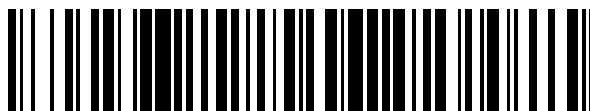


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 435**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6844 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2014** **PCT/US2014/047953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015** **WO15013486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2014** **E 14750104 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019** **EP 3024944**

54 Título: **Método y dispositivo para la recolección y amplificación de ácidos nucleicos circulantes**

30 Prioridad:

26.07.2013 US 201313952173

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

22.07.2019

73 Titular/es:

GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)
1 River Road
SCHENECTADY, US

72 Inventor/es:

KVAM, ERIK LEEMING;
NELSON, JOHN RICHARD;
GROSSMANN, GREGORY ANDREW;
HELLER, RYAN CHARLES;
FINEHOUT, ERIN JEAN;
PULEO, CHRISTOPHER MICHAEL y
WATERS, WILLIAM PATRICK

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 435 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para la recolección y amplificación de ácidos nucleicos circulantes

Antecedentes de la invención

5 La presente solicitud se refiere de forma general a la recolección y amplificación de los ácidos nucleicos circulantes (CNA, por sus siglas en inglés) de las muestras biológicas. Más particularmente, la solicitud se refiere a la separación, recolección, amplificación y detección posterior de los ácidos nucleicos circulantes de muestras biológicas.

10 Los ácidos nucleicos circulantes se liberan a partir de diversos tejidos y se acumulan en los fluidos corporales. Varios ácidos nucleicos intactos y/o fragmentados han sido identificados en los ANC, incluyendo ARNm, ARNmi, ADN mitocondrial, ADN genómico y retrotransposones. Los ANC son idealmente adecuados para la detección precoz de enfermedades, así como en aplicaciones de pronóstico y terapéutico. El diagnóstico potencial de los ANC se ha demostrado en un amplio espectro de enfermedades, incluyendo la tumorigénesis, inflamación, infarto de miocardio, trastornos autoinmunes y complicaciones asociadas al embarazo.

15 Los ácidos nucleicos circulantes se pueden detectar utilizando métodos mínimamente invasivos tomando muestras de los fluidos corporales. Sin embargo, los ANC están escasamente presentes en los fluidos corporales. Por lo tanto, el análisis de los ANC generalmente, a menudo, requiere la recolección y el procesamiento de grandes volúmenes (mililitros o litros) de líquidos corporales. Sin embargo, muchas veces, sólo hay disponibles para los análisis cantidades muy pequeñas de muestras de fluidos corporales (microlitros), especialmente en los campos del diagnóstico in vitro, la patología y la medicina forense. Por otra parte, la recolección de muestras de gran volumen a menudo da lugar a importantes costes de montaje, costes de transporte/manipulación y artefactos de muestras. Además, debido a que los ANC están presentes fuera de las células en los fluidos corporales, esta mezcla de ácidos nucleicos circulantes puede estar gradualmente saturada por los ADN o ARN intracelulares que se liberan por medio de la lisis de las células residentes en los fluidos corporales. Esta saturación o contaminación puede ser una función de múltiples parámetros como el tiempo, la temperatura, el tipo de tratamiento para la estabilización y las fuerzas de separación utilizadas para el aislamiento de los fluidos corporales.

25 Estas variables preanalíticas pueden producir una contaminación genómica indeseable con origen en las células residentes que están presentes en los fluidos corporales. Por ejemplo, en muestras de sangre entera, los ADN o ARN pueden ser liberados en el plasma o en el suero de las células sanguíneas durante su almacenamiento y procesamiento. Esto puede interferir en el análisis de los ácidos nucleicos circulantes extracelulares que están presentes en el plasma o el suero. La contaminación genómica de la mezcla de ácidos nucleicos circulantes puede ser reducida mediante el mantenimiento de la temperatura de la muestra de sangre a 4°C y el procesamiento de la muestra en las 2 horas siguientes. Sin embargo, tales condiciones a menudo no son factibles y/o rentables para muchas aplicaciones.

35 La amplificación del genoma completo se puede utilizar ampliando la mezcla natural de los ácidos nucleicos circulantes. Sin embargo, los intentos previos de amplificación del genoma completo de los ANC utilizando múltiples técnicas de amplificación por desplazamiento (MDA, por sus siglas en inglés) han puesto de relieve desafíos únicos que están asociados con la mala calidad y la baja cantidad de los ANC en los fluidos corporales. Generalmente, por naturaleza, los ANC están altamente fragmentados debido a su origen proveniente de las células apoptóticas/necróticas. El patrón de fragmentación del ácido nucleico de los ANC no es ideal para la amplificación del genoma completo convencional y, por lo tanto, conduce a patrones de pérdidas alélicas y/o amplificación sesgada por secuencias. Además, muchas de las técnicas de amplificación del genoma completo convencionales requieren cantidades en el orden de los nanogramos de los ácidos nucleicos iniciales. Por lo tanto, los ANC se deben purificar a partir de volúmenes grandes de una fracción no celular para satisfacer estas demandas de concentración patrón. En vista de lo anterior, existe una necesidad crítica de tecnologías que agilicen la separación, recolección, estabilización y/o amplificación de los ácidos nucleicos circulantes a partir de una muestra biológica, particularmente cuando se analizan volúmenes de muestras pequeñas que contienen cantidades en el orden de picogramos de ANC.

El documento WO 2012/135815 describe un método para amplificar ácidos nucleicos circulantes a partir de una muestra biológica proveniente de la preparación de una fracción sin células por ultrafiltración.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a la recolección y amplificación posterior de los ANC a partir de una muestra biológica.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

55 Un aspecto de la invención se refiere a un método para la amplificación de los ácidos nucleicos circulantes que están presentes en una fracción no celular de una muestra biológica. El método incluye las etapas de filtrar la muestra biológica para separar la fracción no celular de las células intactas, recoger la fracción separada y no celular

en una matriz sólida seca y extraer los ADN de la fracción recogida no celular. El método incluye además las etapas de dar la forma de círculo a los ANC extraídos para formar ácidos nucleicos circulantes monocatenarios y amplificar los círculos de ácido nucleico monocatenarios por amplificación circular ondulante cebada aleatoriamente para formar un producto de ANC amplificado. Si los ANC están en forma bicatenaria, el método también incluye la etapa de desnaturalizar los ANC bicatenarios en una forma monocatenaria antes de la reacción de ligación intramolecular para preparar los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios. La circularización de los ANC lineales monocatenarios se puede conseguir mediante una ligasa que sea capaz de una ligación intramolecular de los ácidos nucleicos monocatenarios.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para el procesamiento de sangre entera en un punto de recolección para recoger plasma o suero que contenga ácidos nucleicos circulantes. El método incluye las etapas de filtración de sangre entera para separar el plasma o el suero de la sangre entera en los puntos de recolección, recogiendo el plasma o el suero separado en una matriz sólida seca y secando el plasma recogido en la matriz sólida. La matriz sólida está desprovista de cualquier tipo de detergente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de los ANC a partir de una muestra seca de plasma o suero. El método incluye las etapas de extraer los ANC desde el plasma o suero secos, realizando una amplificación del genoma completo de los ácidos nucleicos extraídos circulantes formando un producto de ácido nucleico amplificado circulante (CNA) y detectando una secuencia de ácido nucleico circulante específica en el producto de ANC amplificado. La amplificación del genoma completo se lleva a cabo por una primera circularización de los ANC extraídos por medio de una ligasa que sea capaz de ligación intramolecular de los ácidos nucleicos monocatenarios formándose círculos de ácidos nucleicos monocatenarios y amplificando los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios por amplificación circular ondulante utilizando cebadores aleatorios. Si los ANC están en formas bicatenarias, el método también incluye la etapa de desnaturalizar los ANC bicatenarios en su forma monocatenaria antes de la reacción de ligación intramolecular.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un dispositivo para recoger una fracción no celular de una muestra biológica que comprende dar la forma de círculo los ácidos nucleicos. El dispositivo comprende una membrana de filtración configurada para separar la fracción no celular de la muestra biológica a partir de células intactas, y una matriz sólida seca configurada para recoger la fracción separada no celular. La membrana de filtración y la matriz sólida están configuradas para establecer un contacto directo entre ellas. Además, la matriz sólida está desprovista de cualquier tipo de detergente.

Breve descripción de las figuras

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la invención descrita se entenderán mejor cuando la siguiente descripción detallada se lea con referencia a las figuras anexas, en las que idénticos caracteres representan partes similares en todas las figuras, en donde:

La Figura 1 representa un diagrama de flujo que ilustra una realización del método de la invención.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un dispositivo de flujo lateral para la separación y recolección de la fracción no celular de una muestra biológica.

La Figura 3 muestra una representación esquemática de una realización para preparar el dispositivo de flujo lateral para la separación y recolección de la fracción no celular de una muestra biológica.

La Figura 4 muestra una representación esquemática de un dispositivo de flujo vertical para la separación y la recolección de la fracción no celular de una muestra biológica.

La Figura 5 representa la recolección del ADN en plasma en una matriz sólida seca después de la separación lateral o vertical de la sangre entera humana.

La Figura 6 representa la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa que permite la detección de cuatro loci cromosómicos diferentes a partir del ADN del plasma (es decir, el ADN circulante extraído del plasma) separados a partir de la sangre entera por flujo lateral o vertical.

La Figura 7 ilustra una representación esquemática de una realización de una amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa de un ADN lineal bicatenario.

La Figura 8 ilustra los perfiles por tamaño del ADN circulante aislado a partir del plasma sanguíneo de individuos sanos.

La Figura 9A ilustra una amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa del ADN circulante extraído de la fracción no celular de sangre completa, usando CirLigasa® II.

La Figura 9B ilustra una amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa del ADN circulante extraído de la fracción no celular de la sangre entera, utilizando ligasa de T4 ADN.

La Figura 9C ilustra una amplificación del genoma completo con la ayuda de ligasa del ADN circulante extraído de la fracción no celular de sangre entera, utilizando ligasa de *E. coli*.

La Figura 10 ilustra la eficacia de la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa para la amplificación de ADN sensible y equilibrada de los cuatro loci CODIS diferentes.

- 5 La Figura 11 ilustra la eficacia de la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa para la amplificación de ADN sensible y equilibrada de los doce loci CODIS diferentes.

La Figura 12 ilustra las eficiencias variables de la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa en condiciones de reacción y tamponantes diferentes.

- 10 La Figura 13 ilustra la inhibición de la amplificación del ADN genómico de alto peso molecular en la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa.

La Figura 14 ilustra una reacción de amplificación con ayuda de ligasa en un solo tubo utilizando plasma/sangre de hombres y mujeres, en donde el marcador DYS14 específicamente masculino se detecta utilizando una biblioteca creada a partir de los ANC iniciales.

Descripción detallada

- 15 La siguiente descripción detallada es ejemplar y no pretende limitar la invención o los usos de la invención reivindicada. Además, no hay intención alguna de limitarse con ninguna teoría presentada en los antecedentes anteriores de la invención reivindicada o por la siguiente descripción detallada.

- 20 En la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, las formas singulares "uno", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El lenguaje de aproximación, como se usa en este documento en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se puede aplicar para modificar cualquier representación cuantitativa que podría variar permisiblemente sin dar como resultado un cambio en la función básica con la que está relacionada. En consecuencia, un valor modificado por un término tal como "aproximadamente" no se debe limitar al valor preciso especificado. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de reacción, etc., utilizados en la descripción y las reivindicaciones se deben entender modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En algunos casos, el idioma de aproximación puede corresponder a la precisión de un instrumento para medir el valor.

- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier tipo de fluido biológico obtenido de un sujeto biológico de origen eucariota. Los ejemplos no limitantes de muestras biológicas incluyen sangre entera, orina, saliva, sudor, lágrimas, fluido amniótico, leche materna, lavado nasal o fluidos de lavado broncoalveolar. En algunas realizaciones, la muestra biológica es de origen mamífero (por ejemplo, rata, ratón, vaca, perro, burro, conejillo de indias o conejo). En ciertas realizaciones, la muestra biológica es de origen humano.

- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula intacta" se refiere a células no alteradas que pueden estar presentes en una muestra biológica (es decir, un fluido biológico). Debido a que las células intactas no están alteradas, los ácidos nucleicos y/o fragmentos de ácidos nucleicos no se liberan desde el interior de una célula intacta en fracciones no celulares de la muestra biológica. Las células intactas pueden incluir células eucariotas residentes (por ejemplo, células sanguíneas en sangre entera) y/o células circulantes (por ejemplo, células tumorales circulantes en sangre entera). En algunas realizaciones, las células intactas pueden incluir otras células patogénicas (por ejemplo, células virales o bacterianas) que pueden estar presentes en la muestra biológica.

- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "fracción no celular" se refiere al componente de una muestra biológica que no contiene células intactas. Por ejemplo, la fracción no celular de la sangre entera comprende plasma y suero, que no contienen células intactas de la sangre (por ejemplo, los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas). Con respecto al tamaño del poro de la membrana de filtración utilizada para la generación de la fracción no celular, la fracción no celular puede carecer de células eucariotas, células procariotas y/o partículas virales de células.

- 45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácido nucleico circulante" o "ANC" se refiere a los ácidos nucleicos sin células que se encuentran en la fracción no celular de una muestra biológica. Los ácidos nucleicos sin células son aquellos ácidos nucleicos que no están restringidos a un compartimento celular en el interior (por ejemplo, el núcleo, las mitocondrias, etc.) de una célula biológica. El ácido nucleico circulante puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN).

- 50 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "contacto directo" se refiere a un contacto contiguo entre dos componentes. El contacto directo entre dos componentes se consigue mediante la colocación de los dos componentes de tal manera que se tocan directamente entre sí.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "ssLigasa" o "ligasa específica monocatenaria" se refiere a una ligasa que es capaz de una ligación intramolecular de los ácidos nucleicos monocatenarios.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un método para recoger y amplificar los ANC a partir de las muestras biológicas. Las concentraciones elevadas de ANC se encuentran a menudo en la fracción no celular de una muestra biológica que se recoge de pacientes con varias patologías en comparación con individuos sanos, lo que indica su potencial como biomarcadores de la enfermedad. Por ejemplo, los ácidos nucleicos circulantes derivados de tumores que se encuentran en la fracción de plasma o suero de la sangre entera se pueden utilizar para detectar, monitorear o evaluar el cáncer y los estados premalignos. Los métodos para la amplificación de los ANC en la fracción no celular de la muestra biológica, por lo tanto, pueden ayudar en la detección, diagnóstico, seguimiento, tratamiento, y/o evaluación de enfermedades, tales como las enfermedades neoplásicas, inflamación, infarto de miocardio, trastornos autoinmunes, órgano trasplantado/tejido rechazado, complicaciones asociadas al embarazo y así sucesivamente. Las enfermedades neoplásicas pueden incluir, entre otras: primer estado inicial del cáncer, estados premalignos o cáncer avanzado.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos para la separación y la recogida de la fracción no celular de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos circulantes. Después de separar y recoger la fracción no celular de las células intactas, el método incluye además las etapas de extraer los ácidos nucleicos circulantes de la fracción no celular y amplificar estos ácidos nucleicos para crear una biblioteca de ANC amplificados. El método y el dispositivo descrito en este documento proporcionan una solución simplificada e integrada para la recogida y la amplificación de los ANC. El método y el dispositivo pueden ser adecuados para su uso en un punto de recogida, y se pueden utilizar con volúmenes bajos de muestras (por ejemplo, menos de aproximadamente 150 μ L). De esta manera, los dispositivos y los métodos asociados descritos en este documento reducen el tiempo de procesamiento de la muestra y minimizan los artefactos de la muestra relacionados con la contaminación del ADN o ARN genómico, y ayudan a aumentar la sensibilidad de la amplificación y/o detección de los ANC.

En algunas realizaciones, los ANC pueden ser ácidos nucleicos circulantes derivados de un tumor. En algunas otras realizaciones, los ANC pueden ser derivados de un feto, un órgano donado después de la implantación, una célula trasplantada, un tejido trasplantado, o un estado enfermo. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos circulantes comprenden ADN circulante o ARN circulante. Los ADN circulantes pueden incluir, entre otros, un ADN derivado de un tumor, un ADN derivado de un feto, un ADN derivado de un órgano donado, un ADN derivado de células de un trasplante, un ADN derivado de un tejido trasplantado o una combinación de los mismos.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para la amplificación de los ácidos nucleicos circulantes que están presentes en la fracción no celular de una muestra biológica. El método comprende las etapas de filtrar la muestra biológica para separar la fracción no celular de las células intactas, recoger la fracción no celular separada sobre una matriz sólida seca y extraer los ANC de la fracción recogida, no celular. El método incluye además las etapas de poner en circularización los ácidos nucleicos circulantes extraídos mediante el uso de una ligasa específica monocatenaria para formar los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios y amplificar los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios mediante la amplificación circular ondulante cebada aleatoriamente para formar un producto de ANC amplificado. En algunas realizaciones, se proporciona un método para la amplificación y detección de un ADN circulante derivado de un tumor en la fracción no celular de una muestra biológica.

La Figura 1 representa un diagrama de flujo que ilustra una realización de la invención. La muestra biológica se aplica a un dispositivo que comprende una membrana de filtración configurada para separar la fracción no celular de las células intactas, y una matriz sólida seca configurada para recoger la fracción no celular separada. Como se muestra en la Figura 1, la muestra biológica se aplica a la membrana de filtración (102). Después de la filtración, las células intactas de la muestra biológica se retienen en el lado corriente arriba/superficie de la membrana de filtración y la fracción no celular se recoge sobre una matriz sólida seca (104), que puede estar ubicada ya sea en el lado corriente abajo (en un dispositivo de flujo lateral) o en la superficie corriente abajo (en un dispositivo de flujo vertical). La matriz sólida seca que contiene la fracción no celular puede entonces ser almacenada (106) o se puede usar directamente para la extracción de los ácidos nucleicos circulantes (108). Los ácidos nucleicos circulantes extraídos son posteriormente puestos en circulación por una ligasa que es capaz de ligación intramolecular de los ácidos nucleicos monocatenarios para formar ácidos nucleicos circulantes monocatenarios (110). En algunas realizaciones, el método comprende además secar la fracción no celular recogida hasta un estado sustancialmente seco antes de la extracción. Si los ANC están en forma bicatenaria, la desnaturalización previa de los ácidos nucleicos circulantes puede ser necesaria antes de la reacción de ligación. Los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios posteriormente se amplifican mediante una amplificación circular ondulante cebada aleatoriamente para formar un producto de ANC amplificado.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de una realización de un dispositivo que puede ser utilizado para la separación de la fracción no celular de una muestra biológica. La membrana de filtración (202) tiene una zona de aplicación de la muestra (210) y una zona de transferencia (212). La membrana de filtración está en contacto directo con una matriz sólida (204) a través de la zona de transferencia (212). La etapa de filtración incluye proporcionar una muestra biológica en la zona de aplicación de la muestra de la membrana de filtración y hacer pasar la muestra biológica a través de la membrana de filtración. La membrana de filtración tiene una pluralidad de poros. Una vez que la muestra biológica pasa a través de la membrana de filtración, las células intactas residentes

dentro de la muestra biológica son retenidas por la membrana de filtración, en su mayor parte en la misma zona de aplicación de la muestra (210), y la fracción no celular se pasa a través de los poros para alcanzar la zona de transferencia (212) y se transfiere y se recoge sobre la matriz sólida seca. En algunas realizaciones, se puede utilizar una membrana de filtración que tiene un tamaño de poro en el intervalo de aproximadamente 0,01 micras a aproximadamente 5 micras. En algunas otras realizaciones, el tamaño del poro de la membrana de filtración puede variar entre aproximadamente 0,22 micras y aproximadamente 2 micras. En una realización ejemplar, la membrana de filtración tiene un tamaño de poro entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 2 micras. Cuando se utiliza una membrana de filtración de tamaño de poro de 1 micrómetro, cualquier otra célula eucariota circulante y/o células patógenas que tienen diámetros mayores a 1 micra será retenida en la membrana de filtración y, por lo tanto, no alcanzará la matriz sólida seca durante la filtración.

En algunas realizaciones, la fracción no celular se puede filtrar a partir de la muestra biológica en el mismo punto de recogida. La filtración se puede realizar sin tipo de tratamiento previo alguno de la muestra biológica. Además, la filtración se puede realizar en ausencia de cualquier reactivo estabilizador. Después de la filtración, la fracción no celular separada puede ser recogida en una matriz sólida seca por medio de una interacción física. La fracción no celular puede ser recogida en una matriz sólida seca por medio de la adsorción o la absorción.

La membrana de filtración puede prepararse a partir de diversos materiales. Los materiales usados para formar la membrana de filtración pueden ser materiales naturales, sintéticos o materiales de origen natural que han sido modificados sintéticamente. Los materiales adecuados que se pueden utilizar para preparar la membrana de filtración incluyen, entre otros, fibra de vidrio, fibra de vidrio unida a alcohol polivinílico, polietersulfona, polipropileno, fluoruro de polivinilideno, policarbonato, acetato de celulosa, nitrocelulosa, poli(tetrafluoretileno) hidrófilo expandido, óxido de aluminio anodizado, policarbonato Track-Etch, nanofibras de electrohilado o polivinilpirrolidona. En un ejemplo, la membrana de filtración está formada por filtros de fibra de vidrio unida a alcohol polivinílico (membrana MF1©, GE Healthcare). En otro ejemplo, la membrana de filtración está formada por una polietersulfona asimétrica (Vivid©, Pall Corporation). En algunas realizaciones, la membrana de filtración se puede conformar a partir de una combinación de dos o más polímeros. Por ejemplo, la membrana de filtración puede estar conformada por una combinación de polietersulfona y polivinilpirrolidona (Primecare©, iPOC).

La fracción no celular, que se recoge en la matriz sólida seca durante la filtración, se puede secar hasta un estado sustancialmente seco y almacenar para un análisis posterior. La expresión "estado sustancialmente seco", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones en las que la muestra seca contiene menos de aproximadamente 10% (peso/peso) de contenido de agua. En algunas realizaciones, la muestra se puede secar de forma que contenga menos de aproximadamente 5% de agua. En algunas otras realizaciones, la muestra se puede secar de forma que contenga menos de aproximadamente 2% de agua. De esta manera, los ANC que pueden estar presentes en la fracción no celular de una muestra biológica se pueden almacenar en una forma seca que sea adecuada para su posterior análisis. La fracción no celular seca se puede almacenar durante largos períodos, por ejemplo, durante al menos 24 horas, durante al menos 7 días, durante al menos 30 días, durante al menos 90 días, durante al menos 180 días, durante al menos un año o durante al menos 10 años. En una realización, la fracción no celular se almacena en la matriz sólida seca durante al menos 30 minutos. Típicamente, las muestras se almacenan a temperaturas que van desde -80°C a 40°C. Además, las muestras se pueden almacenar opcionalmente en condiciones secas o desecadas o en atmósferas inertes. El secado se puede llevar a cabo por secado con aire bajo condiciones ambientales o por evaporación al vacío. En algunas realizaciones, la fracción no celular se seca en condiciones ambientales por evaporación normal y se mantiene en un ambiente de baja humedad. La eliminación de agua de las fracciones no celulares recogidas ayuda en la estabilización de los ácidos nucleicos circulantes que están presentes en la fracción no celular.

Las matrices sólidas secas adecuadas para este propósito incluyen, entre otras, los materiales naturales, materiales sintéticos o los materiales naturales que han sido modificados sintéticamente. Los materiales adecuados que pueden actuar como matrices sólidas secas incluyen, entre otros, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, fibra de cuarzo, polímeros hidrófilos, politetrafluoroetileno, fibra de vidrio y cerámicas porosas. Los polímeros hidrófilos pueden ser polímeros de poliéster, poliamida o hidratos de carbono. En algunas realizaciones, la matriz sólida seca se compone de celulosa. La matriz sólida seca de celulosa carece de cualquier detergente. En algunas realizaciones, la matriz sólida seca de celulosa no se puede impregnar con ningún reactivo. En otras realizaciones, la matriz sólida seca de celulosa se puede impregnar con una sal caotrópica. Los ejemplos de sales caotrópicas incluyen, entre otras, el tiocianato de guanidina, cloruro de guanidina, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, tiocianato de sodio y yoduro de sodio. En algunas realizaciones, la matriz sólida seca de celulosa es FTATM Elute (GE Healthcare).

Después de la recogida de la fracción no celular sobre la matriz sólida seca, se extraen los ADN a partir de esta fracción recogida no celular. La extracción se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de los métodos de extracción de ácidos nucleicos convencionales. Los ejemplos de métodos de extracción que se pueden usar incluyen, entre otros, electroelución, extracción con gelatina, sílice o extracción con perlas de vidrio, extracción de la solución de guanidina-tiocianato-fenol, extracción con ácido tiocianato de guanidinio, centrifugación a través de yoduro de sodio o con gradientes similares o extracción con fenol-cloroformo. La etapa de extracción ayuda a eliminar impurezas, tales como las proteínas, y concentra los ácidos nucleicos circulantes. Los ácidos nucleicos circulantes extraídos

pueden ser inspeccionados utilizando métodos tales como la electroforesis en gel de agarosa, espectrofotometría, fluorometría o cromatografía líquida.

Los ANC extraídos se convierten después en círculos de ácidos nucleicos monocatenarios a través de una reacción de ligación intramolecular después de la extracción. Los ANC pueden estar en forma monocatenaria o bicatenaria. Además, los ANC pueden estar a menudo altamente fragmentados. Los ANC bicatenarios se desnaturalizan en una forma monocatenaria antes de la reacción de ligación intramolecular. Esta desnaturalización de los ácidos nucleicos bicatenarios de forma monocatenaria se puede lograr mediante el uso de cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico bicatenario puede estar térmicamente desnaturalizado, químicamente desnaturalizado o igualmente térmica y químicamente desnaturalizados. El ácido nucleico bicatenario se puede desnaturalizar químicamente usando un agente desnaturalizante (por ejemplo, glicerol, etilenglicol, formamida, o una combinación de estos) que reduzca la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario. El agente desnaturalizante puede reducir la temperatura de fusión entre 5°C y 6°C por cada 10% (v/v) del desnaturalizante agregado a la mezcla de reacción. El agente desnaturalizante o la combinación de agentes desnaturalizantes (por ejemplo, 10% de glicerol y 6-7% de etilenglicol) pueden comprender 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, o 25% de la mezcla de reacción (v/v). Por ejemplo, se pueden incluir sales que reduzcan la rigurosidad de la hibridación en los tampones de reacción a concentraciones bajas para desnaturalizar químicamente los ADN bicatenarios circulantes a bajas temperaturas. El ADN bicatenario circulante también puede ser térmicamente desnaturalizado por calentamiento a 95°C para formar un ADN monocatenario (ssDNA, por sus siglas en inglés). Después de la etapa de desnaturalización, los ácidos nucleicos monocatenarios generados pueden ser tratados con una ligasa específica monocatenaria que sea capaz de una ligación intramolecular de sustratos de ácido nucleico monocatenario para formar círculos de ácidos nucleicos monocatenarios.

La ligación intramolecular de los ácidos nucleicos circulantes monocatenarios se puede realizar en presencia o no de una plantilla mediante el uso de cualquiera de los métodos convencionales utilizados para la ligación intramolecular de los ácidos nucleicos monocatenarios. Por ejemplo, la conversión de las moléculas de ADN monocatenario para el círculos de ADN monocatenario se lleva a cabo convencionalmente a través de una reacción de ligación intramolecular dependiente de la plantilla usando una enzima de ligación, tal como la ligasa T4 ARN. Sin embargo, la ligación intramolecular dependiente de la plantilla de ADN monocatenario o ARN monocatenario se ha satisfecho solamente con un éxito limitado, particularmente cuando la circularización de las moléculas de ADN monocatenario se realiza en una población de moléculas de ADN monocatenario de secuencia y/o tamaño desconocido. A pesar de que la ligasa I T4RNA en bacteriófagos muestra una actividad de ligación intramolecular independiente de la plantilla, esta actividad es demasiado baja e ineficiente para un uso práctico en la generación de las moléculas de ADN monocatenario circular a partir de moléculas de ADN monocatenario. En algunas realizaciones, la ligación intramolecular de los ácidos nucleicos circulantes monocatenarios extraídos se realiza en ausencia de cualquier tipo de plantilla. Por ejemplo, las secuencias de ADN monocatenario que son incluso más cortas que 500 nucleótidos se pueden hacer dar la forma de círculo utilizando una ligación intramolecular independiente de la plantilla. Además, no se necesita ningún conocimiento previo de la secuencia diana para crear los círculos de ADN cuando la ligación del ADN monocatenario (ssDNA) se realiza de una manera independiente de la plantilla.

En algunas realizaciones, la conversión de los ácidos nucleicos circulantes monocatenarios lineales en círculos de ácidos nucleicos monocatenarios se realiza con una ARN ligasa termoestable que tiene una buena actividad de ligación intramolecular de ADN monocatenario independiente de plantilla para el ADN monocatenario lineal y/o los sustratos de ARN monocatenario que tienen grupos 5' fosforilo y 3' hidroxilo. Las ligasas adecuadas que pueden ser utilizadas para la ligación intramolecular independiente de plantilla de los ácidos nucleicos circulantes monocatenarios extraídos incluyen, entre otros, TS2126 ARN ligasa, ADN T4 ligasa, ADN T3 ligasa o ligasa de *E. coli*. Por ejemplo, la ARN TS2126 ligasa deriva del bacteriófago Thermus TS2126 que infecta la bacteria termófila, *Theruts scotoductus*, se puede utilizar para la circularización independiente de plantilla del ADN monocatenario circulante lineal para generar el ADN circular monocatenario. La TS2126 ARN ligasa es más termoestable (estable hasta aproximadamente 75°C) que muchas de las ARN ligasas mesófilas tales como la ARN T4 ligasa. Como consecuencia, la TS2126 ARN ligasa se puede utilizar a temperaturas más altas, que reducen aún más las estructuras secundarias indeseables del ADN monocatenario. El tampón HEPES con un pH de 8,0 se puede utilizar para aumentar la eficiencia de la ligación intramolecular mediada por ligasa TS2126 ARN. La circularización del ADN circulante monocatenario extraído también se puede conseguir usando una ligasa que no sea la TS2126 ARN ligasa o utilizando cualquier otra enzima con actividad de unión al ADN tal como la topoisomerasa. En algunas realizaciones, la circularización de la molécula de ADN monocatenario se puede lograr mediante una ARN ligasa 1 derivada de la arqueobacteria termófila, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth1) que tiene una actividad de ligasa independiente de plantilla alta en moléculas de ADN lineales, monocatenarias, fragmentadas circularizantes.

Los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios se pueden amplificar posteriormente en condiciones isotérmicas utilizando métodos de amplificación de círculos ondulantes (RCA, por sus siglas en inglés). La amplificación de los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios se puede realizar en el mismo recipiente de reacción en el cual se realice la ligación intramolecular. El aislamiento o la purificación de los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios y/o la eliminación de la ligasa pueden no ser necesarios antes de la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, todo el proceso de ligación del ácido nucleico monocatenario y la amplificación se puede llevar a cabo en un tubo único sin etapas de purificación o aislamiento intermedias.

En algunas realizaciones, el método comprende además detectar los ácidos nucleicos del producto de ácido nucleico circulante amplificado. La detección de los ácidos nucleicos a partir del producto de ácido nucleico circulante amplificado se realiza por métodos conocidos en la técnica. Varios métodos de detección del producto amplificado incluyen, entre otros, PCR, RT-PCR, qPCR, RT-qPCR, los métodos a base de enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa, métodos de detección por ELISA, electroquimioluminiscencia, cromatografía líquida de alta resolución, hibridación transferencia Southern, hibridación transferencia Northern, o métodos de transferencia inversa de puntos. En una realización, la detección se realiza por PCR cuantitativa usando cebadores específicos que amplifican una diana específica dentro del producto de amplificación del ácido nucleico circulante. La detección se puede realizar para identificar la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de ácido nucleico circulante específica en el producto de ácido nucleico amplificado circulante.

Los métodos de amplificación del genoma completo descritos en este documento mejoran la sensibilidad de la amplificación, reducen la disminución de la secuencia y permiten una amplificación más equilibrada. Los métodos descritos son ventajosos especialmente cuando están disponibles cantidades limitadas de muestra biológica. En algunas realizaciones, una fracción no celular se aísla a partir de un volumen total de muestra biológica de aproximadamente 10 µL a aproximadamente 500 µL. Además, ambas reacciones de circularización y amplificación se pueden realizar en un solo recipiente de reacción sin purificación intermedia alguna o etapas de aislamiento reduciendo así las posibilidades de contaminación y simplificando el flujo de trabajo en la amplificación.

En algunas realizaciones, se proporciona la amplificación del genoma completo de los ADN fragmentados circulantes a través de una amplificación de desplazamiento múltiple (MDA). Los ADN circulantes, por su origen, están a menudo altamente fragmentados. Además, la cantidad de ADN circulante en la fracción no celular de una muestra biológica es generalmente muy baja. Los métodos convencionales de MDA, cuando se realizan en ADN fragmentado lineal, dan como resultado una menor velocidad de amplificación, una disminución de secuencia significativa y llevan a una amplificación de la secuencia altamente sesgada. Para superar estas limitaciones, después de la extracción de los ADN circulantes desde la matriz sólida seca, los ADN circulantes bicatenarios fragmentados se convierten primero en su forma monocatenaria. Los ADN monocatenarios circulantes se convierten después en círculos de ADN monocatenarios a través de una reacción de ligación intramolecular independiente de la plantilla, eliminando de este modo los extremos problemáticos del ADN. Después de la circularización del ADN circulante monocatenario fragmentado, se lleva a cabo MDA en el ADN circularizado.

La reacción de los MDA de los ADN circulantes extraídos se puede realizar en condiciones isotérmicas a través del uso de métodos de amplificación en círculos ondulantes (RCA, por sus siglas en inglés). Para la amplificación de los círculos de ADN monocatenario, se pueden agregar reactivos de amplificación que incluyen una ADN polimerasa, cebadores y dNTP al mismo recipiente de reacción donde se realiza la ligación para producir una mezcla de reacción de amplificación para iniciar una reacción RCA. La mezcla de la reacción de amplificación puede incluir además reactivos tales como proteínas de unión de ADN monocatenario y/o tampones de reacción de amplificación adecuados. Los RCA se pueden realizar mediante el uso de cualquiera de las polimerasas de ADN con hebra desplazada que son conocidos en la técnica tales como una ADN Phi29 polimerasa. Los RCA se pueden realizar usando kits de amplificación de RCA comercialmente disponibles tales como el kit TempliPhi® RCA (GE Healthcare). La amplificación de círculos ondulantes TempliPhi® utiliza cebadores aleatorios que contienen ácidos nucleicos bloqueados, que proporcionan mayor sensibilidad y equilibrio de amplificación. En algunas realizaciones, se utilizan cebadores aleatorios para la reacción con métodos RCA. Pueden ser utilizadas secuencias de los cebadores que comprenden uno o más análogos de nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos LNA). En algunas realizaciones, se utilizan cebadores resistentes a nucleasa (por ejemplo, secuencias de cebadores que comprenden grupos fosforotioato en las posiciones apropiadas) para la reacción de amplificación (por ejemplo, NNNN*N*N, donde *N representa un nucleótido aleatorio con un enlace de fosforotioato). En algunas realizaciones, la amplificación del círculo ondulante se puede llevar a cabo poniendo en contacto los círculos de ADN monocatenario con una disolución cebadora que comprende una mezcla de cebadores aleatorios para formar un complejo de plantilla de ADN-cebador; poner en contacto el complejo de plantilla de ADN-cebador con una ADN polimerasa y trifosfatos de desoxirribonucleósido; y amplificar la plantilla de ADN. Debido a que la circularización independiente de plantilla de un ADN monocatenario se puede obtener en secuencias cortas incluso a bajas concentraciones, se puede lograr una amplificación de ADN más equilibrada con cinéticas más rápidas y mejor cobertura de secuencia cuando se utiliza la amplificación de genoma completo con ayuda de ligasa para la amplificación de ADN circulantes altamente fragmentados (por ejemplo, ADN circulantes que están presentes en la sangre entera).

La Figura 7 muestra una representación esquemática de una realización de la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa de un ADN bicatenario circulante fragmentado. La longitud de persistencia del ADN bicatenario es mucho mayor (~150 pb) que el ADN monocatenario, y su rigidez innata hace que la circularización de los fragmentos de menos de 500 pb sea altamente ineficiente. Además, con moléculas pequeñas de ADN bicatenario fragmentado de un intervalo de aproximadamente 250 pb, la circularización es ineficaz a menos que los extremos estén en una alineación adecuada (~10,5 pb/vuelta). Por el contrario, la longitud de persistencia de la circularización del ADN monocatenario fragmentado es muy pequeña, aproximadamente 15 nucleótidos, en comparación con el ADN bicatenario fragmentado. Como se muestra en la Figura 7, en la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa, el ADN bicatenario circulante fragmentado se convierte primeramente en círculos de ADN monocatenario. Esto se puede lograr mediante la incubación del ADN bicatenario circulante fragmentado a 95°C durante un periodo suficiente para desnaturalizar el ADN bicatenario en cadenas sencillas. El ADN monocatenario fragmentado

circulante se trata con una ADN o ARN ligasa que sea capaz de ligación intramolecular independiente de la plantilla de los sustratos de ADN circulantes monocatenarios para generar círculos de ADN monocatenario. Los reactivos de amplificación, incluyendo la ADN polimerasa, los cebadores aleatorios, y los dNTP se agregan para iniciar una reacción de RCA en los círculos de ADN monocatenario. Esta amplificación de RCA del genoma completo con ayuda de ligasa produce grandes cantidades de ADN con una menor disminución de secuencia y sesgo de amplificación en comparación con los métodos convencionales de amplificación del genoma completo. Por lo tanto, la misma se puede utilizar para amplificar e incluso detectar ADN circulantes altamente circulantes. En algunas realizaciones, el proceso completo de generación de los círculos de ADN monocatenario y su amplificación subsecuente por RCA se realiza en un solo tubo sin ninguna etapa de purificación intermedia.

Los métodos de amplificación del genoma completo por ligación proporcionados en el presente documento, que comprenden una ligación previa de fragmentos de ADN monocatenario circulante a los círculos de ADN, seguido de la amplificación circular ondulante, proporciona una amplificación preferencial de ANC fragmentados respecto al ADN genómico de alto peso molecular. Por ejemplo, las preparaciones de plasma que comprenden ANC a menudo pueden estar contaminadas con ADN genómico que se libera de las células de sangre durante el proceso de purificación. Los métodos convencionales de amplificación del genoma completo a través de MDA amplifican tanto el ADN circulante como el ADN genómico. Por el contrario, cuando las moléculas de ANC fragmentadas se sometieron a circularización usando la ARN TS2126 ligasa seguido por la amplificación mediante RCA que utiliza un ADN Phi29 polimerasa, los ADN circulantes se amplificaron preferiblemente respecto al ADN genómico de alto peso molecular. Tal amplificación preferencial del ADN circulante fragmentado respecto al ADN genómico es particularmente adecuada para aplicaciones de diagnóstico ya que el ADN relevante para el diagnóstico puede ser amplificado preferiblemente para los análisis posteriores (Figura 13). Además, la amplificación del genoma completo con ligasa permite una amplificación más sólida del ADN fragmentado en comparación con la amplificación del genoma completo convencional con MDA.

En algunas realizaciones, la sensibilidad de la amplificación del ADN circulante y la detección en la fracción no celular de una muestra biológica se puede incrementar aún más mediante la fosforilación de los ADN circulantes extraídos con una polinucleótido quinasa (PNK) antes de la etapa de ligación del ADN monocatenario y RCA. La ligación intramolecular del ADN no es factible a menos que la plantilla de ADN monocatenario tenga un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo 3'. Una variedad de condiciones (por ejemplo, fragmentación enzimática de la DNasa II, y actividad de fosfatasa en la sangre) puede conducir a la generación de ADN circulantes con secuencias de ADN no ligables que tienen o bien grupos hidroxilo 5' o bien fosfato 3', o ambos. El tratamiento PNK convierte estas secuencias de ADN no ligables en secuencias de ADN ligables fosforilando los extremos 5' y desfosforilando los extremos 3'. Esto mejora la diversidad de la biblioteca del ANC amplificado del círculo ondulante. Al incorporar la etapa PNK en el flujo de trabajo, los métodos de amplificación del genoma completo con ligasa presentados en el presente documento podrían detectar los ADN circulantes de varones en sangre entera de mujeres con máximos en niveles del 1% (repeticiones por triplicado, Figura 14).

En una realización, se proporciona un método para la amplificación y detección de los ácidos nucleicos circulantes que están presentes en la sangre entera. La sangre entera comprende una fracción celular (es decir, glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas) y una fracción no celular (por ejemplo, plasma o suero). El ADN circulante se amplifica a partir de la fracción no celular de la sangre completa (por ejemplo, plasma o suero). En una realización preferida, el plasma o el suero se separan de un volumen de punción en el dedo de la sangre. El método comprende las etapas de recoger la fracción no celular de la sangre entera, extraer los ADN circulantes (principalmente presentados en su forma bicatenaria nativa) de la fracción no celular, desnaturalizar los ADN circulantes bicatenarios para generar ADN monocatenario, realizar la circularización de los ADN monocatenarios circulantes en círculos de ADN monocatenarios generados, y amplificar los círculos de ADN monocatenario a través de la amplificación en círculos ondulantes para formar un producto de ácido nucleico circulante amplificado. Cuando se usa el filtrado de la sangre entera utilizando el dispositivo descrito en el presente documento, el plasma o el suero pasan a través de los poros de la membrana de filtración y se recogen en una matriz sólida seca. Las células sanguíneas intactas son retenidas por la membrana de filtración. El plasma o el suero se pueden separar de la muestra de sangre entera por filtración en ausencia de un anticoagulante. Por lo tanto, no se requieren etapas adicionales para mantener la integridad de la muestra de sangre entera antes de la filtración. En algunas realizaciones, la muestra biológica se puede tratar previamente con reactivos como anticoagulantes antes de la filtración. La contaminación genómica de células de la sangre intactas puede ser minimizada mediante el filtrado de la sangre entera en el punto de recogida. En una realización, el plasma o el suero separados que contienen los ANC se adsorbe sobre una matriz sólida seca por capilaridad pasiva. En una realización, los ADN que circulan se extraen del plasma o el suero recogidos previamente en una matriz sólida utilizando yoduro de sodio y alcohol (DNA Extractor SP®, Wako Chemical). En un ejemplo, el plasma se separa a partir de menos de 150 µL de sangre entera.

A menudo no es posible dar forma de círculo al ADN bicatenario con una longitud de secuencia menor a 150 bp, y es muy difícil dar forma de círculo al ADN bicatenario hasta que el ADN es mayor a 200 bp. Por el contrario, las moléculas de ADN monocatenario lineal que tienen una longitud de secuencia de 15 nucleótidos o más se les da forma de círculo muy eficientemente mediante una ligasa adecuada, siempre y cuando el extremo 5' esté fosforilado y el extremo 3' esté hidroxilado. La circularización del ADN monocatenario para generar el círculo del ADN monocatenario se puede lograr mediante el uso de una ligasa que sea capaz de una ligación intramolecular independiente de la plantilla del ADN monocatenario. En algunas realizaciones, la circularización de las moléculas

de ADN monocatenario se realiza tratando el ADN monocatenario lineal con una ARN ligasa, tal como la CircLigasa II©.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para el procesamiento de toda la sangre en un punto de recogida mismo para recoger el plasma o el suero. El método comprende las etapas de filtrar la sangre entera para separar el plasma o el suero en el punto de recogida de la muestra recoger el plasma o el suero separado en una matriz sólida seca, en donde la matriz sólida está desprovista de cualquier tipo de detergente y secar el plasma o el suero recogidos en la matriz sólida. En algunas realizaciones, la filtración se realiza mediante el uso de la membrana MF1© y la recogida se realiza utilizando una matriz sólida a base de celulosa colocada lateralmente respecto a la membrana MF1©. En otras realizaciones, las membranas Vivid© o Primacare© y una matriz sólida de celulosa se colocan verticalmente. En un ejemplo, ya sea la sangre entera o la membrana de filtración no se trata previamente con ningún anticoagulante. En otro ejemplo, la sangre y/o la membrana de filtración se tratan previamente con un anticoagulante. En algunas realizaciones, una matriz de celulosa que se impregna con una sal caotrópica puede ser utilizada para recoger el plasma o el suero en los puntos de recogida. Las sales caotrópicas adecuadas que se pueden utilizar incluyen, entre otras, tiocianato de guanidina, tiocianato de sodio, tiocianato de potasio, o clorhidrato de guanidina. La matriz sólida que contiene el plasma o el suero secos se puede almacenar durante períodos más largos, y los ácidos nucleicos circulantes pueden ser extraídos, amplificados y detectados a partir de este plasma seco o suero en un punto posterior de tiempo.

En algunos aspectos, se proporciona un método para detectar los ácidos nucleicos circulantes a partir de una muestra seca de plasma o suero. El método comprende las etapas de extraer los ácidos nucleicos circulantes a partir de un plasma seco o muestra de suero, realizando una amplificación del genoma completo de los ácidos nucleicos extraídos para generar un producto de ácido nucleico circulante amplificado y después detectar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia de ácido nucleico circulante específica dentro del producto de ácido nucleico circulante amplificado. La amplificación del genoma entero de los ácidos nucleicos circulantes extraídos se puede lograr primeramente por la circularización de los ácidos nucleicos circulantes extraídos por una ligasa específica monocatenaria para formar círculos de ácido nucleico monocatenario y amplificar los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios mediante la amplificación circular ondulante cebada aleatoriamente para formar el producto de ácidos nucleicos amplificados circulantes. La detección de las secuencias del ácido nucleico circulante específico en la biblioteca amplificada se puede conseguir mediante cualquiera de las tecnologías de detección de ácidos nucleicos convencionales. El método puede incluir además la etapa de desnaturalizar los ANC bicatenarios en su forma monocatenaria antes de la reacción de ligación intramolecular por una ligasa monocatenaria específica.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un dispositivo para recoger la fracción no celular de una muestra biológica, que contiene los ácidos nucleicos circulantes. El dispositivo comprende una membrana de filtración configurada para separar la fracción no celular de la muestra biológica a partir de células intactas, y una matriz sólida seca configurada para recoger la fracción no celular separada. La matriz sólida está desprovista de cualquier detergente y está en contacto directo con la membrana de filtración. El dispositivo puede ser un dispositivo de flujo lateral o un dispositivo de flujo vertical.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un dispositivo de flujo lateral (200) como se describe. El dispositivo de flujo lateral contiene una membrana de filtración (202) y una matriz sólida seca (204). La membrana de filtración y la matriz sólida seca están colocadas lateralmente de tal manera que la fracción no celular de la muestra biológica pase a través de la membrana de filtración a la matriz sólida en una dirección lateral. La membrana de filtración tiene una zona de aplicación de la muestra (210) y una zona de transferencia (212). La membrana de filtración está en contacto directo con la matriz sólida a través de la zona de transferencia. Esencialmente, la zona de transferencia de la membrana de filtración es la parte de la membrana de filtración que toca la matriz sólida seca, cuando la membrana de filtración está en contacto directo con la matriz sólida. La zona de aplicación de la muestra es utilizada para la recepción de la muestra biológica y la zona de transferencia se utiliza para suministrar la fracción no celular de la muestra biológica a la matriz sólida seca. En algunas realizaciones, la membrana de filtración y la matriz sólida seca están colocadas de manera que se pueden superponer parcialmente entre sí. En otras realizaciones, la membrana de filtración y la matriz sólida seca se disponen de manera que no puedan superponerse entre sí, aunque aún la muestra biológica pase a través de la membrana de filtración a la matriz sólida en la dirección lateral. En tal caso, la matriz sólida seca se coloca después de la membrana de filtración, tocando la membrana de filtración, pero sin superponerse. En algunas realizaciones, la membrana de filtración está colocada en un primer soporte sólido (206) y la matriz sólida seca está colocada en un segundo soporte sólido (208). En algunas realizaciones, el primer soporte sólido y el segundo soporte sólido se colocan frente a frente entre sí. En otras realizaciones, el primer soporte sólido y el segundo soporte sólido pueden estar colocados uno junto al otro. En algunas realizaciones, la membrana de filtración y la matriz sólida seca se colocan lateralmente sobre un soporte sólido (206). En algunas realizaciones, un segundo soporte sólido (208) se incluye sobre la matriz sólida seca para intercalar la matriz sólida seca y la membrana de filtración y establecer una zona de transferencia efectiva, por ejemplo, como en la Figura 2.

El primer soporte sólido puede estar conectado al segundo soporte sólido a través de un medio para establecer un contacto directo de la membrana de filtración con la matriz sólida seca. Los medios para establecer el contacto directo pueden ser una bisagra, sangría plegable o una conexión diferentemente flexible. En algunas realizaciones, el dispositivo de flujo lateral se puede configurar por un proceso (300) como se muestra en la Figura 3. El primer

soporte sólido (306) y el segundo soporte sólido (308) están conectados entre sí a través de una bisagra plegable (310). El primer soporte sólido tiene una membrana de filtración (302) colocada en la misma y el segundo soporte sólido tiene una matriz sólida seca (304) colocada en la misma. La membrana de filtración puede ser puesta para que se produzca un contacto directo con la matriz sólida seca por plegado de la bisagra tal que la membrana de filtración y la matriz sólida seca estén superpuestas entre sí parcialmente. En una realización, el dispositivo de flujo lateral comprende una membrana de filtración MF1® y una matriz sólida seca de celulosa. En realizaciones en las que se recoge el plasma/suero de la sangre total, se aplica sangre entera y se pasa a través de la membrana de filtración, y el plasma o el suero no celular se recogen o absorben en la matriz sólida seca.

En algunas realizaciones, el dispositivo puede ser un dispositivo de flujo vertical. Una representación esquemática del dispositivo de flujo vertical (400) se ilustra en la Figura 4. El dispositivo (400) contiene la membrana de filtración (402) y la matriz sólida seca (404), en la cual la membrana de filtración está colocada en la matriz sólida seca. La membrana de filtración está en contacto directo con la matriz sólida. La membrana de filtración tiene una zona de aplicación de muestra (406) y una zona de transferencia (408). La zona de aplicación de muestra se utiliza para la recepción de la muestra biológica y la zona de transferencia se utiliza para la administración de una fracción no celular filtrada de la muestra biológica en la matriz sólida seca. La zona de transferencia de la membrana de filtración se define por una zona que está en contacto con la matriz sólida seca. Como se muestra, la membrana de filtración y la matriz sólida seca se colocan de tal manera que la fracción no celular de la muestra biológica pueda pasar a través de la membrana de filtración a la matriz sólida en una dirección vertical. En algunas realizaciones, la matriz sólida seca está colocada en el tercer soporte sólido (410). En una realización, el dispositivo de flujo vertical comprende una membrana de filtración Vivid® o Primecare® y una matriz sólida seca de celulosa. En las realizaciones en las que se recoge plasma/suero de la sangre entera, se coloca la sangre entera y se pasa a través de la membrana de filtración, y se recoge o se absorbe el plasma no celular o el suero en la matriz sólida seca.

Como se describió anteriormente, un primer soporte sólido puede soportar la membrana de filtración y un segundo y tercer soporte sólido puede soportar la matriz sólida seca. El soporte sólido puede estar colocado directamente adyacente a la membrana de filtración o la membrana de matriz sólida seca como se muestra en la Figura 2, la Figura 3 o la Figura 4. En algunas realizaciones, una o más capas intermedias pueden estar colocadas entre el soporte sólido y la membrana de filtración y/o la matriz sólida seca. El soporte sólido se puede preparar a partir de cualquier material que sea capaz de soportar la membrana de filtración y/o la matriz sólida seca. El soporte puede estar formado de un material que sea transmisible a la luz, tales como materiales transparentes u ópticamente difusos (por ejemplo, translúcidos). Puede ser deseable que el soporte sólido sea impermeable a los líquidos de modo que el fluido que fluye a través de la membrana o matriz sólida no se escape a través del soporte sólido. Ejemplos de materiales adecuados para el soporte sólido incluyen, entre otros, vidrio, materiales poliméricos tales como poliestireno, polipropileno, poliéster, polibutadieno, policloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, epóxidos, metacrilatos o polimelamina. Para proporcionar un soporte estructural suficiente para la membrana o matriz sólida, se selecciona generalmente el soporte sólido para que tenga un cierto espesor mínimo. Por ejemplo, el soporte sólido puede tener un espesor que varíe entre aproximadamente 1/16 pulgadas (0,001 m) y aproximadamente ¼ pulgadas (0,006 m). En una realización, el soporte sólido es de policarbonato (Clear Lexan®) que tiene un espesor de aproximadamente 0,10 pulgadas (0,002 m).

Pueden precipitar detergentes de la disolución mientras se usan métodos de precipitación con ácidos nucleicos descritos anteriormente y, por lo tanto, estos interferirían con el método de preparación de los ácidos nucleicos y su análisis. Por lo tanto, la matriz sólida seca del dispositivo descrito en el presente documento está desprovista de cualquier tipo de detergente, tal como dodecilsulfato de sodio (SDS), SLS (lauril), alquil aril sulfonatos, sulfatos de alcoholes de cadena larga, sulfatos de olefinas, sulfosuccinatos, ésteres de fosfato, 2-etilhexilsulfato de sodio, sulfato de polivinilo, poliácido, polifosfato, poliácido de sodio o polivinil-sulfato de sodio. En algunas realizaciones, la matriz sólida seca puede estar impregnada con una sal caotrópica.

En algunas realizaciones, el dispositivo está diseñado de tal manera que la matriz sólida seca sea muy adecuada para un análisis directo posterior (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos) sin ningún procesamiento adicional tal como la extracción o punción. En particular, la matriz sólida seca del dispositivo tiene una dimensión que la hace adecuada para ajustarse completamente en los recipientes estándar de extracción de laboratorio (por ejemplo, tubo de microcentrifuga, tubos de centrifuga). En una realización, el ancho dimensional de la matriz sólida seca es de hasta aproximadamente 8 milímetros para que se ajuste completamente en el interior de un recipiente de extracción. Tal diseño de dispositivo ayuda a la eliminación de la necesidad de extracción de muestras o perforación del material antes de la extracción de la muestra y, por lo tanto, reduce al mínimo la contaminación del ADN a partir del ambiente que rodea la muestra que podría alimentar la amplificación del genoma completo.

En algunas realizaciones, la membrana de filtración también se dimensiona proporcionalmente a un ancho dimensional máximo de 8 mm para establecer incluso la propagación de la muestra con la matriz sólida. Las longitudes dimensionales de la membrana de filtración y la matriz sólida son dictadas por el volumen de entrada deseado de la muestra biológica. En una realización, para la separación del flujo lateral de 100 µL de sangre entera, la dimensión óptima de la membrana de filtración MF1® es de 8 mm de ancho x 20 mm de largo. En esta dimensión, los glóbulos rojos se detienen delante cerca de la interfaz de la matriz sólida, minimizando de este modo el volumen de plasma retenido en la membrana de filtración y maximizando la transferencia del plasma sobre la matriz sólida

seca. Para la separación del flujo vertical de 100 μ L de sangre entera, la dimensión óptima de la membrana de filtración Vivid© o Primecare© es de 8 mm de ancho x 32 mm de largo.

En algunas realizaciones, la matriz sólida se puede desacoplar de la membrana de filtración previa y almacenarse a temperatura ambiente para el archivado a largo plazo después de la filtración de la muestra y la transferencia de la fracción no celular en la matriz sólida. Por otra parte, la fracción no celular que se transfiere a la matriz sólida seca se puede secar para que se pueda almacenar durante períodos más largos sin dañar los ácidos nucleicos circulantes presentes en la misma. En el momento del análisis, el ácido nucleico circulante se puede extraer de la matriz sólida mediante la transferencia de la matriz sólida en un recipiente de extracción convencional (por ejemplo un tubo de microcentrifuga) y rehidratar la matriz en un tampón de extracción adecuado.

El dispositivo, como se describe anteriormente, se puede utilizar para la recogida de una fracción no celular de una muestra biológica en el punto de recogida de dicha muestra biológica. La muestra biológica puede ser proporcionada directamente en la membrana de filtración sin tratamiento previo alguno en el punto de recogida de muestras. Una vez que la etapa de filtración es completada, se puede recoger una fracción no celular sobre la matriz sólida seca y almacenarla. En algunas realizaciones, se describe un método para la recogida de plasma o suero de la sangre entera usando el dispositivo. El método comprende las etapas de proporcionar la sangre entera en la zona de aplicación de la muestra de la membrana de filtración, permitiendo que la sangre entera pase a través de la membrana de filtración para separar el plasma o el suero de las células sanguíneas, y recogiendo el plasma o el suero separado en la matriz sólida seca. Una vez recogido, el plasma o el suero se pueden secar en la matriz sólida para un almacenamiento a largo plazo. Todo el proceso se puede realizar en el punto de recogida de la muestra de sangre entera. Posteriormente, la fracción de plasma o de suero secos que tienen ácidos nucleicos circulantes se puede procesar adicionalmente mediante los métodos descritos en el presente documento para un análisis posterior. En algunas realizaciones, se pueden utilizar menos de 100 μ L de muestra de sangre entera para recoger el plasma o el suero.

El dispositivo presentado en este documento puede incluir además componentes adicionales funcionales que no afectan la funcionalidad básica del dispositivo, es decir, la recogida de una fracción no celular que tiene ácidos nucleicos circulantes de la muestra biológica. Por ejemplo, se pueden incluir en el dispositivo membranas de filtración adicionales con diferente tamaño de poro. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye una membrana de filtración única configurada para separar una fracción no celular de las células intactas y una sola matriz sólida seca configurada para recoger la fracción no celular separada. En algunas otras realizaciones, el dispositivo puede incluir una membrana de filtración configurada para separar una fracción no celular de las células intactas, una matriz sólida seca configurada para recoger la fracción no celular separada y otros componentes funcionales que no alteren la funcionalidad básica del dispositivo. Ejemplos de tales otros componentes funcionales incluyen, entre otros, un soporte sólido, el alojamiento para el dispositivo, que sostiene los anillos y/o cubre las membranas.

La práctica de la invención será aún más completamente entendida a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan en este documento sólo con fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas. Algunas abreviaciones utilizadas en la sección de ejemplos significan lo siguiente: "mg": miligramos; "ng": nanogramos; "pg": picogramos; "fg": femtogramos; "mL": mililitros; "mg/mL": miligramos por mililitro; "mM": milimolar; "mmol": milimoles; "pM": picomolar; "pmol": picomoles; " μ L": microlitros; "min": minutos y "h": horas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Recolección del ADN circulante en las membranas de recogida de plasma después de la separación lateral o vertical de la sangre humana entera:

Para los dispositivos de flujo lateral, se utilizó la membrana MF1© como membrana de filtración y el papel de celulosa 903 se utilizó como una matriz sólida seca. Para los dispositivos de flujo vertical, las membranas Primecare© y Vivid© se utilizaron como membranas de filtración y el papel de celulosa 903 se utilizó como una matriz sólida seca. 100 μ L de sangre entera humana se aplicó a las membranas de filtración de los dispositivos de flujo lateral o vertical y el plasma se recolectó en la matriz sólida seca. El plasma recogido se colocó en una cabina desecadora y se secó a temperatura ambiente para formar una muestra de plasma seca. Después de 24 horas de almacenamiento, el ADN plasmático se extrajo de cada matriz sólida por adaptación del DNA Extractor SP (Wako Chemical), y el ADN plasmático precipitado se analizó utilizando electroforesis en gel. A efectos comparativos, la sangre entera se centrifugó con el protocolo suave de tres etapas (1600 x g, 10 minutos; recoger y volver a centrifugar a 1600 x g, 10 minutos; recoger y centrifugar a 16.000 x g, 10 minutos para el plasma libre de células), y 50 μ L de plasma centrifugado se colocó en el papel de celulosa 903 idéntico, se extrajo y se analizó en paralelo. La Figura 5 demuestra que el ADN plasmático circulante se recolectó eficientemente y se estabilizó a partir de una matriz sólida seca superpuesta después de las membranas de filtración comercialmente disponibles. El rendimiento del ADN plasmático circulante se midió con un ensayo PicoGreen y demostró una recuperación de ADN similar entre la sangre entera filtrada por MF1© (175 pg/ μ L) y el plasma centrifugado (179 pg/ μ L). Por el contrario, una pequeña cantidad de contaminación genómica (DNA > 10kB) fue visible después de la filtración utilizando las membranas Primecare© y Vivid© (filtración de flujo vertical) Sin embargo, no se observó contaminación genómica después de la filtración por flujo lateral en MF1 o centrifugación suave.

Ejemplo 2: Amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa para la detección de cuatro loci cromosómicos diferentes del ADN plasmático separado de la sangre entera por flujo lateral o vertical:

El ADN plasmático extraído a partir de la matriz sólida seca (papel de celulosa 903) del Ejemplo 1 se amplificó usando técnicas de amplificación de círculos ondulante en ausencia o presencia de una ligasa específica monocatenaria especial (CircLigasa, EpiCentre). y cuatro loci cromosómicos STR aleatorios (vWA, TPOX, D8S1129 y D13S317) fueron interrogados para evaluar la cobertura genómica. La Figura 6 demuestra que las técnicas de amplificación de círculos ondulantes en combinación con la actividad de ligasa específica monocatenaria permiten la detección sensible de los cuatro loci cromosómicos STR a partir de cantidades de picogramos de ADN plasmático circulante. El experimento se realizó utilizando conjuntos de cebadores mini-STR, ya que los pares de cebadores STR tradicionales amplifican típicamente las regiones típicas de ADN que son mayores al ADN circulante mismo. La actividad de la ligasa específica monocatenaria en combinación con la técnica de amplificación de círculos ondulantes permitió la detección de los loci STR plasmáticos con los valores qPCR CT cercanos al ADN genómico no amplificado de las fracciones de la capa leucocitaria, que se aislaron por centrifugación y se extrajeron utilizando un mini kit de sangre QIAamp DNA (Qiagen) (Figura 6). Sin la actividad de ligasa específica monocatenaria, se lograron detectar solo dos de los cuatro marcadores plasmáticos STTR utilizando solo la técnica de amplificación de círculos ondulantes. Mediante el uso de la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa, los niveles de detección STR del plasma aparecieron similares entre la sangre filtrada por membrana y la sangre centrifugada.

Ejemplo 3: Amplificación del genoma completo de ácido nucleico circulante a partir de plasma sanguíneo:

El ADN circulante se aisló a partir del plasma sanguíneo estabilizado con citrato-fosfato-dextrosa (CPD) de individuos aparentemente sanos utilizando el kit de extracción de ADN SP de Wako (Wako Pure Chemical Industries). Aproximadamente 1,3 ng se analizaron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 2% usando el tampón TBE, se tiñeron con SYBR Gold y se visualizaron usando un generador de imágenes Typhoon. Como se muestra en la Figura 8, la mayoría del ADN circulante fue de aproximadamente 180 pb de longitud, con una cantidad adicional más pequeña de secuencias que tuvieron aproximadamente 370 pb de longitud y una cantidad sustancialmente menor de secuencias de peso molecular mayor.

350 pg de ADN circulante del plasma se calentaron a 95°C para desnaturalizar la plantilla. A continuación, la plantilla de ADN monocatenario desnaturalizado se trató con ARN o ADN ligasa para generar los círculos de ADN monocatenario. La ADN T4 ligasa dependiente de ATP, la ADN ligasa de E. Coli dependiente de NAD codificado por células o una ARN ligasa termoestable (CircLigasa II) se utilizaron para estas reacciones de ligación. 100 pg de círculos de ADN monocatenarios ligados se sometieron a continuación a la amplificación del genoma completo utilizando el kit de GenomiPhi (GE Healthcare) que utiliza una ADN Phi29 polimerasa. La amplificación se realizó usando la mezcla de cebadores +N+N(en N)(en N)(en N)*N, donde +N representa un nucleótido de LNA y "en N" representa una mezcla aleatoria que contiene dA 2-amino, dT 2-tio, G y C normales. La amplificación a tiempo real, en la que la amplificación y la cuantificación del ácido nucleico diana se realiza de forma simultánea, se realiza mediante la adición de una pequeña cantidad de SYBR Verde I a la mezcla de amplificación y el monitoreo del incremento de la señal de fluorescencia con el tiempo en un lector de placas Tecan (Tecan Sniper, Amersham Pharmacia Biotech). Para comparar, se incluyeron una concentración equivalente de ADN genómico no tratado, ADN plasmático no tratado y una muestra sin plantilla de ADN (sin amplificación de plantilla).

Como se muestra en la Figura 9, la cinética de amplificación del ADN plasmático, no tratado, fragmentado fue mucho menor cuando se comparó con una cantidad equivalente de ADN genómico de alto peso molecular, lo que indicó un defecto en la amplificación. Sin embargo, cuando el ADN plasmático fragmentado fue tratado previamente y se convirtió en círculos de ADN monocatenario utilizando el CircLigasa© II, se logró una cinética de amplificación rápida (Figura 9A). Otras ligasas, incluyendo la ADN T4 ligasa dependiente de ATP (Figura 9B) y la ADN ligasa de E. Coli dependiente de NAD codificada por célula (Figura 9C) también fueron eficaces en la restauración de la cinética de amplificación del ADN plasmático fragmentado. En estos ejemplos, el aumento relativo en la cinética de amplificación indica la eficacia de cada una de las ligasas en la promoción de la ligación intramolecular de la plantilla de ADN monocatenario.

Ejemplo 4: Análisis de los ácidos nucleicos circulantes amplificados del plasma sanguíneo mediante la amplificación del genoma completo asistido por ligasa.

El ADN amplificado generado en el Ejemplo 3 se analizó adicionalmente por PCR cuantitativo usando cebadores orientados a cuatro loci CODIS diferentes (vWA, TPOX, D8S1129 y D13S317) con el fin de probar la eficacia del método de amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa para promover la amplificación del ADN sensible y equilibrada. Estos niveles de ADN se compararon con los valores de ADN no amplificados para determinar los niveles de representación relativa después de la amplificación. Como se ilustra en la Figura 10, en ambos ejemplos, el análisis qPCR del ADN plasmático no tratado dio lugar a la disminución de la secuencia o al ADN producido que estaba altamente poco representado en los loci analizados. Por el contrario, incluyendo ya sea CircLigasa© II o ADN T4 ligasa en el método se evitó la disminución de la secuencia de los cuatro loci y el ADN producido que fue más similar en la representación que el ADN genómico de alto peso molecular amplificado. En un ejemplo adicional usando CircLigasa© II como la ADN ligasa monocatenaria, de los 12 loci CODIS diferentes analizados por PCR cuantitativa (qPCR), 11 se detectaron después de la amplificación del genoma completo ayudado por ligasa,

mientras que sólo 4 estaban presentes en los ADN plasmáticos no tratados (Figura 11). En la Figura 11, los valores Ct reportados son un promedio de dos réplicas. Las reacciones PCR en donde los valores Ct no se determinaron se marcan por mediante una "X".

Ejemplo 5: Optimización de las condiciones de reacción para la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa

La reacción de amplificación del ADN ayudada por la ligasa se ha optimizado aún más mediante la optimización de la eficiencia de la reacción de ligación de las moléculas de ADN monocatenario por ARN TS2126 ligasa. La presencia de los iones metálicos fue esencial para la reacción de ligación ya que la eliminación del manganeso del tampón estándar recomendado por el fabricante redujo las tasas de amplificación recomendadas por el fabricante estándar a niveles basales. El ADN genómico no tratado y el ADN plasmático sin tratar se compararon con las muestras de ADN plasmático tratadas con CircLigasa II® utilizando condiciones modificadas por el tampón. Todas las condiciones del tampón contenían KoAc 33 mM, DTT 0,5 mM y betaína 1M. Cuando se indique, los tampones contenían Tris-acetato 33 mM (pH 7,5) o HEPES-KOH 33 mM (pH 8,0) y adicionalmente contenían MgCl₂ 2,5 mM o MnCl₂ 2,5 mM. La amplificación a tiempo real se realizó mediante la adición de una pequeña cantidad de SYBR verde I a la mezcla de amplificación y monitoreando el incremento de la fluorescencia con el tiempo en un lector de placas Tecan. El umbral de amplificación es el tiempo en el cual la fluorescencia se eleva por encima de los niveles basales (2000 RFU).

Una comparación de la cinética de amplificación de las reacciones de amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa (entrada de 100 pg de ADN circulante) se representa en la Figura 12. Tanto el magnesio como el manganeso producen efectos similares en presencia del tampón TRIS estándar. Sin embargo, una combinación de manganeso y magnesio en presencia del tampón HEPES, pH 8,0 promovió tasas de amplificación más altas. El tampón HEPES aumentó la eficiencia de circularización del ADN plasmático en estas reacciones por la disminución de la tasa de oxidación de los cationes de manganeso en comparación con el tampón TRIS.

Ejemplo 6: Inhibición de la amplificación del ADN genómico de alto peso molecular en la amplificación del genoma completo ayudado por la ligasa

La cinética de amplificación de la amplificación del genoma completo del ADN genómico no tratado se comparó con las muestras de ADN genómico tratadas con CircLigasa® I o CircLigasa® II (entrada de 100 pg de ADN). Los resultados se ilustran en la Figura 13. Como se describe en la Figura 13, el tratamiento con CircLigasa® del ADN genómico monocatenario produjo un efecto inhibitorio en la tasa de amplificación del ADN genómico de alto peso molecular (diferente a los efectos positivos en el ADN plasmático tal como se ilustra en la Figura 9A). La inhibición fue aparente para ambas CircLigasa® I y CircLigasa® II.

Para investigar si la amplificación basada en Phi29 era inhibida por la ligasa, el ADN genómico bicatenario no tratado se amplificó en presencia de la ligasa activa. La amplificación en tiempo real se realizó mediante la adición de una pequeña cantidad de SYBR verde a la mezcla de amplificación y monitoreando el incremento de la fluorescencia con el tiempo en un lector de placas Tecan. El umbral de amplificación es el tiempo en el cual la fluorescencia aumenta por encima de los niveles basales (2000 RFU). Se observó que la inhibición de la amplificación del ADN genómico no fue una consecuencia de la ligasa activa que está presente durante la amplificación.

Una preferencia para la amplificación de la circulación del ADN genómico de alto peso molecular podría ser una ventaja para ciertas aplicaciones, ya que el ADN genómico de las células de la sangre a menudo contamina las preparaciones de los ácidos nucleicos circulantes, y tiene menor valor diagnóstico.

Ejemplo 7: Amplificación en un solo tubo del ADN fragmentado utilizando la amplificación del genoma completo con ayuda de ligasa — Efecto de la fosforilación de los fragmentos de ADN circulante con quinasa antes de la ligación intramolecular.

La fosforilación de los fragmentos de ADN circulante con quinasa se descubrió que provocaba una detección más sensible del ADN circulante en el plasma sanguíneo. Un experimento de mezcla de plasma/sangre de hombre-mujer demostró que la biblioteca del ADN creada a partir de la entrada de ANC tratado con cinasa era más representativa, lo que permitía una detección más sensible del marcador DYS14 específicos de hombres (3/3 réplicas, mientras que solo 1/3 se detectó sin la ejecución de la fosforilación). 100 µL de las mezclas de sangre/plasma se prepararon como sigue: 100A:100% de plasma masculino; 5A-C: plasma masculino adicionado en sangre entera femenina en 5% v/v; 1A-C: el plasma masculino se adicionó en sangre entera femenina al 1% v/v; y OA: sangre femenina 100%. El plasma fue separado de las células de sangre por el flujo lateral a través de una membrana MF1 seguido por la recogida en una almohadilla de celulosa 903, que se secó posteriormente y se almacenó durante la noche. El ADN circulante después se extrajo de la almohadilla de celulosa mediante una modificación del kit extractor SP Wako (Wako Pure Chemical Industries), un método estándar basado en yoduro de sodio/detergente. Aproximadamente 1,8 ng de ADN se trataron posteriormente con o sin quinasa de polinucleótido T4 en presencia de GTP, manganeso y betaína y después se trató con CircLigasa® II para dar la forma de círculo a los fragmentos de ADN monocatenario. Posteriormente, el ADN se sometió a amplificación de genoma completo GenomiPhi (GE Healthcare) y los productos

se analizaron por PCR cuantitativa para evaluar la detección de dos marcadores: Dys14, que es un gen de múltiples copias ubicado en el cromosoma Y, y debe ser detectable sólo de la fracción masculina, y D16S539, que es un locus STR ubicado en el cromosoma 16 y debe ser detectable tanto de fracciones masculinas como femeninas. La reacción se realizó en un único recipiente de reacción, sin etapas de purificación intermedia o aislamiento en el flujo de trabajo. Esto se consiguió mediante la realización de la reacción de fosforilación a una concentración relativamente baja de GTP.

La Figura 14 ilustra que la inclusión de una quinasa en la reacción permite la circularización y amplificación de los fragmentos de ANC que no contienen necesariamente un fosfato 5', creando de ese modo una biblioteca más representativa. Esto incluiría los fragmentos de ADN que contienen un grupo hidroxilo 5', que se generan específicamente por la digestión de DNasa II durante la muerte celular. Usando un experimento de mezcla de plasma/sangre masculina-femenina, se demuestra que la biblioteca creada a partir del ADN tratado con quinasa es más representativa, lo que permite una detección más sensible del marcador DYS14 específicamente masculino (3/3 repeticiones, mientras que se detectaron sólo 1/3 si no se realizaba la fosforilación).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación de ácidos nucleicos circulantes que están presentes en la fracción no celular de una muestra biológica, comprendiendo el método:
filtrar la muestra biológica para separar la fracción no celular de las células intactas;
5 recoger la fracción no celular separada en una matriz sólida seca;
extraer los ácidos nucleicos circulantes de la fracción no celular recogida;
circularizar los ácidos nucleicos circulantes extraídos para formar círculos de ácido nucleico monocatenario; y
amplificar los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios mediante la amplificación de círculos ondulantes cebados al azar para formar un producto de ácido nucleico circulante amplificado.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además desnaturalizar los ácidos nucleicos circulantes extraídos antes de la circularización.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la circularización se realiza usando una ARN ligasa TS2126.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia de ácido nucleico circulante específica en el producto de ácido nucleico circulante amplificado.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es sangre entera y la fracción no celular es plasma o suero.
6. El método de la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos circulantes son ADN circulantes o ARN circulantes, en donde los ADN circulantes comprenden un ADN derivado de tumor, un ADN derivado de feto, un ADN derivado de órgano donado, un ADN derivado de células transplantadas, un ADN derivado de tejido transplantado, o combinaciones de los mismos.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en el que la filtración de la muestra biológica se realiza usando una membrana que tiene un tamaño de poro entre 0,01 micras y 5 micras.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz sólida seca es una matriz de celulosa que carece de detergente y está impregnada con una sal caotrópica.
- 25 9. Un método para la detección de ácidos nucleicos circulantes de una muestra seca de plasma o suero, comprendiendo el método:
extraer los ácidos nucleicos circulantes de la muestra seca de plasma o suero;
realizar una amplificación del genoma completo de los ácidos nucleicos circulantes extraídos para generar un producto de ácido nucleico circulante amplificado, en el que la amplificación comprende i) dar la forma de círculo a los ácidos nucleicos circulantes extraídos utilizando una ligasa específica monocatenaria para formar círculos de ácidos nucleicos circulantes monocatenarios e ii) amplificar los círculos de ácidos nucleicos monocatenarios a través de la amplificación del círculo ondulante cebado al azar; y
30 detectar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia específica de ácido nucleico circulante en el producto de ácido nucleico circulante amplificado.
- 35 10. Un método para recoger una fracción no celular que contiene ácidos nucleicos circulantes de una muestra biológica, comprendiendo el método:
filtrar la fracción no celular que comprende los ácidos nucleicos circulantes pasando la fracción no celular a través de una membrana de filtración configurada para separar la fracción no celular de las células intactas;
40 recoger la fracción no celular separada que comprende los ácidos nucleicos circulantes en una matriz sólida seca configurada para recoger la fracción no celular separada, en donde la matriz sólida seca está desprovista de cualquier tipo de detergente, y en donde la matriz sólida seca está configurada para establecer un contacto directo con la membrana de filtración;
secar la fracción no celular separada que comprende ácidos nucleicos circulantes en la matriz sólida seca sin detergente hasta una condición en la que la fracción no celular seca y separada contiene menos del 10% de contenido de agua; y
45 almacenar la fracción no celular seca y separada que comprende los ácidos nucleicos circulantes en la matriz sólida seca sin detergente durante al menos 24 horas.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la fracción no celular seca y separada que comprende ácidos nucleicos circulantes en la matriz sólida seca se almacena durante al menos 7 días.
- 5 12. El método de la reivindicación 10, en el que la membrana de filtración está dispuesta sobre un primer soporte sólido y la matriz sólida seca está dispuesta sobre un segundo soporte sólido, y en el que el primer soporte sólido está conectado al segundo soporte sólido a través de un medio para establecer el contacto directo de la membrana de filtración con la matriz sólida seca.
13. El método de la reivindicación 10, en el que la fracción no celular seca y separada que comprende ácidos nucleicos circulantes en la matriz sólida seca se almacena en condiciones desecadas.
- 10 14. El método de la reivindicación 10, en el que los ácidos nucleicos circulantes comprenden ácidos nucleicos circulantes derivados de tumores.
15. El método de la reivindicación 10, en el que el secado comprende el uso de la evaporación.

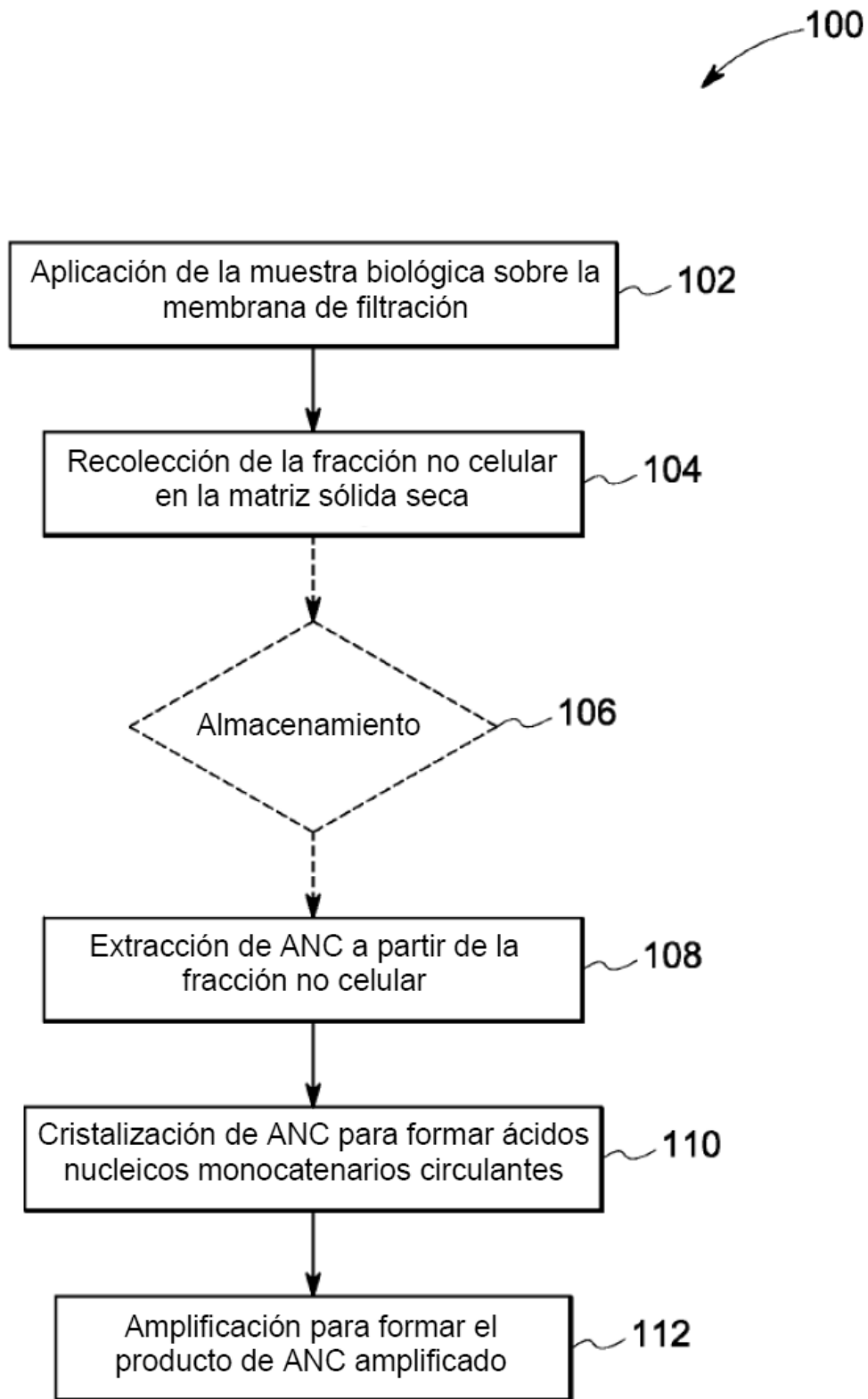


FIG. 1

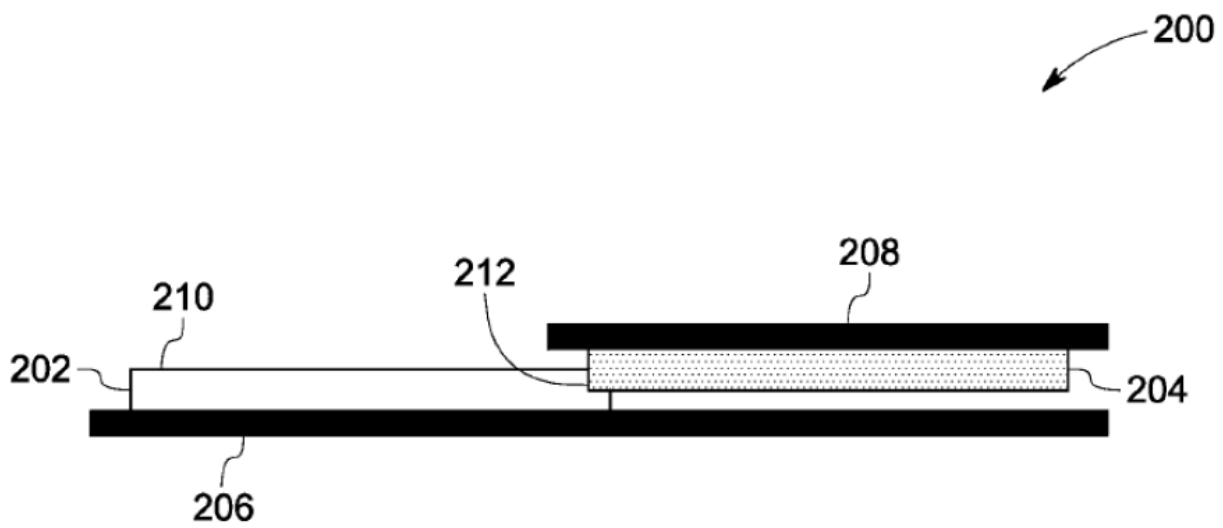
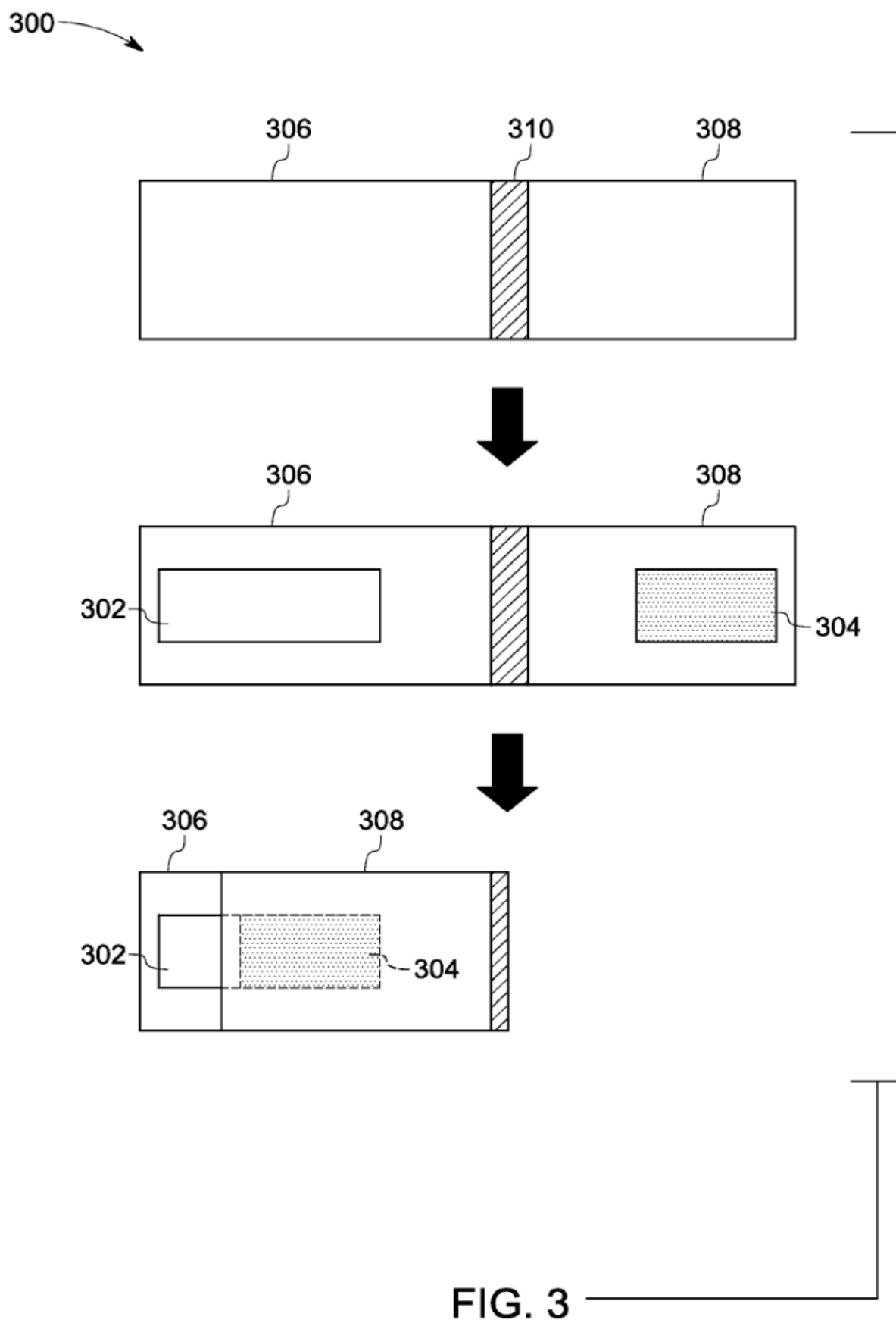


FIG. 2



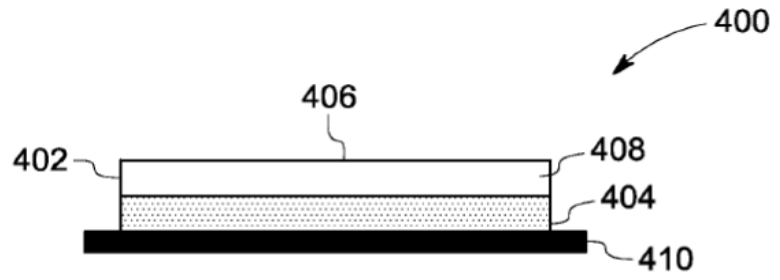


FIG. 4

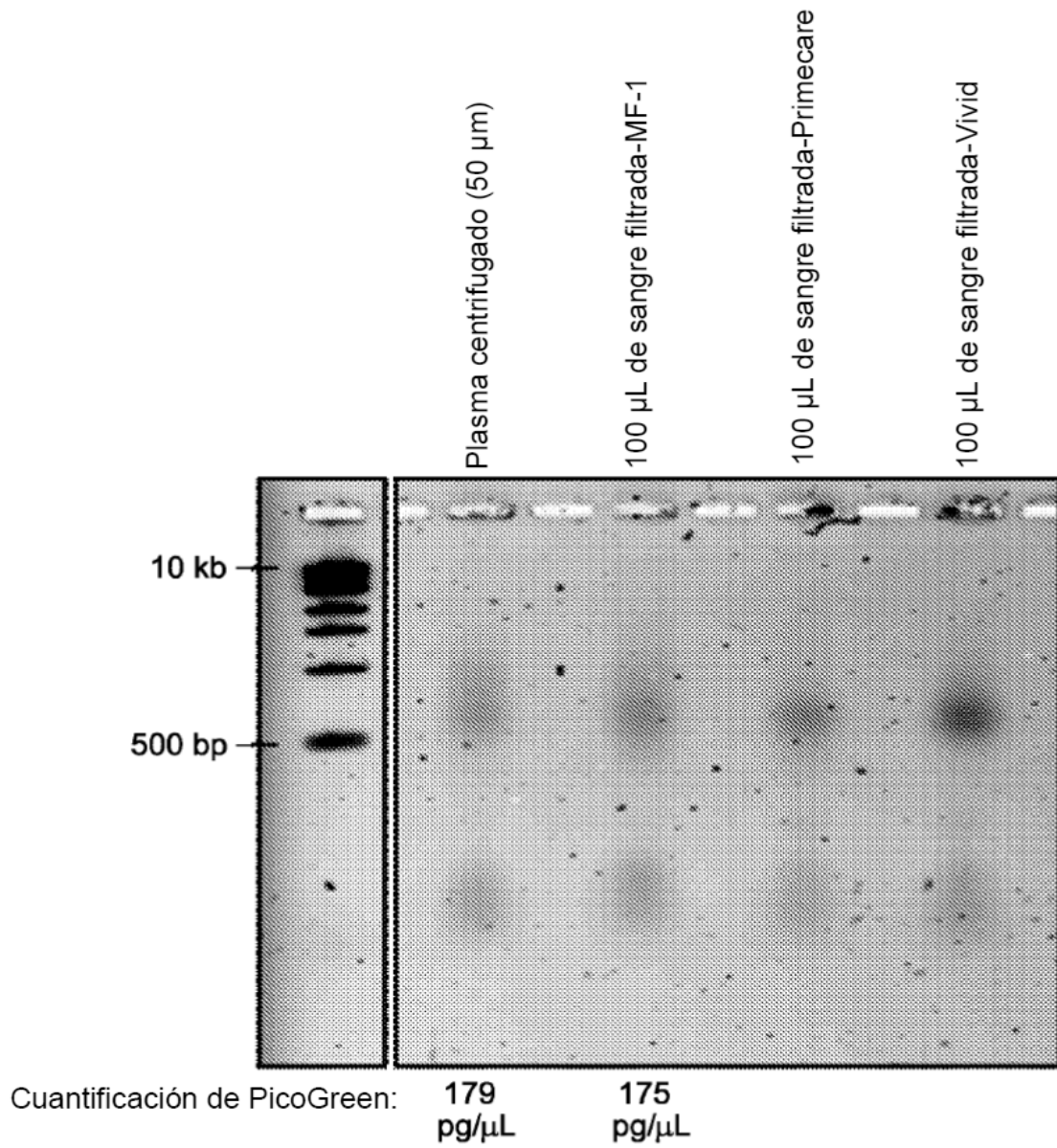
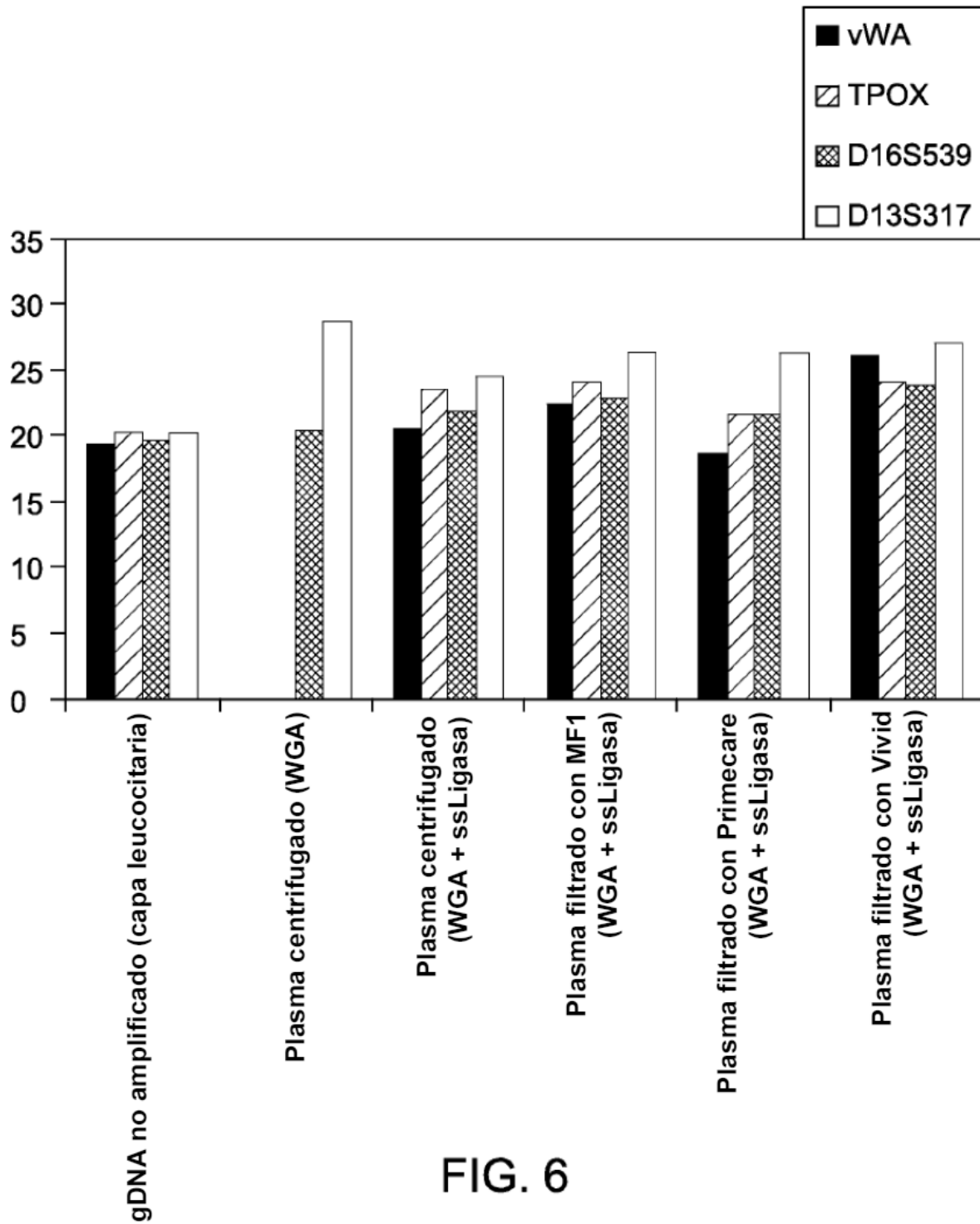


FIG. 5



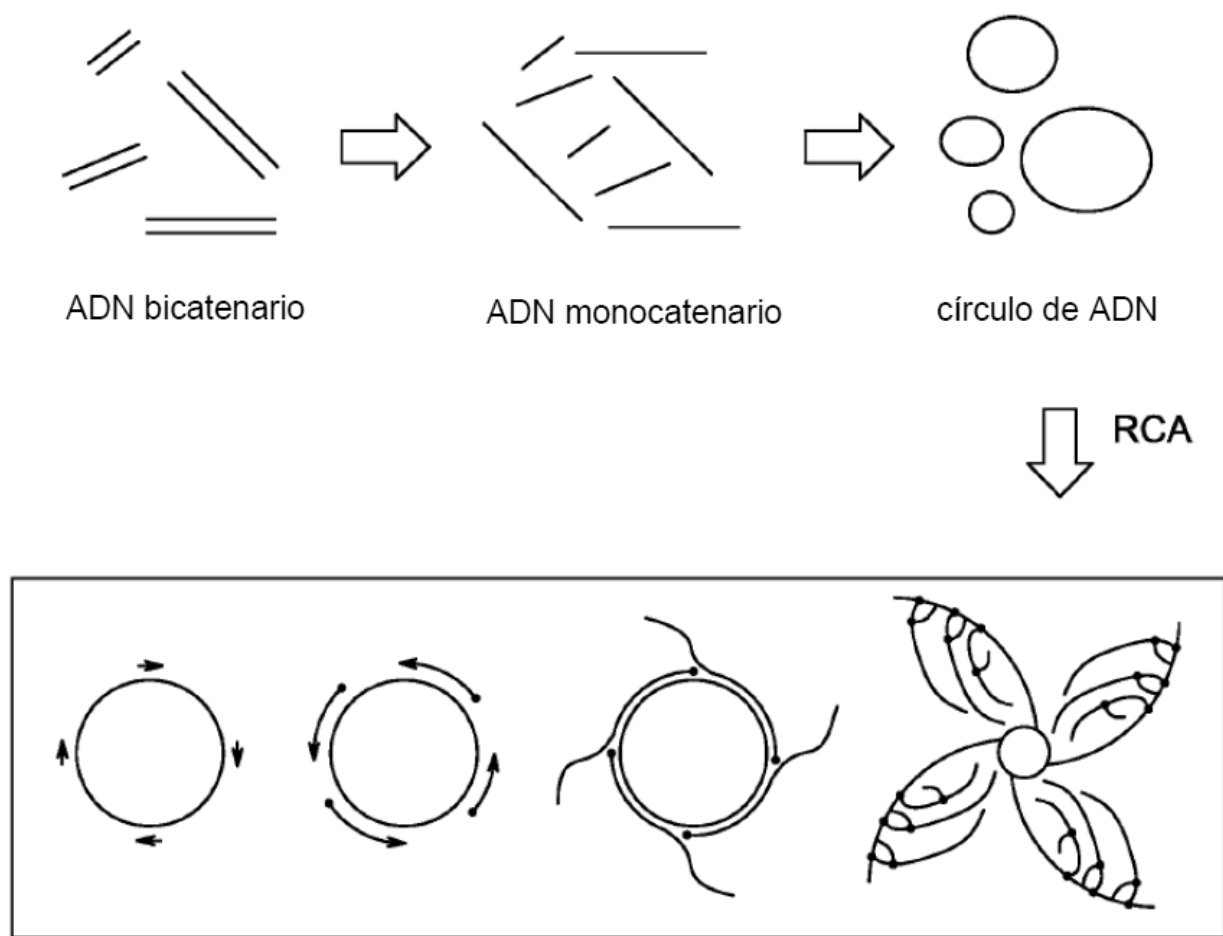


FIG. 7

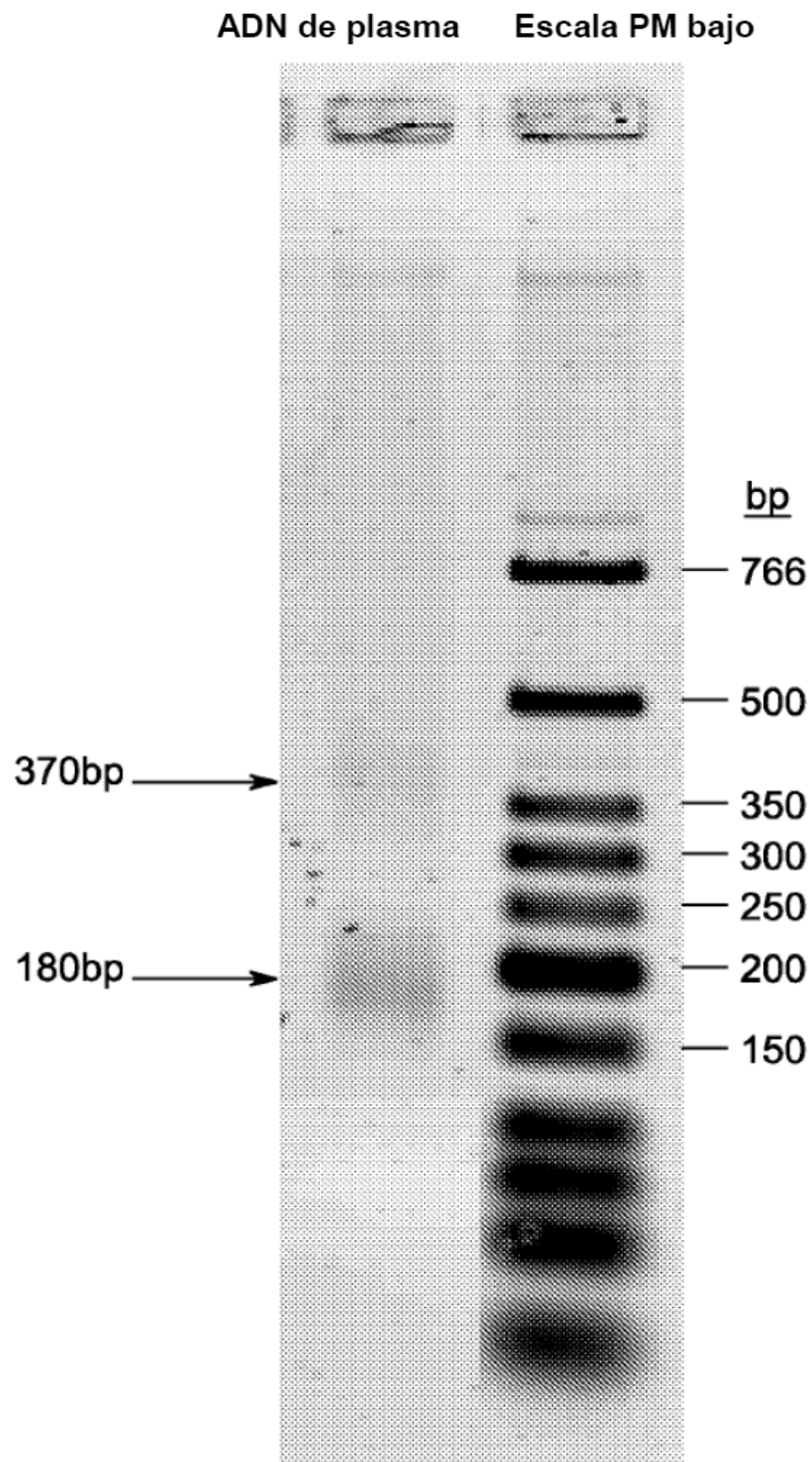


FIG. 8

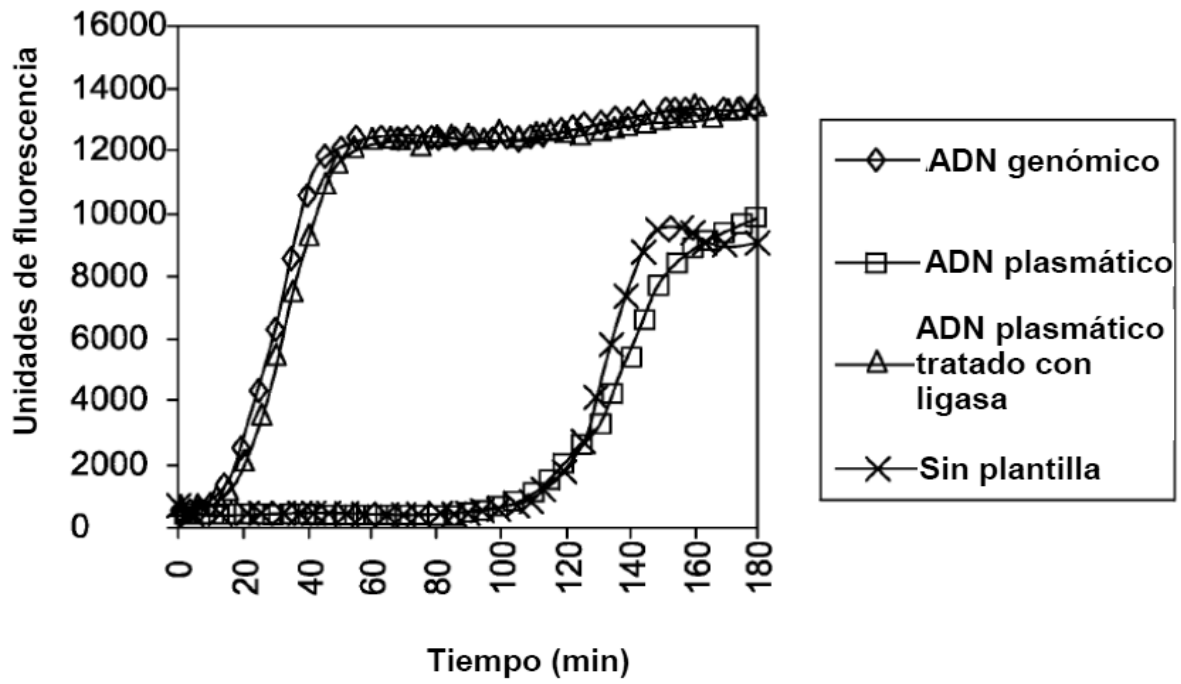


FIG. 9A

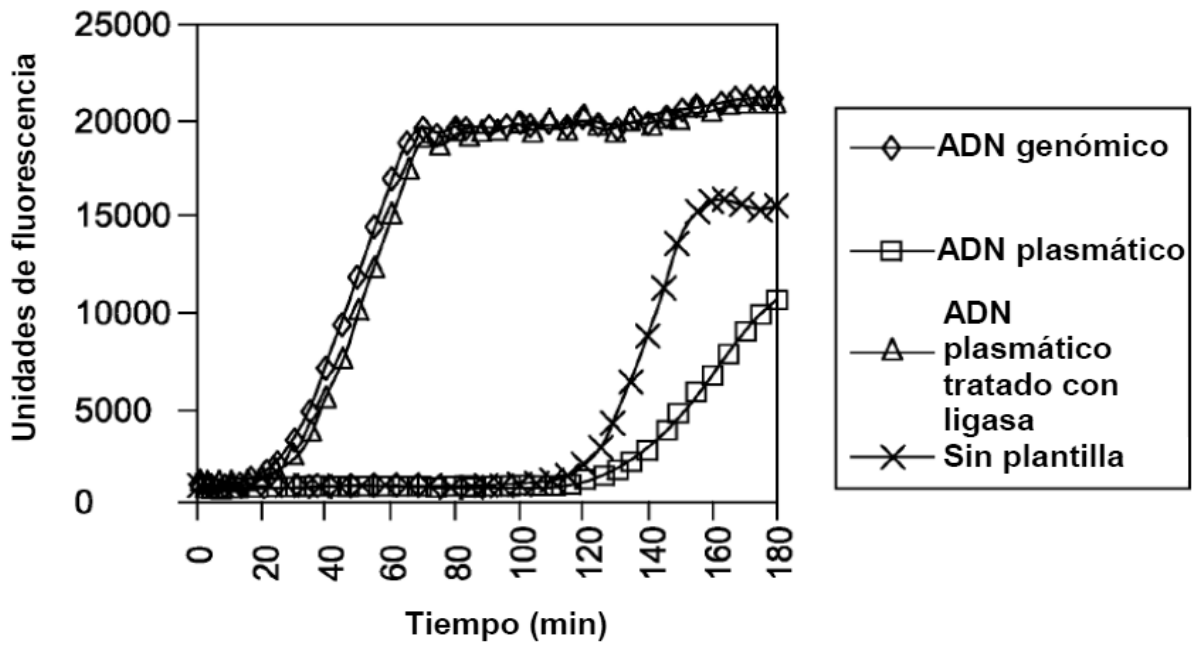


FIG. 9B

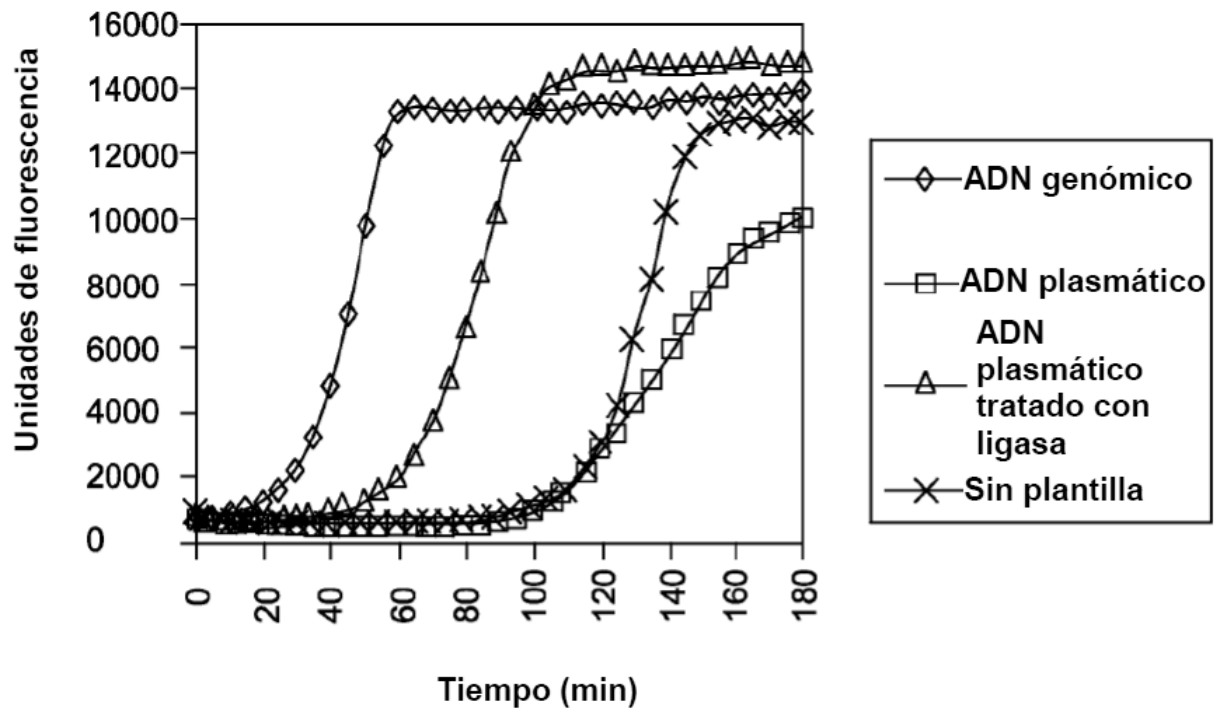


FIG. 9C

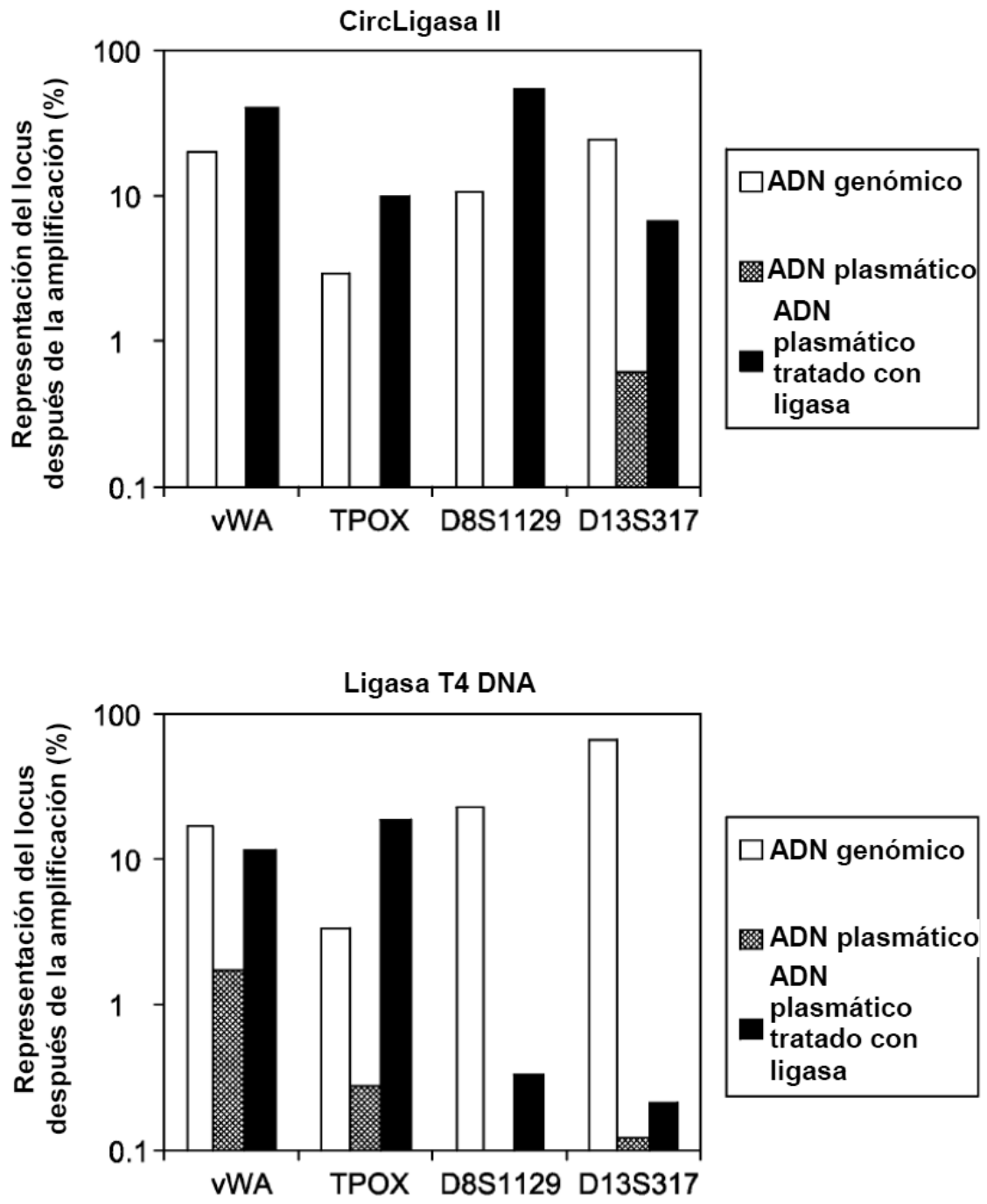


FIG. 10

Locus	Tamaño de amplicón (bp)	ADN genómico	ADN plasmático	ADN plasmático tratado con Circligase II
mini CSF1PO	89-129	22.26	X	25.55
mini TH01	51-98	23.43	X	25.24
mini TPOX	65-101	24.62	X	23.92
mini vWA	88-148	21.29	X	20.66
mini D5S818	81-117	22.14	X	26.19
mini D7S820	136-176	23.46	X	27.11
mini D8S1129	86-134	22.72	X	20.26
mini D13S317	88-132	23.03	28.73	25.24
mini D16S539	88-121	20.74	20.40	20.83
mini D18S51	113-193	23.84	X	X
Amelogenin	106, 112	20.72	29.67	22.27
D3S1358	99-147	20.13	20.77	20.85
Total		12/12 loci	4/12 loci	11/12 loci

FIG. 11

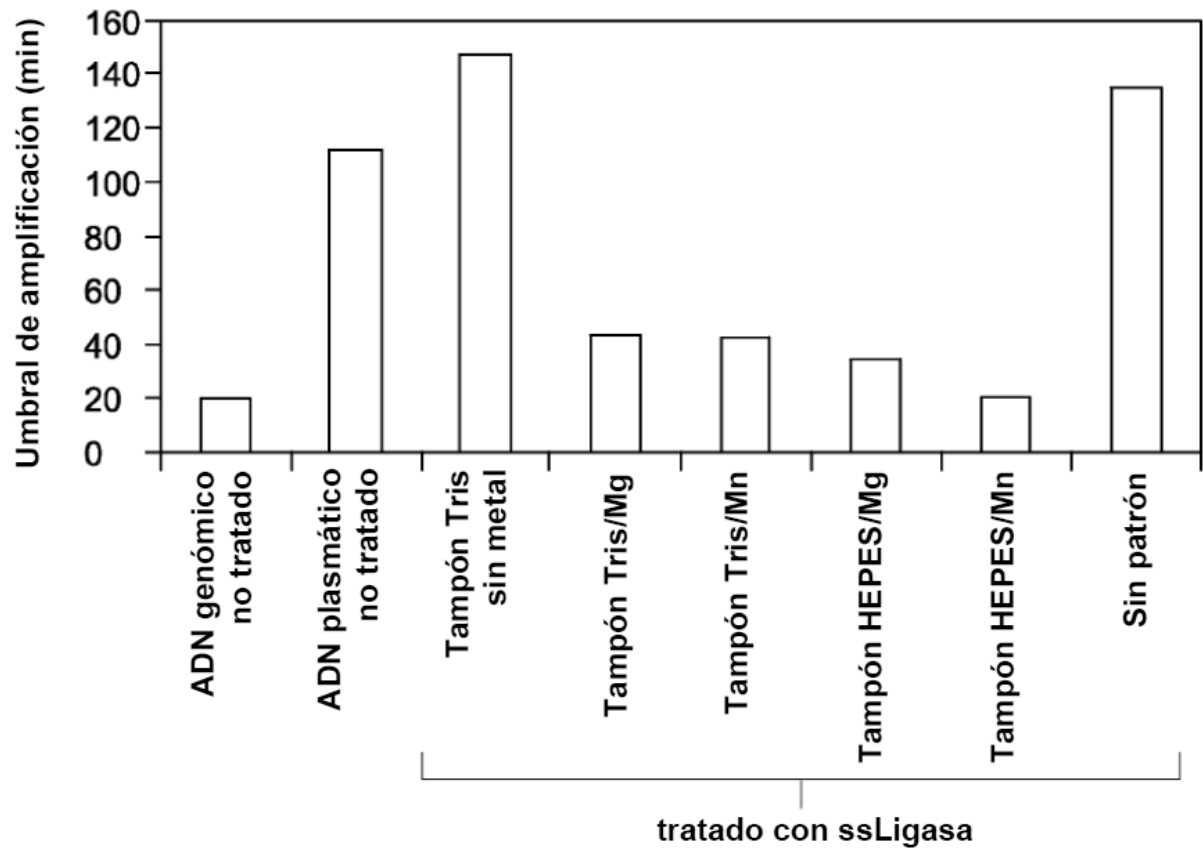


FIG. 12

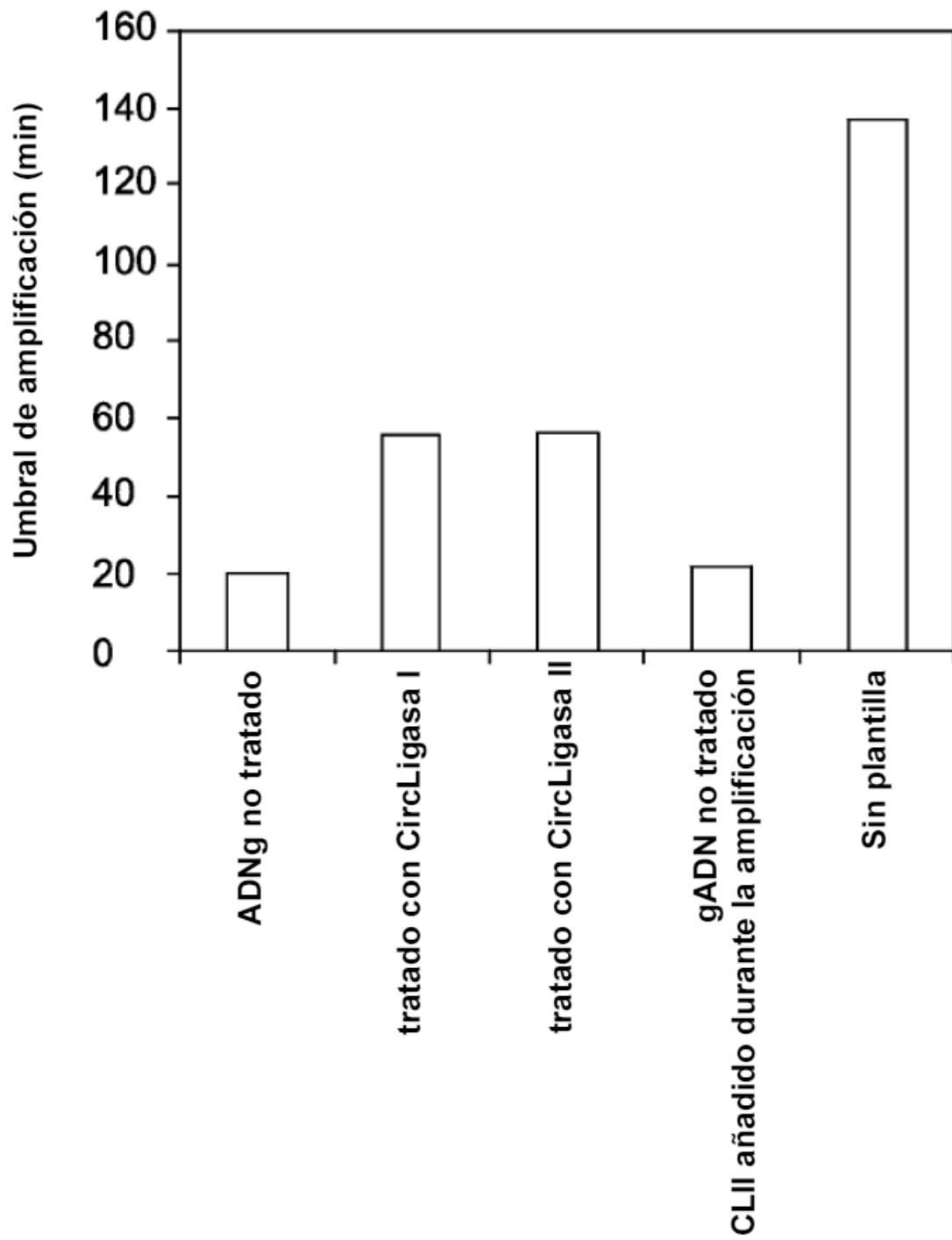


FIG. 13

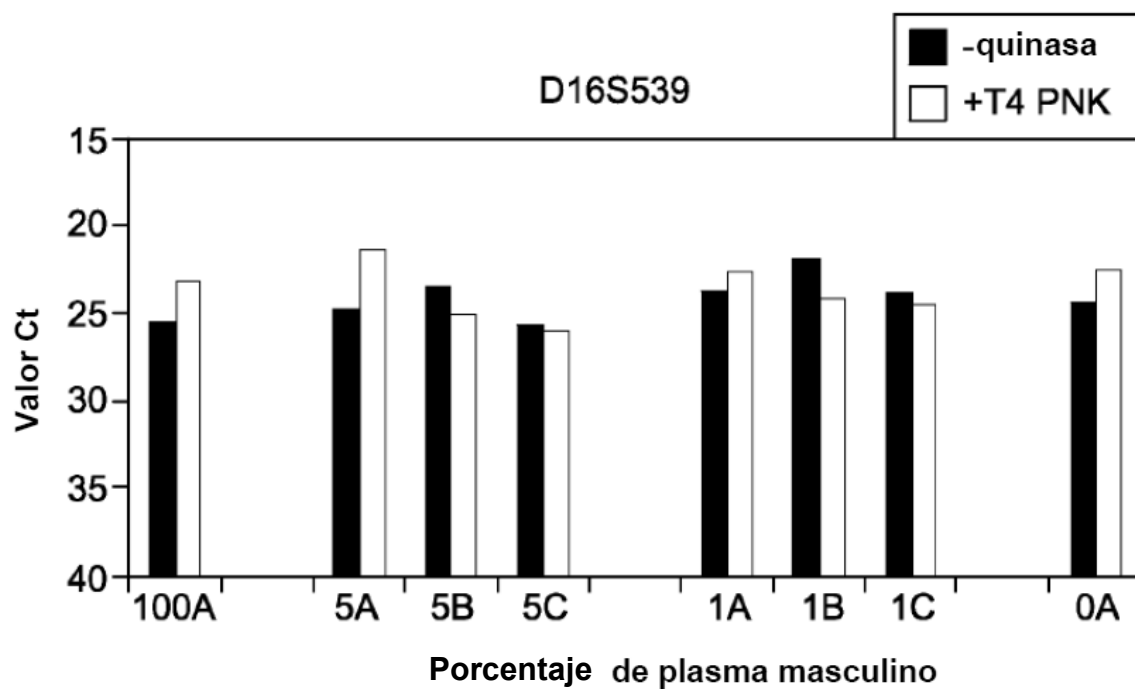
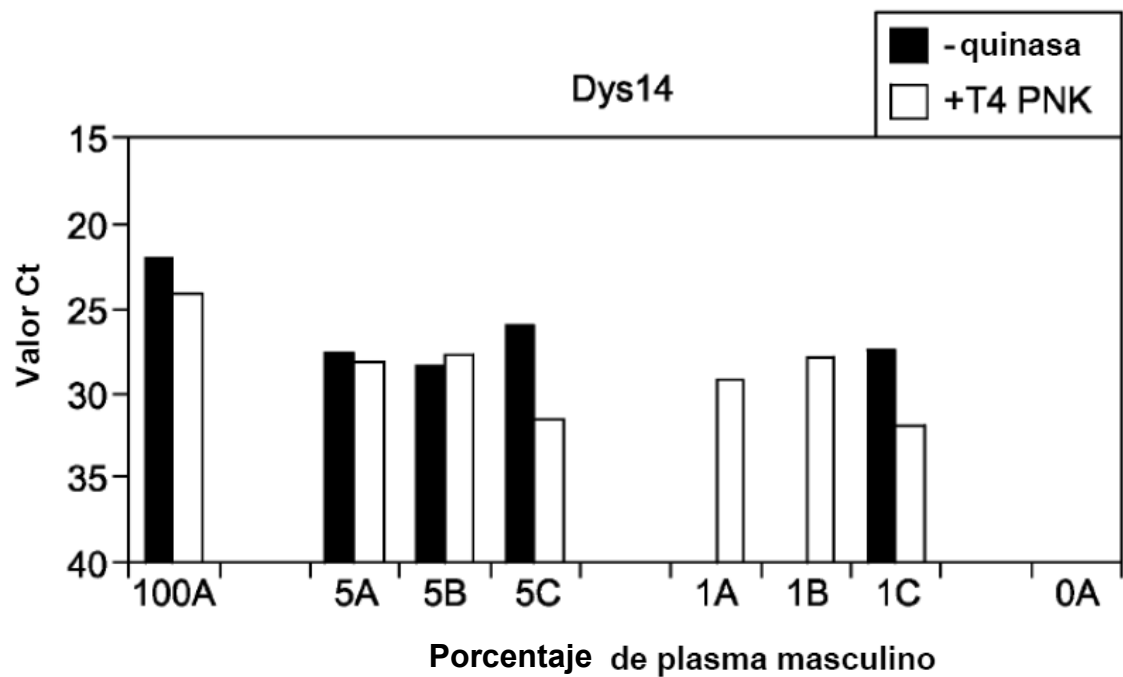


FIG. 14