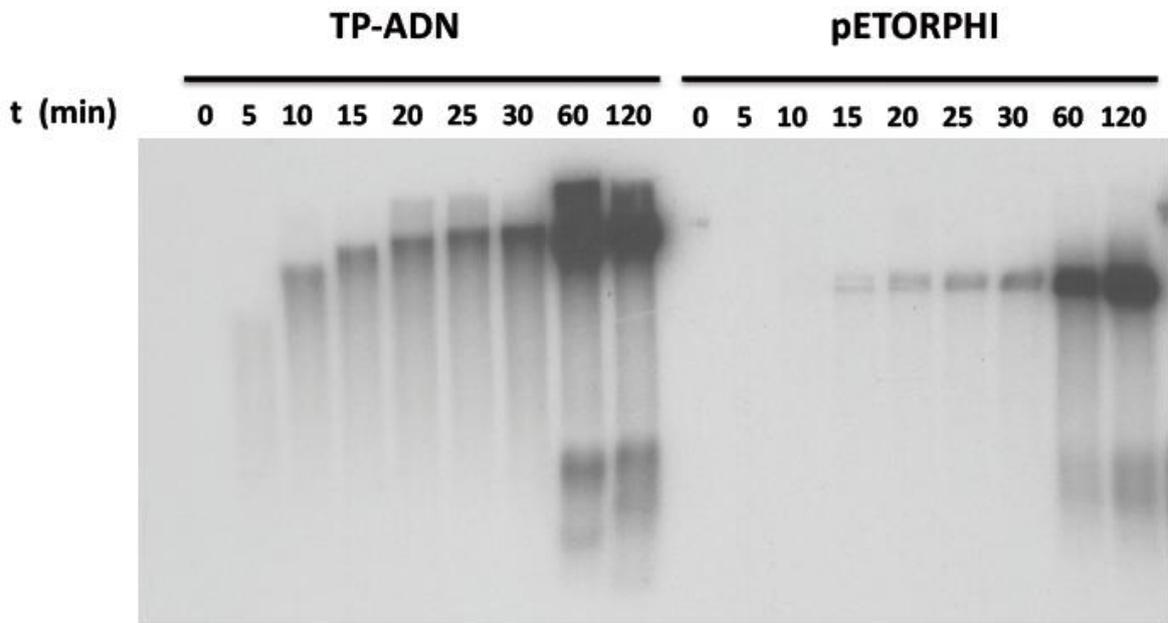


FIG. 5B

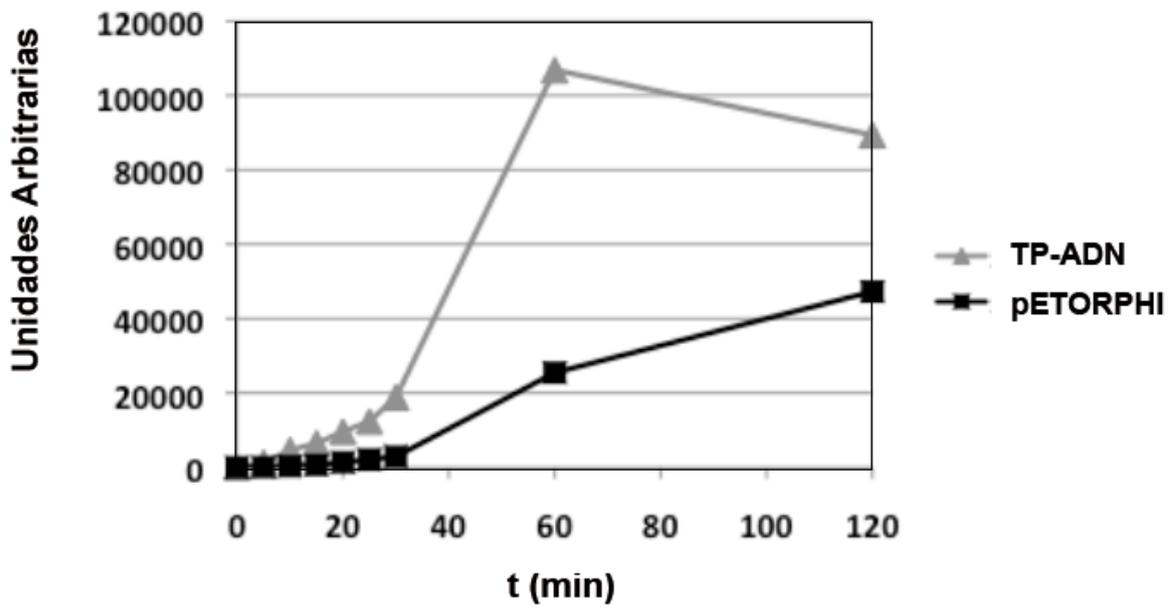


FIG. 5C

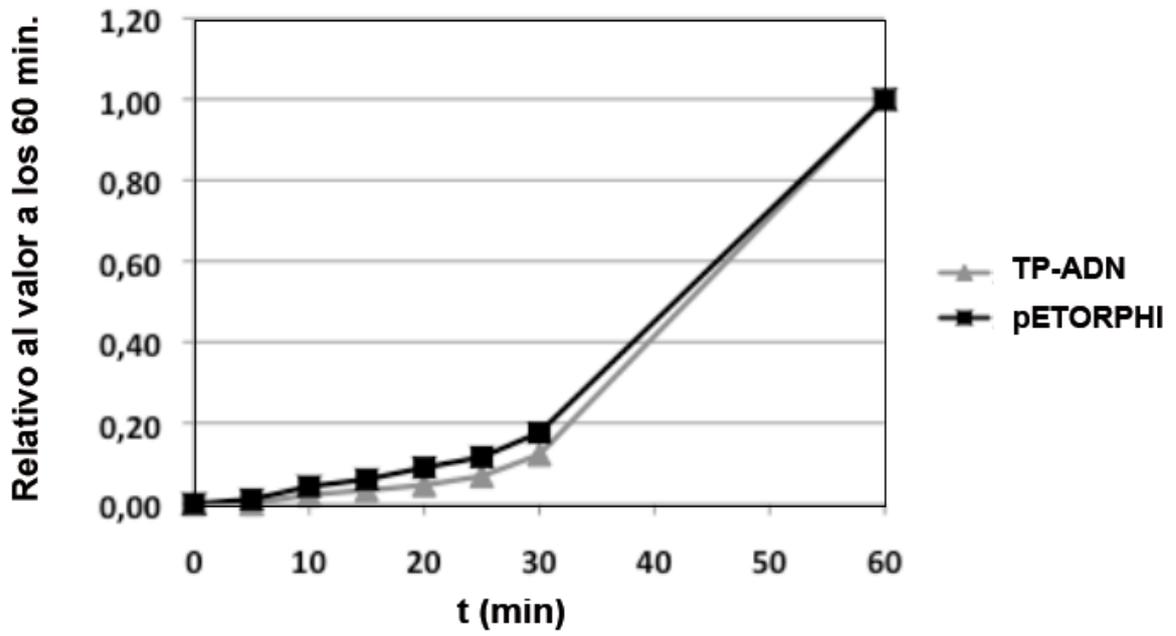


FIG. 6

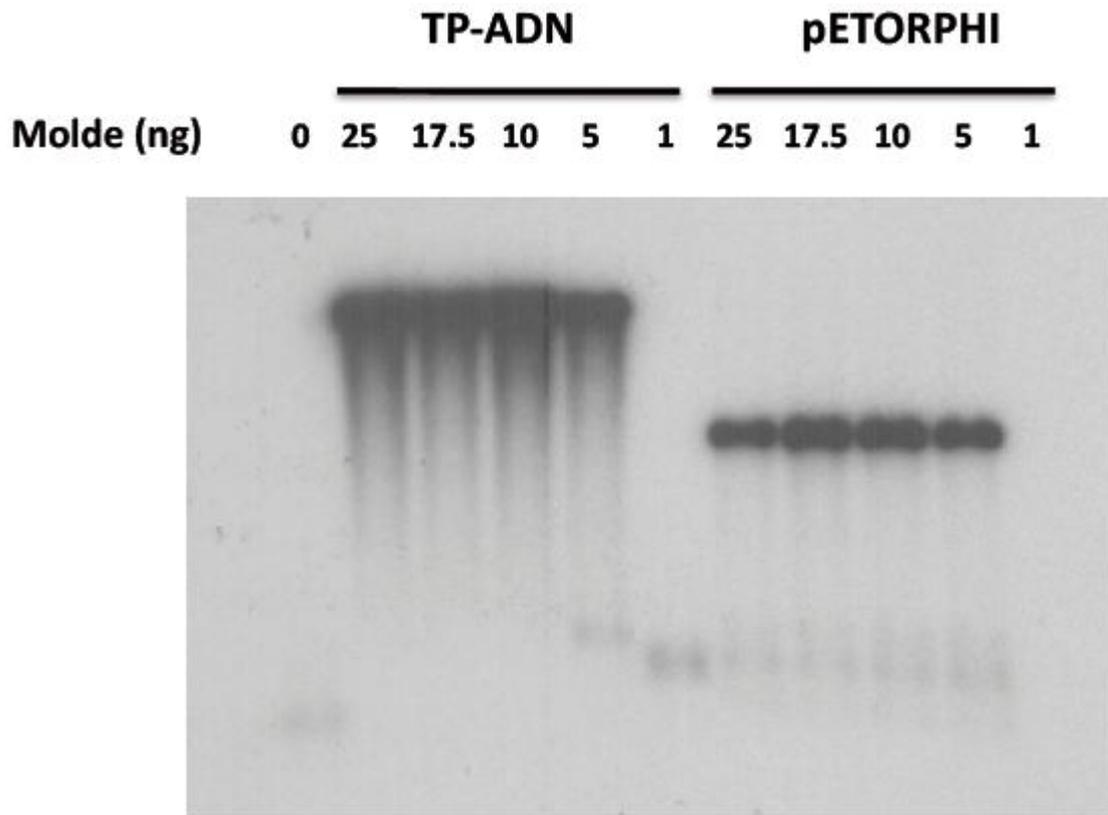


FIG. 7A

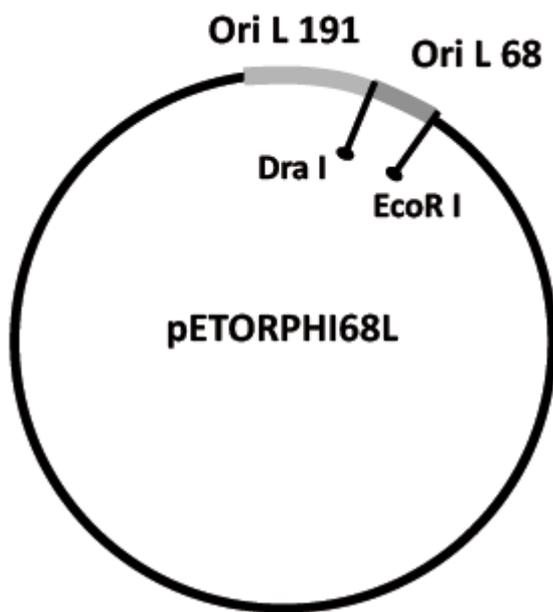


FIG. 7B

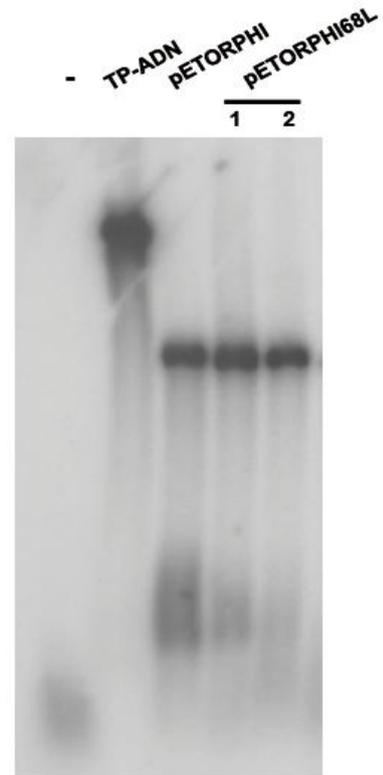


FIG. 9A

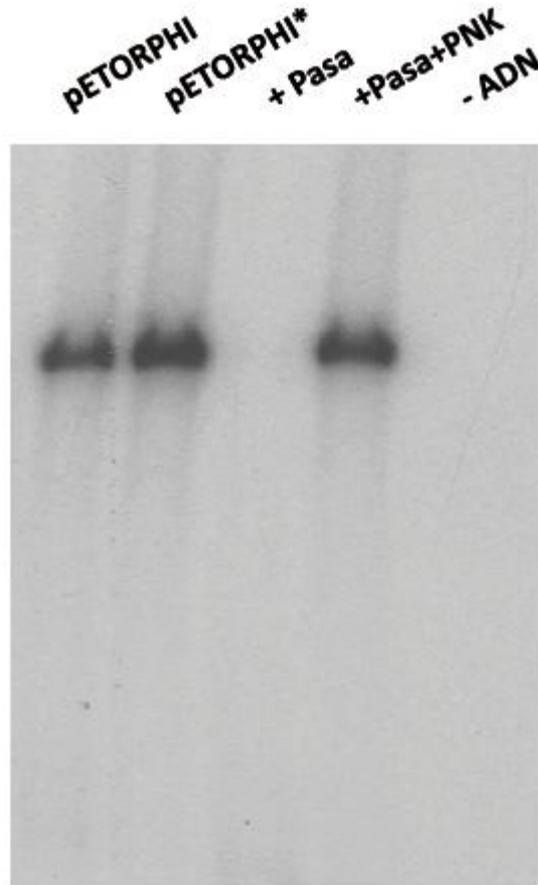


FIG. 9B

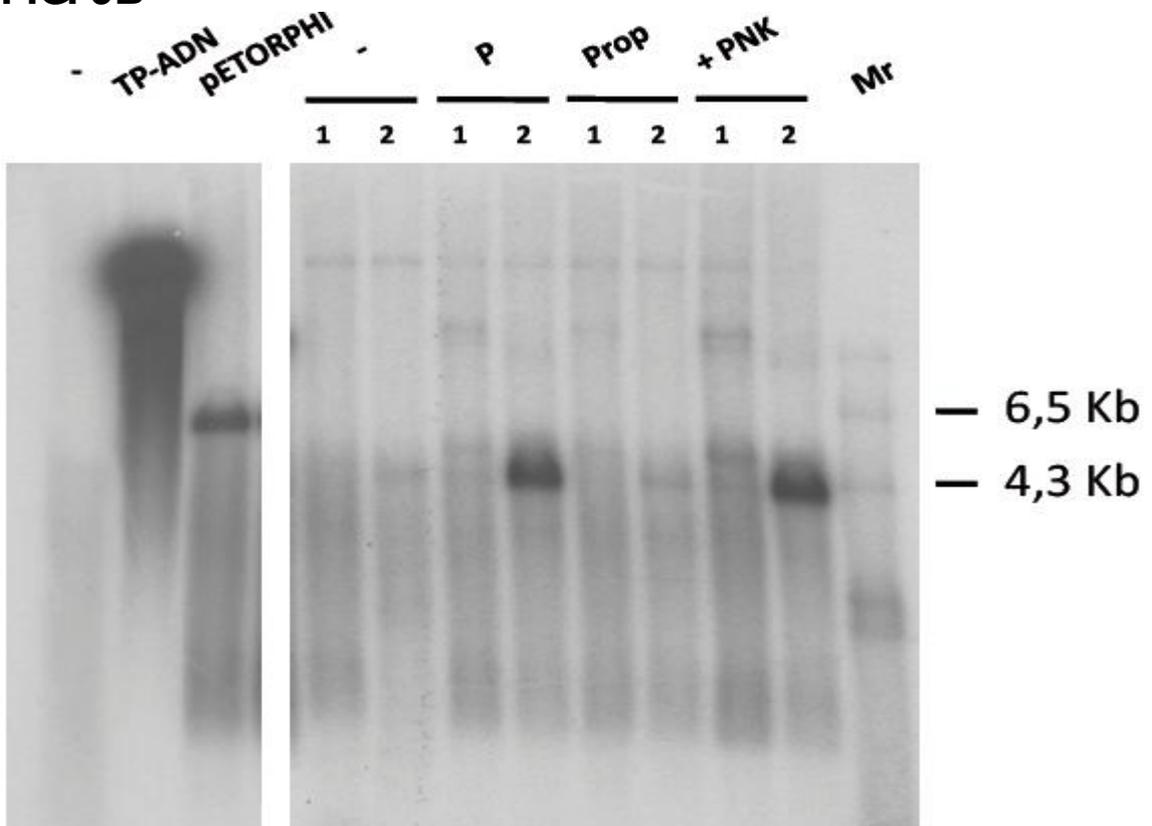


FIG. 9C

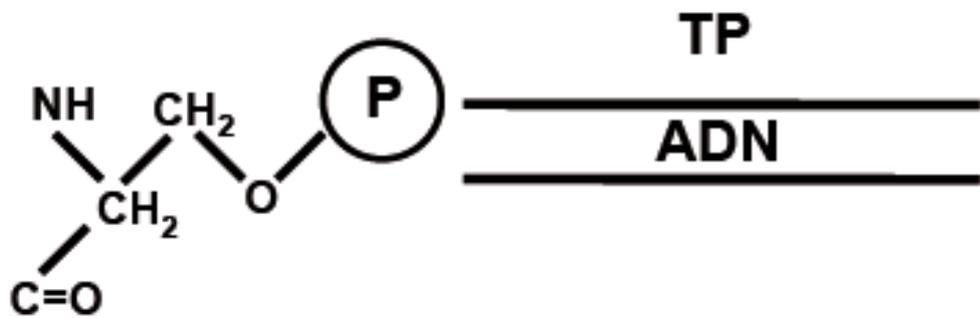
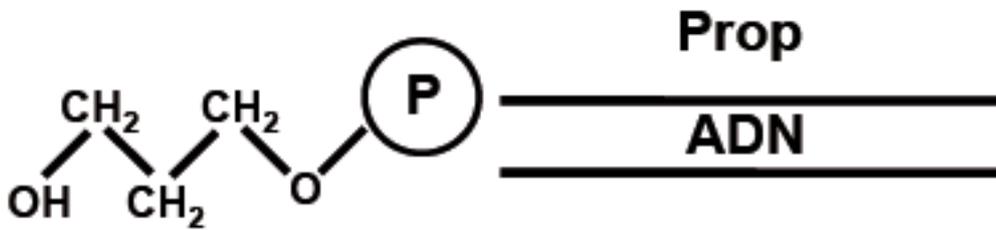
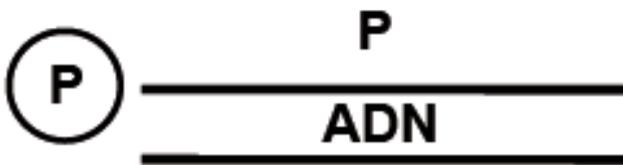
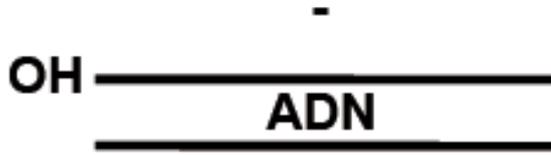
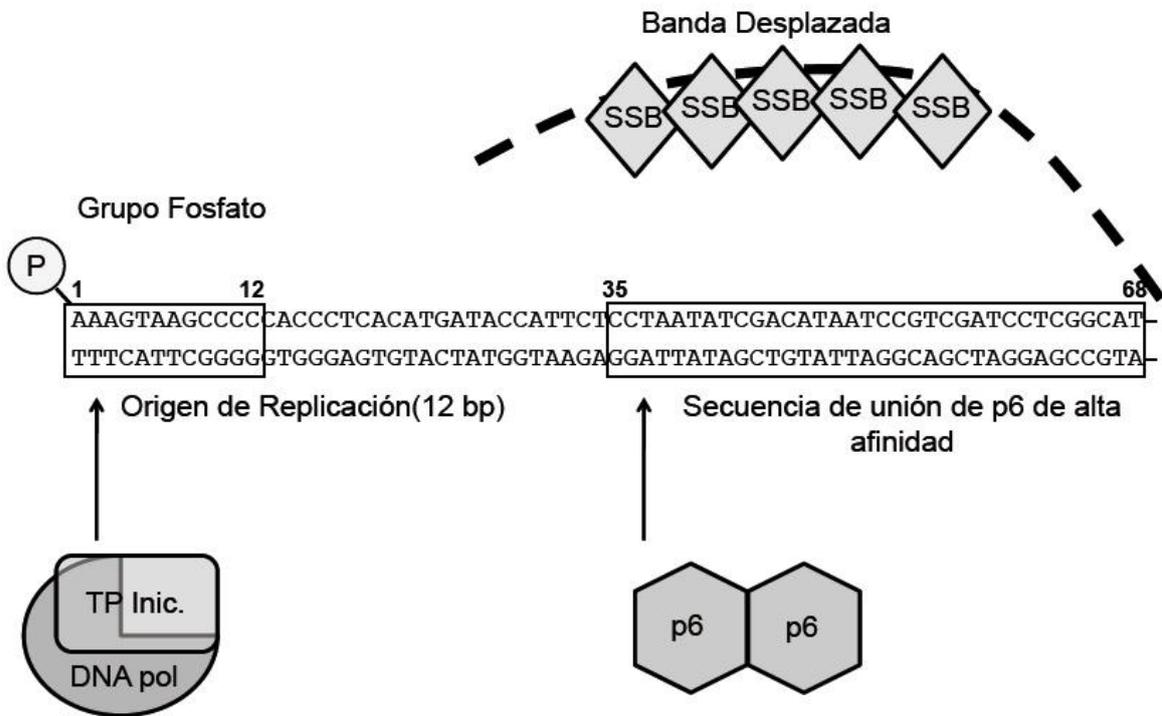


FIG. 11





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201130288

②² Fecha de presentación de la solicitud: 03.03.2011

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SERRANO, M. GUTIÉRREZ, J., PRIETO, I. et al. Signals at the bacteriophage ϕ 29 DNA replication origins required for protein p6 binding and activity. The EMBO Journal. Junio 1989, Vol. 8, N° 6, páginas: 1879 - 1885. ISSN 0261-4189.	1-7, 11-22, 24-27, 41-44
Y		23, 29-39, 45
Y	BLANCO, L., LÁZARO, J. M., DE VEGA, M. et al. Terminal protein-primed DNA amplification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Diciembre 1994, Vol. 91, N° 25, páginas: 12198 - 12202. ISSN 0027-8424.	23, 29-39, 45
A		1, 11, 12, 43, 44
X	GUTIERREZ, J., GARMENDIA, C., SALAS, M. Characterization of the origins of replication of bacteriophage ϕ 29 DNA. Nucleic Acids Research. Julio 1988, Vol. 16, N° 13, páginas: 5895 - 5914. ISSN 0305-1048.	1-7, 11-14, 17-21, 41, 43, 44
X	GUTIÉRREZ, J., GARCÍA, J. A., BLANCO, L., SALAS, M. Cloning and template activity of the origins of replication of phage ϕ 29 DNA. Gene. Enero 1986, Vol. 43, N° 1-2, páginas: 1 - 11. ISSN 0378-1119. <Doi:10.1016/0378-1119(86)90002-8>	1-7, 11-14, 17-21, 41, 43, 44

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
30.08.2012

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130288

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.03.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SALAS, M., FREIRE, R., SOENGAS, M. S. et al. Protein-nucleic acid interactions in bacteriophage ϕ 29 DNA replication. FEMS Microbiology Reviews. Agosto 1995, Vol. 17, Nº 1-2, páginas: 73 - 82. ISSN 0168-6445.	1, 11-16, 22, 24-27, 29-39, 41-45
A	ILLANA, B., LÁZARO, J. M., GUTIÉRREZ, C. et al. Phage ϕ 29 terminal protein residues Asn80 and Tyr82 are recognition elements of the replication origins. The Journal of Biological Chemistry. Mayo 1999, Vol. 274, Nº 21, páginas: 15073 - 15079. ISSN 0021-9258.	1, 11, 12, 29-32, 38, 41, 43-45

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
30.08.2012

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/8

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, INSPEC, COMPENDX, NPL, EMBLall

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7-10, 14-17, 22-45	SI
	Reivindicaciones 1-6, 11-13, 18-21	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8-10, 28, 40	SI
	Reivindicaciones 1-7, 11-27, 29-39, 41-45	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	SERRANO, M. et al. The EMBO Journal. Junio 1989, Vol. 8, Nº 6, páginas: 1879 - 1885.	06.1989
D02	BLANCO, L. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Diciembre 1994, Vol. 91, Nº 25, páginas: 12198 - 12202.	12.1994
D03	GUTIERREZ, J. et al. Nucleic Acids Research. Julio 1988, Vol. 16, Nº 13, páginas: 5895 - 5914.	07.1998
D04	GUTIÉRREZ, J. et al. Gene. Enero 1986, Vol. 43, Nº 1-2, páginas: 1 - 11.	01.1986
D05	SALAS, M. et al. FEMS Microbiology Reviews. Agosto 1995, Vol. 17, Nº 1-2, páginas: 73 - 82.	08.1995
D06	ILLANA, B., et al. The Journal of Biological Chemistry. Mayo 1999, Vol. 274, Nº 21, páginas: 15073 - 15079.	05.1999

D01 divulga un plásmido, que comprende 273 nucleótidos del extremo derecho de ϕ 29, la diana de restricción *Dra*I y 73 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29. Ambos orígenes de replicación se encuentran en orientación opuesta. Este plásmido se utilizó para determinar las secuencias mínimas funcionales de los orígenes de replicación.

En D02 se desarrolla un método de amplificación del ADN de ϕ 29 *in vitro*, mediante su incubación a 30 °C en presencia de la ADN polimerasa, p5, p6 y TP del fago.

D03 y D04 divulgan sendos plásmidos que comprenden: el origen de replicación derecho de ϕ 29, una diana de restricción y el origen de replicación izquierdo de ϕ 29, encontrándose ambos orígenes de replicación en orientación opuesta.

En D05 se presenta una revisión sobre el mecanismo de replicación de ϕ 29 y la función de las proteínas TP, p6 y p5. p6 es importante en el inicio de la replicación, interaccionando con el ADN del virus. Parece que los principales sitios de reconocimiento de esta proteína están entre las posiciones 62 y 125 del extremo derecho y las posiciones 46 y 68 del izquierdo. Por otro lado, p5 se va uniendo al ADN naciente de cadena única. Además, se afirma que se ha desarrollado un procedimiento de amplificación del ADN de ϕ 29 en el que se incuba a 30 °C, el ADN del virus junto con la ADN polimerasa, p5, p6 y TP del fago.

D06 muestra un estudio sobre el efecto de diferentes mutaciones de la proteína TP de ϕ 29 en su actividad, analizando la alteración de la capacidad de amplificación del bacteriófago. Para ello, se incuba la proteína con el ADN del virus, la polimerasa, p5 y p6, a 30 °C.

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

En la presente invención, se optimiza un procedimiento de amplificación isotérmica, basada en la utilización de los orígenes de replicación del bacteriófago ϕ 29, así como la polimerasa y las proteínas TP, p5 y p6 del mismo. En consecuencia, esta solicitud tiene por objeto un vector circular adaptado para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena, que comprende en orden los siguientes elementos: un origen de replicación de ϕ 29 unido a un punto de corte de la secuencia nucleotídica, unido a su vez a un segundo origen de replicación de ϕ 29 en orientación opuesta al primero, comprendiendo dichos orígenes 68 nucleótidos de uno de los extremos del virus (reivindicaciones de la 1 a la 7, de la 13 a la 21). Los orígenes de replicación de ϕ 29 pueden pertenecer al mismo extremo del fago o a extremos diferentes (reivindicaciones de la 8 a la 12). De este modo, se incluyen las construcciones génicas de secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 (reivindicación 22). Este vector se utiliza en la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena (reivindicación 23). También se presenta un oligonucleótido que comprende los 68 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29 y su uso en la construcción de una secuencia nucleotídica recombinante lineal, donde la secuencia exógena a amplificar se halla flanqueada por sendas secuencias que comprenden los 68 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29 (reivindicaciones de la 24 a la 28). Además, es objeto de la invención un método de amplificación de ADN que comprende: obtener una molécula de ADN lineal que tiene la secuencia a amplificar flanqueada por los orígenes de replicación de ϕ 29, mediante el uso de la construcción génica o del oligonucleótido de la invención; e incubar dicha molécula con la polimerasa, TP, p5 y p6 del bacteriófago a una temperatura inferior a 30 °C (reivindicaciones de la 29 a la 40). Por último, se incluye el kit que comprende la construcción génica o el oligonucleótido de la solicitud, junto con la polimerasa, TP, p6 y p5 de ϕ 29, y el uso del mismo en la amplificación de una secuencia nucleotídica exógena (reivindicaciones de la 41 a la 45).

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

1.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 6, DE LA 11 A LA 13 Y DE LA 18 A LA 21

La presente solicitud, tiene por objeto un vector circular adaptado para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena, que comprende las siguientes secuencias yuxtapuestas: un origen de replicación del ADN del bacteriófago $\phi 29$, un corte con una enzima de restricción, y un segundo origen de replicación del ADN de $\phi 29$ en orientación opuesta al primero, siendo uno de los orígenes de replicación el izquierdo y el otro el derecho, y comprendiendo cada uno al menos 68 nucleótidos del extremo del fago (reivindicaciones de la 1 a la 6, 11 y 12). El origen de replicación izquierdo tiene entre 68 y 200 nucleótidos del extremo izquierdo de $\phi 29$ (reivindicación 13). Las reivindicaciones de la 18 a la 20 especifican que la construcción incluye un gen de resistencia a ampicilina, y la 21 que el punto de corte es la diana de la enzima de restricción *Dral*.

Tanto D01 como D03, divulgan un plásmido que comprende yuxtapuestos 273 nucleótidos del extremo derecho de $\phi 29$, la diana de restricción *Dral* y 73 nucleótidos del extremo izquierdo de $\phi 29$. Ambos orígenes de replicación se encuentran en orientación opuesta. (Reivindicaciones de la 1 a la 6, de la 11 a la 13 y 21).

En D04, se anticipa un plásmido que comprende yuxtapuestos 269 nucleótidos del extremo derecho de $\phi 29$, la diana de restricción *AhaIII* y 73 nucleótidos del extremo izquierdo de $\phi 29$, incluyendo también el gen de la resistencia a ampicilina. Los dos orígenes de replicación están orientados en sentidos opuestos. (Reivindicaciones de la 1 a la 6, de la 11 a la 13, y de la 18 a la 20)

En consecuencia, las reivindicaciones de la 1 a la 6, de la 11 a la 13 y de la 18 a la 21, han sido divulgadas de manera inequívoca en los documentos D01, D03 o D04, por lo que estas reivindicaciones no son nuevas (art 6.1 LP .11/1986).

1.2. REIVINDICACIONES DE LA 7 A LA 10, DE LA 14 A LA 17 Y DE LA 22 A LA 45

Las reivindicaciones de la 7 a la 10, de la 14 a la 17 y de la 22 a la 45, cumplen el requisito de novedad (art 6.1 LP .11/1986).

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

2.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 7 Y DE LA 17 A LA 21

Las reivindicaciones de la 1 a la 6, tienen por objeto un vector circular adaptado para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena, que comprende las siguientes secuencias yuxtapuestas: al menos un origen de replicación del ADN del bacteriófago $\phi 29$, un corte con una enzima de restricción, y un segundo origen de replicación del ADN de $\phi 29$ en orientación opuesta al primero, comprendiendo dichos orígenes de replicación los 68 nucleótidos de uno de los extremos del virus. Esta construcción, puede incluir de manera adicional un sitio de clonación múltiple (reivindicación 17) o un gen de resistencia a ampicilina o kanamicina (reivindicaciones de la 18 a la 20). En la reivindicación 7, se especifica que el tamaño de la construcción génica es de entre 4800 y 10000 pares de bases, y en la reivindicación 21, que el punto de corte es la diana de restricción *Dral* o *Bael*.

Por las mismas razones ya argumentadas en el punto 1.1, las reivindicaciones de la 1 a la 6 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

El tamaño de la construcción génica no se considera relevante, por lo que a la vista de los documentos D01, D03 o D04, la reivindicación 7 no cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

Es sobradamente conocido en el estado de la técnica, la incorporación de sitios de clonación múltiple en vectores, por lo que aunque en D01, D03 y D04 no se especifica la inclusión de estas secuencias en los vectores divulgados, se entiende que la reivindicación 17 no presenta actividad inventiva, a la luz de dichos documentos (art. 8.1 LP 11/1986).

La utilización de un gen de resistencia a ampicilina o kanamicina como gen marcador es una opción rutinaria en el diseño de vectores. En consecuencia, aunque ni en D01 ni en D03 se indique que se incluye dicho gen, esta diferencia no es relevante.

Así, dados los documentos D01, D03 o D04 (ver apartado 1.1. para este último) las reivindicaciones de la 18 a la 20 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

Por último, no se considera importante la diana de restricción que se utilice en el punto de corte, por lo que en vista tanto de D01 o D03 (ver apartado 1.1.) como de D04, la reivindicación 21 no cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.2. REIVINDICACIONES DE LA 8 A LA 10

Las reivindicaciones de la 8 a la 10 presentan actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.3. REIVINDICACIONES DE LA 11 A LA 13

A la luz de los razonamientos desarrollados en el apartado 1.1., las reivindicaciones de la 11 a la 13 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.4. REIVINDICACIONES DE LA 14 A LA 16

La presente solicitud tiene por objeto, un vector circular adaptado para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena, que comprende las siguientes secuencias: el origen de replicación izquierdo del bacteriófago ϕ 29, un corte con una enzima de restricción, y el origen de replicación derecho de ϕ 29 en orientación opuesta al primero. El origen izquierdo consiste en los 68 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29 (reivindicación 14) y el derecho tiene de 150 a 200 nucleótidos del extremo derecho (reivindicaciones 15 y 16).

D01 divulga un plásmido que comprende: 273 nucleótidos del extremo derecho de ϕ 29, la diana de restricción *Dral* y 73 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29. Ambos orígenes de replicación tienen orientaciones opuestas. Aunque la longitud de estas secuencias es diferente a las reivindicadas, se afirma que los fragmentos que contienen 125 nucleótidos del extremo derecho o 68 del extremo izquierdo son capaces de unir p6, siendo por tanto funcionales la secuencias que incluyen de 68 a 73 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29 y las que incluyen de 125 a 273 nucleótidos del extremo derecho del fago.

Por lo tanto, a la vista de D01, un experto en la materia intentaría diseñar un vector circular que comprendiera los 68 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29, una diana de restricción y entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho del virus, con una expectativa razonable de éxito (reivindicaciones de la 14 a la 16).

Además, en D03 y D04 se divulgan sendos plásmidos que comprenden yuxtapuestos, 273 ó 269 nucleótidos del extremo derecho de ϕ 29, una diana de restricción y 73 nucleótidos del extremo izquierdo. Los dos orígenes de replicación tienen sentidos opuestos.

No se piensa que sea relevante, la diferencia entre D03 o D04 y la reivindicación 14, de cinco nucleótidos en la longitud del origen de replicación izquierdo de ϕ 29.

En consecuencia, dado cualquiera de los documentos D01, D03 o D04, la reivindicación 14 no presenta actividad inventiva, y a la luz de D01, las reivindicaciones 15 y 16 tampoco cumplen dicho requisito (art. 8.1 LP 11/1986).

2.5. REIVINDICACIÓN 22

El objeto de la reivindicación 22, es una construcción génica adaptada para la introducción de una secuencia nucleotídica exógena que comprende las siguientes secuencias yuxtapuestas: un origen de replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29, un corte con una enzima de restricción, y un segundo origen de replicación del ADN de ϕ 29 en orientación opuesta al primero, cuya secuencia es SEQ ID NO: 1, 2 ó 3.

Ya que en vista de D01, los elementos fundamentales de las construcciones de secuencias SEQ ID NO:1 ó 3 no tienen actividad inventiva, no se considera importante la secuencia nucleotídica en sí. Por lo tanto, la reivindicación 22 no cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.6. REIVINDICACIONES DE LA 24 A LA 27

El objeto de la solicitud según las reivindicaciones de la 24 a la 27, es un oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica que consiste en 68 nucleótidos del extremo izquierdo de ϕ 29, junto con la secuencia diana de una enzima de restricción o la secuencia resultante del corte con la enzima de restricción.

Al anticiparse en D01 la funcionalidad de esta región nucleotídica y ser conocido en el estado de la técnica el diseño de oligonucleótidos para la adición de secuencias en los extremos, se entiende que dado dicho documento, las reivindicaciones de la 24 a la 27 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.7 REIVINDICACIÓN 28

La reivindicación 28 cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.8 REIVINDICACIONES 23 Y DE LA 29 A LA 39

La solicitud tiene por objeto un método de amplificación de ADN, que comprende las siguientes etapas: obtener una molécula de ADN lineal a amplificar flanqueada en ambos extremos por el origen de replicación izquierdo de ϕ 29, que consiste en los 68 nucleótidos del extremo izquierdo del fago, y el origen de replicación derecho de ϕ 29, que tiene entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho, e incubar esta molécula junto con la ADN polimerasa, TP, p5 y p6 de dicho fago a una temperatura menor de 30 °C (reivindicaciones de la 29 a la 30, de la 33 a la 38). La secuencia a amplificar, tiene un tamaño de entre 500 y 100000 pb (reivindicación 31) y el ADN lineal presenta los extremos 5' fosforilados (reivindicación 32). Para la formación del ADN lineal, se puede utilizar la construcción génica objeto de la invención (reivindicación 39). De hecho, el objeto de la reivindicación 23, es el uso de la construcción génica en este procedimiento.

En D02 se desarrolla un método de amplificación del ADN de $\phi 29$ *in vitro* aprovechando su maquinaria de replicación. La incubación del ADN a 30 °C durante 1 hora en presencia de la ADN polimerasa, p5, p6 y TP del fago, consigue amplificar los 19285 pares de bases del virus en tres órdenes de magnitud. Así, se afirma que este sistema podría ser adecuado para la amplificación de moléculas mayores de 70000 pares de bases.

La diferencia entre D02 y la presente solicitud, es que no se determinan cuáles son las secuencias necesarias y cuáles las prescindibles para la realización de la amplificación.

El efecto técnico, es la posibilidad de la inserción de moléculas de ADN exógeno mayores y poder determinar el punto de inserción del mismo.

En D01 se investiga la secuencia mínima necesaria para que se forme el complejo de iniciación, afirmándose que los 68 nucleótidos del extremo izquierdo del fago y los 125 del extremo derecho, son suficientes para que se una la proteína p6 al ADN y se forme el complejo de inicio de la replicación. El análisis de la formación de estos complejos, se realizó en distintos plásmidos, entre ellos uno que comprende 273 nucleótidos del extremo derecho de $\phi 29$, la diana de restricción *Dral* y 73 nucleótidos del extremo izquierdo de $\phi 29$. Ambos orígenes de replicación se encuentran en orientación opuesta. Para este estudio, los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción correspondiente, con el fin de que los orígenes de replicación quedaran en los extremos del ADN lineal.

Por lo tanto, un experto en la materia intentaría amplificar secuencias exógenas de entre 500 y 100000 pb mediante la obtención de un ADN lineal en el que la secuencia exógena está flanqueada por el origen de replicación izquierdo de $\phi 29$, que tiene los 68 nucleótidos del extremo izquierdo del fago, y el origen de replicación derecho de $\phi 29$, que tiene entre 150 y 200 nucleótidos del extremo derecho (D01), mediante su incubación en presencia de la ADN polimerasa, p5, p6 y TP del fago (D02), con una expectativa razonable de éxito.

Así, las reivindicaciones de la 29 a la 31 y de la 33 a la 37 no tienen actividad inventiva.

Generalmente, el extremo 5' de las moléculas de ADN se encuentra fosforilado, por lo que se entiende que la reivindicación 32 no presenta actividad inventiva.

Aunque tanto en D01 como en D02 las reacciones se realizan a 30 °C y en la solicitud se especifica que la temperatura ha de ser menor de 30, al ser esta diferencia de muy pequeña magnitud, se opina que esta variación forma parte de la optimización rutinaria que llevaría a cabo un experto en la materia. En consecuencia, la reivindicación 38 tampoco cumple el requisito de actividad inventiva.

En D01 se utilizan los plásmidos para estudiar el inicio de la replicación viral, por lo que sería obvia su utilización en el procedimiento de amplificación. Por este motivo, se considera que las reivindicaciones 23 y 39 no tienen actividad inventiva.

Es decir, en vista de D01 junto con D02, las reivindicaciones 23, y de la 29 a la 39, no presentan actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.9 REIVINDICACIÓN 40

La reivindicación 40 cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.10 REIVINDICACIONES DE LA 41 A LA 45

Las reivindicaciones 41, 43 y 44, tienen por objeto un kit que comprende la construcción génica o el oligonucleótido de la invención; alguna de las proteínas ADN polimerasa, p5, p6 o TP de $\phi 29$; y alguno de los reactivos dNTPs, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , DTT, glicerol, BSA o Tris-HCl con pH entre 6,5 y 8. En la reivindicación 42 se especifica que la construcción génica presenta las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 ó 3. Por último, la reivindicación 45 tiene por objeto el uso del kit en la amplificación de una secuencia exógena.

Tanto en D01 como en D03 o en D04, se realizan diversos estudios en los que se utiliza la construcción génica de la invención junto con la polimerasa, TP, dNTPs, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , DTT y Tris-HCl con pH entre 6,5 y 8.

Por consiguiente, se entiende que a la luz de los documentos D01, D03 o D04, las reivindicaciones 41, 43 y 44, no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

Debido a que en vista de D01, la construcción génica que tiene las secuencias SEQ ID NO: 1 ó 3 no tiene actividad inventiva, y a los motivos arriba indicados sobre la falta de actividad inventiva de la reivindicación 41, la reivindicación 42 no presenta actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

Por último, a la luz de las objeciones expuestas sobre la actividad inventiva del procedimiento y el uso de la estructura génica de la invención (ver apartado 2.8), dados los documentos D01 junto con D02, la reivindicación 45 no tiene actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).