(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 721 204**

(51) Int. CI.:

***C12Q 1/68*** (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014 PCT/US2014/048179**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15013604**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014 E 14750119 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3024945**

(54) Título: **Circularización y amplificación de ácidos nucleicos circulantes asistida por ligasa**

(30) Prioridad:

**26.07.2013 US 201313952040**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**29.07.2019**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**HELLER, RYAN CHARLES;**
**NELSON, JOHN RICHARD y**
**KVAM, ERIK LEEMING**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

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

Circularización y amplificación de ácidos nucleicos circulantes asistida por ligasa

### Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a ensayos de ácidos nucleicos que implican la generación de un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal monocatenario o bicatenario mediante ligación de ADN monocatenario independiente de la plantilla. Se refiere además a la amplificación y/o detección del círculo de ADN monocatenario mediante amplificación en círculo rodante. La generación de los círculos de ADN monocatenario y la posterior amplificación de ADN se llevan a cabo en un único recipiente de reacción sin que intervengan etapas de aislamiento y/o purificación. Además se proporcionan kits para llevar a cabo los métodos.

### Antecedentes

La amplificación de ADN es un proceso de réplica de un ADN bicatenario (ADNbc) diana para generar múltiples copias del mismo. Puesto que las cadenas individuales de un ADNbc son antiparalelas y complementarias, cada cadena puede servir como una cadena plantilla para la producción de su cadena complementaria. La cadena plantilla se conserva como un todo o como una porción truncada y la cadena complementaria se ensambla a partir de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) por una ADN polimerasa. Las síntesis de la cadena complementaria transcurren en dirección 5'→3' desde el extremo 3' terminal de una secuencia de cebador que se hibrida con la cadena plantilla.

La amplificación del genoma completo (AGC) implica la amplificación no específica de un ADN diana. La AGC se consigue con frecuencia por técnicas de amplificación por desplazamiento múltiple (ADM) que emplean cebadores de oligonucleótidos aleatorios para cebar la síntesis de ADN en múltiples lugares de ADN diana junto con una ADN polimerasa de alta fidelidad que tiene una actividad de desplazamiento de la cadena (por ejemplo, la polimerasa de Phi29). Aunque los sistemas de AGC comerciales disponibles actualmente, tales como kits GenomiPhi (GE Healthcare, Estados Unidos) y RepliG (Qiagen) proporcionan resultados óptimos con ADN diana de alto peso molecular, el rendimiento de estos sistemas es bajo cuando el ADN diana es corto y/o altamente fragmentado. Cuando el ADN diana está fragmentado y la longitud de secuencia es menor de aproximadamente 1000 nucleótidos, la amplificación de ADN diana usando métodos convencionales da como resultado una reducida velocidad de amplificación, fracaso de secuencia significativo especialmente cerca de los extremos de ADN diana y amplificación altamente sesgada por secuencia. Puesto que se reduce la longitud de ADN plantilla, la probabilidad de que la cadena sea cebada varias veces se reduce en la reacción de ADM. Esto reduce el potencial de amplificación de estos fragmentos más cortos. Son, por tanto, muy deseables, métodos eficientes para amplificar no específicamente el ADN fragmentado, corto.

La reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación (RCP) se ha usado para amplificar ADNbc fragmentado. Sin embargo, solo una pequeña fracción de ADN fragmentado se amplifica en estas reacciones conduciendo a una cobertura del genoma inadecuado. Para amplificar eficientemente, ADNbc diana, fragmentados, estos pueden repararse primero y luego concatemerizarse por ligación de extremos romos para generar secuencias que son más de largas de 1000 pares de bases (pb). Sin embargo, con frecuencia se requiere una concentración relativamente más alta de ADN diana para promover la concatemerización y la posterior amplificación. La circularización de ADN diana bicatenario también se ha usado en varios ensayos basados en ácidos nucleicos incluyendo ADM, AGC, amplificación en círculo rodante híper-ramificada (RCA) y la secuenciación de ADN masivamente paralelo. Para circularizar de forma efectiva y amplificar ADNbc fragmentados, los extremos bicatenarios de ADN fragmentado se reparan primero, seguido de ligación de extremos romos para formar círculos de ADN bicatenario. Sin embargo, es difícil circularizar fragmentos de ADN bicatenario que sean menores de 500 pb de longitud.

El ADN bicatenario puede desnaturalizarse para producir un ADN monocatenario (ADNmc), que además puede circularizarse en una reacción de ligación intramolecular dependiente de plantilla usando una ligasa. Sin embargo, se requiere información previa de la secuencia del ADN diana para realizar una circularización dependiente de plantilla. La ligación intramolecular independiente de la plantilla de ADNmc también se ha documentado. Por ejemplo, la ARN ligasa TS2126 (disponible comercialmente bajo las marcas ThermoPhage™ ARN ligasa II o ThermoPhage™ ADNmc ligasa (Prokaria, Matis, Islandia) o CircLigase™ ADNmc ligasa (Epicenter Biotechnologies, Wisconsin, Estados Unidos) se ha usado para elaborar bolas de ADN digitales, y/o la fragmentación específica de locus y amplificación de ADN, tal como un ADN genómico. Las moléculas de ADN complementario monocatenario, lineal (ADNc) preparadas a partir de fragmentos del extremo 5' de ARNm también se han amplificado mediante replicación del círculo rodante después de la circularización usando ARN ligasa TS2126. Incorporando apropiadamente una secuencia promotora de ARN polimerasa codificante en el ADNc, la plantilla de ADNc circularizado ha demostrado que actúa como un sustrato de transcripción y así efectúa la amplificación de las moléculas de ARNm en una muestra biológica. Además, la ARN ligasa TS2126 se ha usado para amplificar los extremos de ADNc para la amplificación aleatoria de los extremos de ADNc (RACE, del inglés *Randon Amplification CDNA Ends*). A partir de cantidades limitadas de ADN fragmentado, la plantilla de ADN para la amplificación en círculo rodante también se ha generado empleando ARN ligasa TS2126. El método implicó desnaturalizar el ADNbc lineal, fragmentado para obtener fragmentos de ADNmc lineales, ligando el ADNmc lineal con CircLigase™ ADNmc ligasa para obtener un círculo de ADN monocatenario, y posteriormente amplificar el círculo de ADN monocatenario usando cebadores aleatorios y ADN polimerasa Phi29 mediante RCA. Sin

embargo, incluso después de optimizar las condiciones de reacción, la cantidad de ADN circular monocatenario generada fue muy variable y dependiente de la secuencia. Por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden un nucleótido 5'G y un 3'T ligaron significativamente mejor que su oligonucleótido complementario que comprende un 5'A y un 3'C en idénticas condiciones de ligación. Además, la eficiencia de ligación intramolecular varió entre las secuencias de ADNmc lineales que tienen tamaños idénticos o muy similares, pero con pequeñas diferencias en la secuencia de nucleótidos. La eficiencia también varió entre secuencias de ADNmc lineales de diferentes tamaños (por ejemplo, longitud de la secuencia que varía de 100 bases a kilobases de tamaño). Por otra parte, todos los intentos de reacciones de ligación-amplificación implicaron la intervención de etapas de aislamiento, purificación y/o limpieza, lo que hace que el flujo de trabajo de ligación-amplificación sea complejo. Por ejemplo, el análisis de muestras forenses de ADN fragmentado por circularización seguido de amplificación en círculo rodante se llevó a cabo en varias etapas que comprenden fosforilación del 5' de ADN, ligación del adaptador, circularización de ADN, y la amplificación de todo el genoma. Las reacciones de cada etapa se sometieron a una limpieza de reacción antes de llevar a cabo la etapa siguiente. No se observó ventaja de amplificación cuando la ligación y la amplificación se llevaron a cabo en un único recipiente de reacción. Sin embargo, el proceso de varias etapas con frecuencia tenía como resultado la pérdida del ADN plantilla y condujo a un análisis fallido. Son, por tanto, muy deseables métodos eficientes para amplificar de forma no específica secuencias cortas de ADN en un único recipiente de reacción sin sesgo de secuencia alguno e intervención de alguna etapa de limpieza.

**Breve descripción**

En algunas formas de realización, se proporciona un método para generar un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal. El método comprende las etapas de proporcionar un ADN lineal, reparar el extremo de ADN lineal incubándolo con una polinucleótido cinasa en presencia de un donador de fosfato para generar una secuencia de ADN ligable que tiene un grupo fosfato en el extremo 5' terminal y un grupo hidroxilo en un extremo 3' terminal, y llevar a cabo una ligación intramolecular de la secuencia de ADN ligable reparado con una ligasa con el fin de generar el círculo de ADN monocatenario. Todas las etapas del método se llevan a cabo en un recipiente de reacción único sin que intervengan etapas de aislamiento o purificación. El donador de fosfato puede ser una guanosina trifosfato (GTP), una citidina trifosfato (CTP), una uridina trifosfato (UTP), una desoxitimidina trifosfato (dTTP) o una combinación de las mismas. El ADN lineal puede ser un ADN tanto bicatenario como monocatenario. El ADN puede ser un ADN fragmentado tal como ADN circulante. El ADN ligable, si está en forma bicatenaria, necesita ser desnaturalizado antes de la reacción de ligación intramolecular. Una ligasa preadenilada que es ligable intramolecularmente, independiente de la plantilla de las secuencias de ADN monocatenario se puede usar para la reacción de ligación.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para generar un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal, donde el método emplea una etapa de preadenilación de ADN antes de una etapa de ligación intramolecular. El ADN lineal puede incubarse opcionalmente con una polinucleótido cinasa en presencia de adenosina trifosfato (ATP) para generar una secuencia de ADN ligable que comprende un grupo fosfato en un extremo 5' terminal y un grupo hidroxilo en un extremo 3' terminal. La generación de la secuencia de ADN ligable a partir de ADN lineal puede ser preferible si el ADN lineal está en una forma altamente fragmentada. El ADN lineal o la secuencia de ADN ligable se incuba a continuación con una enzima adenilante en presencia de ATP para generar una secuencia de ADN 5' adenilado. La secuencia de ADN 5' adenilada se incuba con una ligasa no adenilada, que es ligable intramolecularmente independiente de la plantilla de la secuencia de ADN 5' adenilado para generar el círculo de ADN monocatenario. Todas las etapas del método se llevan a cabo en un recipiente de reacción único sin que intervenga ninguna etapa de aislamiento o purificación. El ATP puede tener que ser separado de la mezcla de reacción (por ejemplo, tratando la mezcla de reacción con una fosfatasa) antes de la reacción de ligación intramolecular si la ligasa no adenilada es una ligasa dependiente de ATP. Si el ADN 5' adenilado está en forma bicatenaria, necesita desnaturalizarse antes de la reacción de ligación intramolecular.

**Dibujos**

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la invención se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras adjuntas.

La FIG. 1 ilustra una representación esquemática de una forma de realización de una amplificación del genoma completo asistida por ligasa de un ADNbc fragmentado.

La FIG. 2 ilustra los perfiles de tamaño de ADN circulante aislado del plasma sanguíneo de individuos sanos.

La FIG. 3 ilustra la amplificación del genoma completo asistida por ligasa de ADN circulante extraído de la sangre usando diferentes ligasas.

La FIG. 4 ilustra la eficacia de la amplificación del genoma completo asistida por ligasa para la amplificación de ADN sensible y equilibrada de cuatro loci CODIS diferentes.

La FIG. 5 ilustra la eficacia de la amplificación del genoma completo asistida por ligasa para la amplificación sensible y equilibrada de ADN de doce loci CODIS diferente.

La FIG. 6 ilustra las eficiencias de la amplificación del genoma completo asistida por ligasa en diferentes condiciones

de reacción y de tampón.

La FIG. 7 ilustra la inhibición de la amplificación de ADN genómico de alto peso molecular en la amplificación del genoma completo asistida por ligasa.

La FIG. 8 ilustra una representación esquemática de la amplificación del genoma completo asistida por ligasa que incluye el procesamiento (por ejemplo, reparación de extremo) de un ADN fragmentado usando una polinucleótido cinasa seguido de la amplificación asistida por ligasa de ADN fragmentado procesado.

La FIG. 9 ilustra una representación esquemática de una reacción en un único tubo de la amplificación asistida por ligasa de ADN fragmentado usando PNK y CircLigase II™ en presencia de GTP.

La FIG. 10 ilustra una reacción de amplificación asistida por ligasa de un único tubo usando plasma/sangre de hombres y mujeres, donde el marcador DYS14 específico masculino se detecta usando una biblioteca creada a partir de ADN de entrada.

La FIG. 11 ilustra una representación esquemática de la fosforilación y preadenilación de ADN fragmentado, seguido de ligación usando una ligasa sustancialmente no adenilada.

La FIG. 12 ilustra la eficiencia mejorada de circularización de una secuencia de ADN preadenilado usando una ligasa sustancialmente no adenilada.

La FIG. 13 ilustra la eficiencia mejorada de la amplificación del genoma completo asistida por ligasa cuando la secuencia de ADN diana fue preadenilada y cuando la ligación se llevó a cabo usando una ligasa no adenilada.

**Descripción detallada**

La siguiente descripción detallada es ejemplar y no pretende limitar la invención o los usos de la invención. A lo largo de toda la memoria descriptiva, la ejemplificación de términos específicos se considerará como ejemplos no limitantes. Las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El lenguaje aproximado, tal como se usa en la presente memoria y reivindicaciones, puede aplicarse para modificar cualquier representación cuantitativa que podría variar lícitamente sin dar lugar a un cambio en la función básica a la cual se refiere. Por consiguiente, un valor modificado por un término tal como “aproximadamente” no se limitará al valor preciso especificado. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, usados sucesivamente en la memoria y reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener por la presente invención. Por lo menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al ámbito de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos reportados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias. Cuando sea necesario, se han suministrado intervalos, y esos intervalos son inclusivos de todos los subintervalos en los mismos. Para describir y enfatizar de forma más clara y concisa el objeto de la invención reivindicada, se proporcionan las siguientes definiciones de términos específicos, que se usan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “nucleósido” se refiere a un compuesto de glicosilamina donde una base de ácido nucleico (nucleobase) está unida a un resto de azúcar. Un “nucleótido” se refiere a un fosfato de nucleósido. Un nucleótido se puede representar usando letras alfabéticas (designación de la letra) correspondiente a su nucleósido como se describe en la Tabla 1. Por ejemplo, A denota adenosina (un nucleósido que contiene la nucleobase, adenina), C denota citidina, G denota guanosina, U denota uridina y T denota timidina (5-metil uridina). W denota A o T/U, y S denota G o C. N representa un nucleósido aleatorio y dNTP se refiere a desoxirribonucleósidos trifosfato. N puede ser cualquiera de A, C, G o T/U.

Tabla 1: Designación de letras de diversos nucleótidos

| Símbolo de letra | Nucleótido representado por el símbolo de letra |
|---|---|
| G | G |
| A | A |
| T | T |
| C | C |
| U | U |
| R | G o A |
| Y | T/U o C |
| M | A o C |
| K | G o T/U |

| | |
|---|---|
| S | G o C |
| W | A o T/U |
| H | A o C o T/U |
| B | G o T/U o C |
| V | G o C o A |
| D | G o A o T/U |
| N | G o A o T/U o C |

Tal como se usa en el presente documento, el término "análogo de nucleótido" se refiere a compuestos que son estructuralmente análogos a nucleótidos de origen natural. El análogo de nucleótido puede tener una estructura de fosfato, resto de azúcar, nucleobase alteradas, o combinaciones de las mismas. Los análogos de nucleótidos pueden ser un nucleótido natural, un nucleótido sintético, un nucleótido modificado, o un resto de reemplazo sustituido (por ejemplo, inosina). Generalmente, los análogos de nucleótidos con nucleobases alteradas confieren, entre otras cosas, diferentes emparejamientos de bases y propiedades de apilamiento de bases. Tal como se usa en el presente documento, el término "nucleótido LNA (Ácido Nucleico Bloqueado)" se refiere a un análogo de nucleótido, donde el resto de azúcar del nucleótido contiene una unidad de furanosa bicíclica bloqueada en una conformación de azúcar que imita el ácido ribonucleico (ARN). El cambio estructural de un desoxirribonucleótido (o un ribonucleótido) al nucleótido del LNA está limitado desde un punto de vista químico, a saber, la introducción de un enlace adicional entre átomos de carbono en la posición 2' y la posición 4' (por ejemplo, 2'-C, enlace de 4'-C- oximetileno; véase, por ejemplo, Singh, SK, *et al.,* Chem Comm, 4, 455-456, 1998, o Koshkin, A.A., *et al.,* Tetrahedron, 54, 3607-3630, 1998.)). La posición 2' y 4' de la unidad de furanosa en el nucleótido del LNA puede estar enlazada por un O-metileno (por ejemplo, oxi-LNA: 2'-O, nucleótido de 4'-C-metilen-β-D-ribofuranosilo), un S-metileno (tio-LNA), o resto de NH-metileno (amino-LNA) y similares. Tales vínculos limitan la libertad conformacional del anillo de furanosa. Los oligonucleótidos de LNA muestran una afinidad de hibridación potenciada hacia el ARN monocatenario complementario y ADN mono- o bicatenario complementario. Los oligonucleótidos de LNA pueden inducir conformaciones dúplex de tipo A (similares a ARN). Análogos de nucleótidos que tienen la estructura de fosfato-azúcar alterada (por ejemplo PNA, LNA) con frecuencia modifican, entre otras cosas, las propiedades de cadena tales como formación de estructura secundaria. Un signo asterisco (*) que precede a una designación de letra denota que el nucleótido designado por la letra es un nucleótido modificado por fosforotioato. Por ejemplo, *N representa un nucleótido aleatorio modificado por fosforotioato. Un signo más (+) que precede una designación de letra denota el que nucleótido designado por la letra es un nucleótido de LNA. Por ejemplo, +A representa un nucleótido de LNA de adenosina, y +N representa un nucleótido aleatorio bloqueado (es decir un nucleótido de LNA aleatorio).

Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a oligómeros de nucleótidos. El término "ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento se refiere a polímeros de nucleótidos. El término "secuencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido o un ácido nucleico. A lo largo de toda la memoria descriptiva, siempre que un nucleótido o ácido nucleico esté representado por una secuencia de letras, los nucleótidos están en el orden 5'→3' de izquierda a derecha. Por ejemplo, un oligonucleótido representado por una secuencia de letras $(W)_x(N)_y(S)_z$, donde x=2, y=3 y z=1, representa una secuencia de oligonucleótidos WWNNNS, donde W es el nucleótido del extremo 5' y S es el nucleótido del extremo 3'. Los oligonucleótidos o ácidos nucleicos pueden ser un ADN, un ARN, o sus análogos (por ejemplo, análogos de fosforotioato). Los oligonucleótidos o ácidos nucleicos también pueden incluir bases y/o estructuras modificadas (por ejemplo, enlace de fosfato modificado o resto de azúcar modificado). Ejemplos no limitantes de estructuras sintéticas que confieren estabilidad y/u otras ventajas a los ácidos nucleicos pueden incluir enlaces de fosforotioato, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado, xilosa, ácido nucleico o análogos de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido corto lineal que se híbrida con una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, una plantilla de ADN a amplificar) para cebar una reacción de síntesis de ácido nucleico. El cebador puede ser un oligonucleótido de ARN, un oligonucleótido de ADN, o una secuencia quimérica. El cebador puede contener nucleótidos naturales, sintéticos o modificados. Tanto los límites superiores como inferiores de la longitud del cebador se determinan experimentalmente. El límite inferior de la longitud del cebador es la longitud mínima que se requiere para formar un dúplex estable tras la hibridación con el ácido nucleico diana en las condiciones de reacción de amplificación del ácido nucleico. Cebadores muy cortos (normalmente menos de 3 nucleótidos de longitud) no forman dúplex termodinámicamente estables con ácido nucleico diana en tales condiciones de hibridación. El límite superior se determina con frecuencia por la posibilidad de tener la formación de un dúplex en una región diferente de la secuencia de ácido nucleico predeterminada en el ácido nucleico diana. Generalmente, longitudes adecuadas de cebador están en el intervalo de aproximadamente 3 nucleótidos de longitud a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cebador aleatorio" se refiere a una mezcla de secuencias de cebador, generada por la aleatorización de un nucleótido en cualquier lugar dado en una secuencia de oligonucleótidos de forma que la ubicación dada pueda consistir en cualquiera de los posibles nucleótidos o sus análogos (aleatorización completa). Así, el cebador aleatorio es una mezcla aleatoria de secuencias de oligonucleótidos, que consiste en cada combinación posible de nucleótidos dentro de la secuencia. Por ejemplo, un cebador aleatorio de

hexámero puede ser representado por una secuencia NNNNNN o $(N)_6$. Un cebador de ADN aleatorio de hexámero consiste en cualquier combinación de hexámeros posible de 4 nucleótidos de ADN, A, C, G y T, dando lugar a una mezcla aleatoria que comprende $4^6$ (4096) secuencias de oligonucleótidos de ADN de hexámero únicas. Los cebadores aleatorios pueden usarse eficazmente para cebar una reacción de síntesis de ácido nucleico cuando la secuencia del ácido nucleico diana es desconocida o es para la reacción de amplificación del genoma completo.

Como se describe en el presente documento, el término "cebador parcialmente restringido" se refiere a una mezcla de secuencias de cebadores, generados aleatorizando totalmente algunos de los nucleótidos de una secuencia de oligonucleótidos (es decir, el nucleótido puede ser cualquiera de A, T/U, C, G, o sus análogos), mientras se restringe la aleatorización completa de algunos otros nucleótidos (es decir, la aleatorización de los nucleótidos en ciertos lugares son en menor grado que las combinaciones posibles de A, T/U, C, G, o sus análogos). Por ejemplo, un cebador de hexámero de ADN parcialmente restringido representado por WNNNNN, representa una mezcla de secuencias de cebadores donde el nucleótido del extremo 5' de todas las secuencias en la mezcla es A o T. Aquí, el nucleótido del extremo 5' está restringido a dos posibles combinaciones (A o T), en contraste con cuatro combinaciones máximas posibles (A, T, G o C) de un cebador de ADN totalmente aleatorio (NNNNNN). Las longitudes del cebador adecuadas de un cebador parcialmente restringido pueden estar en un intervalo de aproximadamente 3 nucleótidos de longitud a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud.

Tal como se describe en el presente documento, el término "cebador parcialmente restringido que tiene una estructura de cebador-dímero de desajuste de extremos" se refiere a una secuencia de cebador parcialmente restringido, donde cuando dos secuencias de cebadores individuales en el cebador parcialmente restringido se hibridan entre sí intermolecularmente, con una homología interna de tres o más nucleótidos, para formar una estructura de cebador-dímero que no tiene extremos cortados, o una estructura de cebador-dímero que tiene una base monocatenaria de extremos 3' cortados, o una estructura de cebador-dímero que tiene extremos 3' cortados de base de dos nucleótidos, existe un desajuste de nucleótidos (es decir, los nucleótidos no se emparejan por bases) en ambos nucleótidos del extremo 3' en la estructura del cebador-dímero. Por ejemplo, un cebador de pentámero parcialmente restringido representado por WNNNS proporciona un desajuste de extremos en ambos nucleótidos del extremo 3' cuando se híbrida intramolecularmente para formar una estructura de cebador-dímero que no tiene extremos cortados. En la estructura de cebador-dímero, existe una homología interna de tres nucleótidos (es decir, los tres nucleótidos aleatorios en WNNNS pueden emparejarse entre sí cuando la estructura de cebador-dímero que no tiene extremos cortados se forma por la hibridación inter-molecular). Sin embargo, este ejemplo de cebador no proporciona un desajuste de extremos cuando se híbrida intermolecularmente para formar una estructura de cebador-dímero con extremos suspendidos 3' de una base de un solo nucleótido. De igual modo, un cebador de hexámero parcialmente restringido representado por WWNNNS proporciona un desajuste de extremos en ambos nucleótidos del extremo 3' cuando se híbrida intermolecularmente para formar una estructura de cebador-dímero que no tiene extremos suspendidos. Además, este ejemplo de cebador proporciona un desajuste de extremos en ambos nucleótidos del extremo 3' incluso cuando se híbrida intermolecularmente para formar una estructura de cebador-dímero que tiene extremos suspendidos 3' de una base de un solo nucleótido. Un cebador de heptámero parcialmente restringido representado por WWWNNNS ofrece un desajuste de extremos en ambos nucleótidos del extremo 3' cuando se híbrida intermolecularmente para formar una estructura de cebador-dímero que no tiene extremos suspendidos. Además, este ejemplo de cebador proporciona un desajuste de extremos en ambos nucleótidos del extremo 3' cuando se híbrida intermolecularmente para formar una estructura de cebador-dímero que tiene extremos suspendidos 3' de una base un solo nucleótido o para formar una estructura de cebador-dímero que tiene extremos suspendidos 3' de una base un solo nucleótido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "amplificación en círculo rodante (RCA)" se refiere a una reacción de amplificación del ácido nucleico que amplifica una plantilla de ácido nucleico circular (por ejemplo, círculos de ADN monocatenario) mediante un mecanismo en círculo rodante. La reacción de amplificación en círculo rodante se inicia por la hibridación de un cebador con una plantilla de ácido nucleico, con frecuencia monocatenario, circular. La polimerasa del ácido nucleico extiende a continuación el cebador que se híbrida a la plantilla de ácido nucleico circular progresando continuamente alrededor de la plantilla de ácido nucleico circular para replicar la secuencia de la plantilla de ácido nucleico una y otra vez (mecanismo en círculo rodante). La amplificación en círculo rodante produce típicamente concatémeros que comprenden unidades de repetición en tándem de la secuencia de la plantilla de ácido nucleico circular. La amplificación en círculo rodante puede ser una RCA lineal (LRCA), mostrando cinética de amplificación lineal (por ejemplo, RCA que usa un solo cebador específico), o puede ser una RCA exponencial (ERCA) mostrando cinética de amplificación exponencial. La amplificación en círculo rodante también puede realizarse usando múltiples cebadores (amplificación en círculo rodante con cebado múltiple o MPRCA) que conduce a concatémeros hiperramificados. Por ejemplo, en una RCA cebada dos veces, un cebador puede ser complementario, como en el RCA lineal, a una plantilla de ácido nucleico circular, mientras que el otro puede ser complementario a las secuencias de ácidos nucleicos de la unidad de repetición en tándem del producto RCA. Por consiguiente, la RCA cebada dos veces puede proceder como una reacción en cadena con cinética de amplificación exponencial (geométrica) que caracteriza una cascada de ramificación de hibridación múltiple, extensión de cebadores y eventos de desplazamiento de cadena que involucran a ambos cebadores. Esto con frecuencia genera un conjunto discreto de productos de amplificación de ácido nucleico bicatenario concatemérico. La amplificación en círculo rodante puede llevarse a cabo *in vitro* en las condiciones isotérmicas usando una polimerasa de ácido nucleico adecuada, tal como la ADN polimerasa Phi29.

Tal como se usa en el presente documento, la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) se refiere a un método de amplificación del ácido nucleico, donde la amplificación implica las etapas de apareamiento de un cebador con un ácido nucleico desnaturalizado seguido de una síntesis de ácido nucleico por desplazamiento de cadena. Puesto que el ácido nucleico se sintetiza por desplazamiento de cadena, se produce un número gradualmente creciente de eventos de cebado, formando una red de estructuras de ácidos nucleicos hiperramificadas. La MDA es muy útil para la amplificación del genoma completo para generar ADN de alto peso molecular con sesgo de secuencia limitado a partir de una pequeña cantidad de muestra de ADN genómico. Cualquier polimerasa de ácido nucleico de desplazamiento de cadena que tiene una actividad de desplazamiento de cadena aparte de la actividad de síntesis de ácido nucleico, tal como una ADN polimerasa Phi29 o un fragmento grande de ADN polimerasa Bst puede usarse en MDA. MDA se realiza con frecuencia en condiciones de reacción isotérmica, usando cebadores aleatorios para lograr la amplificación con sesgo de secuencia limitada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ligasa preadenilada” se refiere a una ligasa que está en forma adenilada. La forma adenilada de una ligasa es capaz de ligar intramolecularmente una molécula de ADNmc lineal que tiene un grupo 5’ fosforilo y un grupo 3’ hidroxilo en ausencia de ATP o dATP. Una ligación que usa una ligasa preadenilada se refiere a una reacción de ligación donde una alta proporción de las moléculas de ligasa que se usan en la reacción están en su forma adenilada. En general, más de un 60% de las moléculas de ligasa pueden estar en su forma adenilada. En algunas formas de realización, cuando se lleva a cabo una reacción de ligación usando una ligasa preadenilada, más de un 70% de las moléculas de ligasa usadas para la reacción pueden estar en su forma adenilada. En algunas otras formas de realización, cuando se lleva a cabo una reacción de ligación usando una ligasa preadenilada, más de un 80%, 90% o 95% de las moléculas de ligasa usadas para la reacción pueden estar en su forma adenilada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “enzima adenilante” se refiere a una enzima que es capaz de adenilar una secuencia nucleica para generar un ácido nucleico 5’ adenilado. El ácido nucleico 5’ adenilado tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que tiene un grupo 3’ hidroxilo en su extremo y tiene un nucleótido de extremo adenilado en su extremo 5’. Por ejemplo, un ADN 5’ adenilado (AppADN), se refiere a una secuencia de ADN que está adenilada en su extremo 5’ y tiene un grupo hidroxilo en su extremo 3’.

Tal como se usa en el presente documento, el término ‘ligasa no adenilada” se refiere a una ligasa que está en su forma no adenilada. La forma no adenilada de la ligasa es capaz de ligar intramolecularmente una molécula de ADNmc 5’-adenilada, lineal que tiene un grupo 3’ hidroxilo en ausencia de ATP o dATP. Una ligación que usa una ligasa no adenilada se refiere a una reacción de ligación donde una alta proporción de las moléculas de ligasa que se usan en la reacción están en su forma no-adenilada. En general más de un 60% de las moléculas de ligasa pueden estar en su forma no adenilada. En algunas formas de realización, cuando se lleva a cabo una reacción de ligación usando una ligasa no adenilada, más de un 70% de las moléculas de ligasa usadas para la reacción pueden estar en su forma no-adenilada. En algunas otras formas de realización, cuando se lleva a cabo una reacción de ligación usando una ligasa no adenilada, más de un 80%, 90% o 95% de las moléculas de ligasa usadas para la reacción pueden estar en su forma no adenilada.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para generar un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal. El ADN lineal puede ser un ADN lineal fragmentado. El ADN fragmentado puede ser un ADN circulante, un ADN antiguo o un ADN degradado por la exposición ambiental, o un ADN fijado con formalina. La longitud de un ADN lineal fragmentado puede variar de 15 nucleótidos a 21000 nucleótidos. El ADN lineal fragmentado puede comprender secuencias que tienen extremos terminales no ligables. Por ejemplo, el ADN lineal puede tener un grupo 5’ hidroxilo o un grupo 3’ fosforilo o ambos. En algunas formas de realización, el método comprende las etapas que proporcionar un ADN lineal, reparar los extremos de ADN lineal incubándolo con un polinucleótido cinasa (PNK) en presencia de un donador de fosfato para generar una secuencia de ADN ligable que tiene un grupo fosfato a un extremo 5’ terminal y un grupo hidroxilo en un extremo 3’ terminal, y llevar a cabo una ligación intramolecular de la secuencia de ADN ligable con una ligasa para generar el círculo de ADN monocatenario. La reparación del extremo puede incluir la fosforilación de un nucleótido del extremo 5’, desfosforilación de un nucleótido del extremo 3’ o ambos para generar una secuencia de ADN ligable. El ADN ligable, con los extremos reparados, si está en forma bicatenaria, necesita ser desnaturalizado antes de la reacción de ligación intramolecular. En algunas formas de realización, el ADN se desnaturaliza antes de la reacción PNK. La fosforilación o desfosforilación de ADN monocatenario es generalmente más eficiente que las de los extremos 5’ romos o rehundidos bicatenarios. El donador de fosfato y su concentración en la mezcla de reacción se seleccionan de tal manera que no inhiben la posterior reacción de ligación intramolecular. Cualquier donador de fosfato adecuado distinto de adenosina trifosfato (ATP) o desoxiadenosina trifosfato (dATP) se puede usar para la reacción de reparación de extremos usando PNK. Donadores de fosfato adecuados incluyen, pero no están limitados a, guanosina trifosfato (GTP), citidina trifosfato (CTP), uridina trifosfato (UTP) o desoxitimidina trifosfato (dTTP). En algunas formas de realización se usa una ligasa preadenilada para la reacción de ligación. Puede emplearse cualquier ligasa preadenilada que sea capaz de secuencias de ADN monocatenario independiente de la plantilla. En algunas formas de realización se usa una forma sustancialmente adenilada de ARN ligasa TS2126 para la reacción de ligación intramolecular independiente de la plantilla. La reacción de cinasa y la reacción de ligación se llevan a cabo en ausencia de ATP y/o dATP. Todas las etapas del método se llevan a cabo en un único recipiente de reacción sin que intervengan etapas de aislamiento o purificación. Las etapas individuales de los métodos se pueden llevar a cabo de forma simultánea o secuencial sin que intervenga ninguna etapa de purificación o aislamiento. Por ejemplo, se puede añadir PNK junto con GTP a un recipiente de reacción (por ejemplo, tubo eppendorf) que contiene

una solución de ácido nucleico que comprende el ADN diana lineal para facilitar la reparación de extremo de ADN lineal diana. Cualquier PNK que tenga una actividad de 5'-fosforilación y 3'-fosfatasa (por ejemplo, T4 PNK) puede usarse para la reacción de reparación del extremo. También puede usarse una combinación de PNKs, cada de las cuales tiene 5'-fosforilación o una 3'-fosfatasa para la reacción de reparación de extremo. Una vez que se completa la reacción de cinasa, se puede añadir una ligasa preadenilada al mismo recipiente de reacción para facilitar la reacción de ligación intramolecular.

El ADN lineal puede ser un ADN bicatenario o monocatenario de origen natural o sintético. El ADN se puede obtener de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra obtenida de un sujeto biológico) o descubierto de objetos desconocidos (por ejemplo, ADN obtenido durante una investigación forense) *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, puede obtenerse de, pero sin limitarse a, fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, leche, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, linfa, lágrimas, esputo, saliva, heces, aspirado pulmonar, garganta o frotis genitales), órganos, tejidos, cultivos celulares, fracciones celulares, secciones (por ejemplo, porciones de secciones de un órgano o tejido) o células aisladas del sujeto biológico o de una región particular (por ejemplo, una región que contiene las células enfermas, o células tumorales circulantes) del sujeto biológico. La muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene ADN lineal diana (por ejemplo, ADN lineal de interés) puede ser de origen eucariota, origen procariota, origen viral u origen bacteriófago. Por ejemplo, el ADN lineal diana puede obtenerse de un insecto, un protozoo, un ave, un pez, un reptil, un mamífero (por ejemplo, rata, ratón, vaca, perro, cobayo o conejo), o un primate (por ejemplo, chimpancé o ser humano). El ADN lineal puede ser un ADN genómico o un ADNc (ADN complementario). El ADNc puede generarse de una plantilla de ARN (por ejemplo, ARNm, ARN ribosómico) usando una enzima transcriptasa inversa. El ADN lineal puede ser un ADN fragmentado y puede tener nucleótidos de extremo no ligables. Por ejemplo, el ADN lineal puede comprender un "grupo 5' hidroxilo y/o un grupo 3' fosfato tal que una ligasa de ADN no puede llevar a cabo una reacción de ligación intramolecular. El ADN lineal puede dispersarse en solución o puede inmovilizarse en un soporte sólido, tal como en transferencias, ensayos, matrices, portaobjetos de vidrio, placas de microvaloración o placas ELISA. Por ejemplo, el ADN lineal puede inmovilizarse sobre un sustrato a través de un cebador y luego puede circularizarse y amplificarse.

Cuando el ADN lineal está en una forma bicatenaria, esta necesita desnaturalizarse a una forma monocatenaria antes de la reacción de ligación intramolecular. Esto puede conseguirse usando cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica para la conversión de ADNbc a secuencias de ADNmc. Por ejemplo, el ADNbc puede desnaturalizarse térmicamente, desnaturalizarse químicamente o desnaturalizarse tanto térmicamente como químicamente. El ADN bicatenario puede desnaturalizarse químicamente usando un desnaturalizante (por ejemplo, glicerol, etilenglicol, formamida, urea o una combinación de los mismos) que reduce la temperatura de fusión del ADNbc. El agente desnaturalizante puede reducir la temperatura de fusión en 5°C a 6°C por cada 10% (vol./vol.) de desnaturalizante añadido a la mezcla de reacción. El desnaturalizante o combinación de desnaturalizantes (por ejemplo, 10% de glicerol y 6-7% de etilenglicol) puede comprender 1%, 5%, 10%, 15%, 20% o 25% de la mezcla de reacción (vol./vol.). En los tampones de reacción pueden incluirse sales que reducen la rigurosidad de la hibridación en bajas concentraciones para desnaturalizar químicamente el ADNbc a bajas temperaturas. El ADNbc puede desnaturalizarse térmicamente calentando el ADNbc, por ejemplo, a 95°C.

Después de la etapa de desnaturalización, el ADNmc puede tratarse con una ADN o ARN ligasa que es capaz de ligar intramolecularmente sustratos de ADNmc en ausencia de una plantilla para formar círculos de ADN monocatenario. Ligasas adecuadas que pueden usarse para la reacción de ligación incluyen, pero sin limitarse a, ARN ligasa TS2126, ADN ligasa T4, ADN ligasa T3 o ADN ligasa de *E. coli.* La conversión de las moléculas de ADN monocatenario lineal a círculos de ADN monocatenario se lleva a cabo convencionalmente mediante una reacción de ligación intramolecular dependiente de la plantilla usando una enzima de ligación como la ARN ligasa T4. Sin embargo, la ligación intramolecular dependiente de la plantilla de ADN monocatenario o ARN monocatenario se ha cumplido solo con un éxito limitado, en particular cuando la circularización de las moléculas de ADNmc se lleva a cabo en una población de moléculas de ADNmc de secuencia y/o tamaño desconocidos. Aunque el bacteriófago ARN ligasa T4 I muestra una actividad de ligación intramolecular independiente de la plantilla, esta actividad es demasiado baja e ineficiente para el uso práctico en la generación de las moléculas de ADNmc circular de las moléculas de ADNmc lineal.

En algunas formas de realización, la conversión de ADNmc a círculo de ADN monocatenario se lleva a cabo con una ARN ligasa termoestable que tiene buena actividad de ligación intramolecular independiente de la plantilla para el ADNmc lineal y/o sustratos de ARNmc que tienen grupos 5' fosforilo y 3' hidroxilo. La ligasa puede estar en una forma sustancialmente preadenilada. Por ejemplo, la ARN ligasa TS2126 derivada del bacteriófago Thermus TS2126 que infecta la bacteria termófila, *Thermus scotoductus* puede usarse para la circularización independiente de la plantilla de ADNmc lineal fragmentado a ADNmc circular. La ARN ligasa TS2126 es más termoestable (estable hasta aproximadamente 75°C.) que muchas de los ARN ligasas mesófilas tales como la ARN ligasa T4. El intervalo de temperatura para la actividad de ARN ligasa TS2126 puede ser mayor de aproximadamente 40°C, por ejemplo, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 75°C. Debido a esto, la ARN ligasa TS2126 puede usarse a mayores temperaturas, que reducen aún más las estructuras secundarias no deseadas de ADNmc. La circularización de ADNmc lineal también puede conseguirse por una ligasa diferente a ARN ligasa TS2126 o empleando cualquier otra enzima que tiene actividad de unión de ADN tal como la topoisomerasa. En algunas formas de realización, la circularización de la molécula de ADN monocatenario fragmentado se consigue por una ARN ligasa 1 derivada de arqueobacterias termófilas, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth ARN ligasa) que tienen una actividad de ligasa independiente de la plantilla en la circularización de moléculas de ADNmc fragmentado lineal.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para mejorar la eficiencia de circularización de ADNmc por ARN ligasa TS2126. El uso del tampón HEPES con un pH 8,0 para la reacción de ligación aumentó la eficiencia de ligación. La ligación de ADNmc independiente de la plantilla era ineficaz cuando la reacción se llevaba a cabo en tampón TRIS (por ejemplo, para CircLigase™ II, el tampón de reacción 10x sugerido por EpiCenter comprende Trisa 0,33 M-acetato (pH 7,5), acetato de potasio 0,66 M y DTT 5 mM). Además, el manganeso, un cofactor esencial para la reacción de ligación, se oxida rápidamente en condiciones alcalinas y forma un precipitado en presencia de TRIS. La oxidación por aire de $Mn^{2+}$ a $Mn^{3+}$ puede verse facilitada por los aniones que pueden complejar fuertemente los iones $Mn^{3+}$. Por ejemplo, cuando se mezclaron volúmenes iguales a 0,2 mol/litro de Tris con pH ajustado apropiadamente con HCl y 2 mmol/litro de $MnCl_2$, el cambio de color fue inmediato a pH 9,3 (el pH de la base TRIS solo); tenía un lapso de tiempo inicial de aproximadamente 3 minutos a pH 8,5; y no fue detectable en 1 hora a valores de pH por debajo de 8,3. Aunque la reacción no se produjo con un pH más bajo, los cambios observados con un pH más alto no se invirtieron añadiendo ácido. Debido a la rápida oxidación de manganeso en tampón TRIS, una mayor concentración de manganeso es esencial para la reacción de ligación (por ejemplo, la adición de $MnCl_2$ a una concentración final de 2,5 mM) cuando la ligación intramolecular se lleva a cabo en tampón TRIS. Además, se hace difícil predecir con precisión la concentración de trabajo de manganeso en la reacción puesto que la concentración de manganeso continúa disminuyendo con el tiempo. Mayores concentraciones de manganeso pueden conducir a mayores tasas de error de la polimerasa durante la amplificación cuando la ligación y la amplificación se llevan a cabo en un único recipiente de reacción. Sustituyendo el tampón TRIS con tampón HEPES en la reacción de ligación, puede conseguirse una ligación intramolecular efectiva con una concentración de iones de manganeso menor de 0,5 mM. Además de HEPES, para la reacción de ligación intramolecular puede usarse cualquiera de los tampones de Good (véase, por ejemplo, Good, Norman *et al.,* Biochemistry, 5(2): 467-477, 1966, y Good, Norman *et al.,* Methods Enzymol., 24: 53-68, 1972).

Los círculos de ADNmc en la mezcla de reacción de ligación pueden amplificarse en condiciones isotérmicas mediante métodos de amplificación en círculo rodante (RCA). Los reaccionantes de amplificación que incluyen ADN polimerasa, cebadores y dNTPs pueden añadirse al mismo recipiente de reacción para producir una mezcla de reacción de amplificación e iniciar una reacción de RCA. La mezcla de reacción de amplificación puede incluir adicionalmente reactivos tales como proteínas de unión a ADN monocatenario y/o tampones de reacción de amplificación adecuados. La amplificación de círculos de ADNmc se lleva a cabo en el mismo recipiente de reacción en el que se lleva a cabo la ligación. El aislamiento o purificación de los círculos de ADNmc y/o la eliminación de la ligasa no es necesaria antes de la reacción de amplificación. El ADN amplificado puede detectarse por cualquiera de los métodos conocidos actualmente para la detección de ADN.

El RCA puede llevarse a cabo usando cualquiera de las ADN polimerasas que son conocidas en la técnica tales como una ADN polimerasa Phi29. Esto puede llevarse a cabo usando una mezcla de cebadores aleatorios o usando un cebador específico. En algunas formas de realización, los cebadores aleatorios se usan para la reacción de RCA. También pueden usarse secuencias de cebadores que comprenden uno o más análogos de nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de LNA, 2-Amino-A, o modificación de 2-Tio T). En algunas formas de realización, se emplean cebadores resistentes a nucleasa (por ejemplo, secuencias de cebadores que comprenden grupos fosforotioato en las posiciones apropiadas) para las reacciones de amplificación (por ejemplo, NNNN*N*N). En algunas formas de realización, RCA puede llevarse a cabo poniendo en contacto los círculos de ADNmc con una solución de cebador que comprende una mezcla de cebadores aleatorios para formar un complejo de cebador-plantilla de ácido nucleico; poniendo en contacto el complejo de cebador-plantilla del ácido nucleico con una ADN polimerasa y desoxirribonucleósidos trifosfato; y amplificando la plantilla de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la solución de cebadores comprende un cebador parcialmente restringido tal como WWNNS. El cebador parcialmente restringido puede tener una estructura de cebador-dímero desajustada en los extremos terminales. En algunas formas de realización, un cebador parcialmente restringido que consiste en una secuencia de nucleótidos $(W)_x(N)_y(S)_z$, donde x, y, z son valores enteros independientes entre sí, y donde el valor de x es 2 o 3 , el valor de y es 2, 3 o 4, y el valor de z es 1 o 2 se usan para la reacción RCA. El cebador parcialmente restringido puede comprender uno o más análogos de nucleótidos. En algunas formas de realización, para la reacción RCA se usa un cebador parcialmente restringido, resistente a nucleasa que comprende un nucleótido modificado, y que tiene estructura de cebador-dímero con desajuste de extremos terminales. Secuencias de cebadores adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, +W+WNNS, W+W+NNS, +W+WNNNS, W+W+NNNS, W+W+NN*S, +W+WNN*S, W+W+NNN*S, +W+WNNN*S, W+W+N*N*S, +W+WN*N*S, W+W+NN*N*S, o +W+WNN*N*S. En algunas formas de realización, la reacción RCA se lleva a cabo poniendo en contacto el círculo de ADNmc con una solución de cebador que consiste esencialmente en una mezcla de cebadores parcialmente restringidos que comprende una estructura de cebador-dímero de desajuste de extremos terminales y amplificar el círculo de ADNmc. En algunas otras formas de realización, la reacción RCA se lleva a cabo poniendo en contacto el círculo de ADNmc con una solución de cebadores que consiste esencialmente en una mezcla de cebadores parcialmente restringidos que comprende un análogo de nucleótido y amplificar el círculo de ADNmc. El RCA de círculos de ADNmc produce grandes cantidades de ADN con reducido fracaso de secuencia y reducido sesgo de amplificación. Todo el proceso de ligación de ADNmc y amplificación puede llevarse a cabo en un único tubo sin que intervengan etapas de purificación o aislamiento.

En algunas formas de realización, se proporcionan métodos para la amplificación de cantidades limitantes de ADN lineal fragmentado mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA). Los métodos convencionales de MDA, cuando se intentan en un ADN lineal fragmentado, dan lugar a una menor velocidad de amplificación y amplificación

de secuencia altamente sesgada. Por otro lado, se observa con frecuencia significativo fracaso de secuencia en particular cerca de los extremos de ADN fragmentado. Para superar estas limitaciones, el ADNbc fragmentado se convierte primero en un ADNmc. El ADNmc se convierte luego en un ADN circular monocatenario (es decir, círculo de ADN) mediante una reacción de ligación intramolecular independíente de la plantilla, eliminando de este modo los extremos de ADN problemáticos. Incluso secuencias de ADNmc que son más cortas de 500 pb pueden circularizarse usando ligación intramolecular independiente de la plantilla de ADNmc. Además, no se necesita ningún conocimiento previo de la secuencia diana para crear círculos de ADN cuando la ligación de ADNmc se lleva a cabo de una forma independiente de la plantilla. Antes de la circularización, el ADN fragmentado puede tratarse con un PNK para reparar los extremos terminales no ligables. Después de la circularización de ADNmc fragmentado, el MDA se lleva a cabo sobre el ADN circularizado. La reacción de amplificación puede realizarse en condiciones isotérmicas empleando métodos de amplificación en círculo rodante (RCA). La RCA puede realizarse usando kits de amplificación de RCA disponibles comercialmente tales como el kit TempliPhi™ RCA (GE Healthcare). La amplificación en círculo rodante con TempliPhi® emplea cebadores aleatorios que contienen ácido nucleico bloqueado, que proporciona un mayor equilibrio de sensibilidad y amplificación. En algunas formas de realización, se usan cebadores resistentes a nucleasa para la reacción de RCA. Los métodos descritos en el presente documento mejoran la sensibilidad de la amplificación, reducen el fracaso de secuencia y posibilitan una amplificación más equilibrada. Puesto que la circularización independiente de la plantilla de ADN monocatenario fragmentado puede conseguirse en secuencias más cortas incluso en concentraciones menores, puede conseguirse una amplificación de ADN más equilibrada con cinética más rápida y una mejor cobertura de secuencia cuando se usa amplificación del genoma completo asistida por ligasa para la amplificación de ADN altamente fragmentado (por ejemplo, el ADN circulante en plasma sanguíneo). Por ejemplo, la longitud de persistencia de ADNmc puede ser de tan solo 15 nucleótidos para la circularización independiente de la plantilla de ADNmc. Cuando se emplea CircLigase™ para la reacción de ligación, en condiciones normales, prácticamente no se producen concatémeros lineales o circulares. Además, tanto las reacciones de circularización como de amplificación pueden llevarse a cabo en un único recipiente de reacción sin que intervengan etapas de purificación o aislamiento, reduciendo de este modo las posibilidades de contaminación y simplificando el flujo de trabajo de amplificación. Los métodos de amplificación del genoma completo asistida por ligasa pueden emplearse para, pero sin estar limitados a, analizar ADN circulante en plasma, ADN fragmentado aislado de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE), muestras de ADN para pruebas forenses que han sido expuestas a condiciones ambientales o muestras de ADN antiguo. La biblioteca amplificada puede usarse además para la detección selectiva de secuencias amplificadas por RCPc o secuenciación.

Varios métodos de amplificación del genoma completo asistida por ligación descritos en el presente documento que comprenden ligación previa de fragmentos de ADNmc a círculos de ADN, seguida de amplificación en círculo rodante, proporcionan amplificación preferencial de un ADN fragmentado sobre un ADN genómico de alto peso molecular. Por ejemplo, preparaciones de plasma que comprenden ADN circulante con frecuencia pueden estar contaminadas con ADN genómico que es liberado de células sanguíneas durante el proceso de purificación. Métodos convencionales de amplificación del genoma completo a través de MDA amplifican tanto el ADN circulante como el ADN genómico. En contraste, cuando moléculas de ADN circulante fragmentado se circularizan primero con ARN TS2126 seguido de amplificación de las moléculas de ADN circularizadas por RCA empleando una ADN polimerasa Phi29 el circulante se amplificó preferiblemente sobre el ADN genómico de alto peso molecular. Tal amplificación preferencial de ADN fragmentado sobre el ADN genómico es particularmente adecuada para aplicaciones diagnósticas puesto que el ADN relevante desde un punto de vista diagnóstico puede amplificarse preferiblemente para el análisis corriente abajo (véase, Ejemplo 4). Además, la amplificación del genoma completo asistida por ligasa posibilita una amplificación más robusta de ADN fragmentado en comparación con una amplificación del genoma completo basado en MDA convencional.

La FIG. 1 muestra una representación esquemática de una forma de realización de amplificación del genoma completo asistida por ligasa de un ADNbc fragmentado. La longitud de persistencia de ADN bicatenario es mucho mayor (~150 pb) y su rigidez innata hace que la circularización de los fragmentos menores de 500 pb sea altamente ineficiente. Además, con moléculas pequeñas de ADN bicatenario fragmentado en un intervalo de aproximadamente 250 pb, la circularización es ineficaz a menos que los extremos están en la alineación adecuada (~10,5 pb/vuelta). En contraste, la longitud de persistencia de la circularización de ADN monocatenario fragmentado es muy pequeña, aproximadamente 15 nucleótidos, al comparar con el ADN bicatenario fragmentado. Como se muestra en la FIG. 1, en la amplificación del genoma completo asistida por ligasa, el ADNmc fragmentado se convierte primero en círculos de ADN monocatenario. Esto puede conseguirse incubando el ADN bicatenario fragmentado a 95°C durante un periodo suficiente para desnaturalizar el ADNbc en cadenas sencillas. El ADNmc fragmentado se trata entonces con una ADN o ARN ligasa que es capaz de ligación intramolecular independiente de la plantilla de los sustratos de ADN monocatenario para generar los círculos de ADN monocatenario. Ejemplos no limitantes de ligasas que pueden usarse para la ligación intramolecular incluyen, CircLigase™, ADN ligasa T3, ARN ligasa T4, ARN ligasa Mth (MthRn11), o ligasa de *E. Coli*. Los reactivos de amplificación, incluyendo ADN polimerasa, cebadores aleatorios y dNTPs se agregan entonces para iniciar una reacción RCA en los círculos de ADN monocatenario. Esta amplificación del genoma completo asistida por ligasa que usa RCA produce grandes cantidades de ADN con fracaso de secuencia y sesgo de amplificación reducidos en contraste con los métodos de amplificación de genoma completo convencionales. Por tanto, esto puede usarse para amplificar y detectar incluso ADN altamente fragmentado. Todo el proceso de generación de los círculos de ADN monocatenario y su posterior amplificación por RCA se lleva a cabo en un único tubo sin que intervenga ninguna etapa de purificación.

En algunas formas de realización, se proporciona un flujo de trabajo de un único tubo para la amplificación del genoma completo asistida por ligasa de ADN fragmentado que incluye el procesamiento de ADN fragmentado para reparar los extremos de ADN no ligables. Por ejemplo, si un ADN monocatenario fragmentado no contiene un grupo 5' fosforilo y un grupo 3' hidroxilo, es posible que no se ligue en una reacción de ligación intramolecular. La presencia de tales secuencias de ADN no ligables puede causar un sesgo de amplificación en la amplificación del genoma completo asistida por ligasa. Por ejemplo, como se representa esquemáticamente en la FIG. 8, fragmentos de ADN que se generan por digestión con ADNasa II durante la muerte celular puede contener un grupo 5' hidroxilo, un grupo 3' fosforilo. Los fragmentos de ADN monocatenario que se originan de dichos fragmentos de ADN bicatenario que contienen un grupo 5' hidroxilo, un grupo 3' fosforilo, no se circularizan en una reacción de ligación intramolecular. Así, es probable que las rupturas de tipo ADNasa II estén infrarrepresentadas en la amplificación del genoma completo. En algunas formas de realización, el ADN fragmentado se trata con una cinasa (por ejemplo, un polinucleótido cinasa T4, TPK) para fosforilar los grupos 5' hidroxilo y/o desfosforilar el grupo 3' fosforilo del ADN fragmentado. La inclusión de cinasa en la reacción permite una circularización eficiente de los fragmentos en un conjunto que no contiene un 5' fosfato. La fosforilación de los extremos 5' de ADN fragmentado con una cinasa seguido de amplificación de ADN fragmentado crea una biblioteca más representativa.

En algunas formas de realización, la reparación de la fosforilación de ADNbc fragmentado puede llevarse a cabo usando una PNK cinasa T4. La reparación de fosforilación puede llevarse a cabo bien en el ADNbc fragmentado o en el ADNmc fragmentado desnaturalizado. Si la reparación de fosforilación se lleva a cabo en el ADNbc, el ADNbc reparado puede desnaturalizarse a continuación a un ADNmc lineal, que seguidamente puede circularizarse usando una CircLigase™ II (abreviado como CLII). CircLigase II™ comprende una forma sustancialmente adenilada de ARN ligasa TS2126. La ligación intramolecular independiente de la plantilla de ADNmc por CircLigase II™ es inhibida por concentraciones mayores de ATP o dATP. Sin embargo, la reparación de la fosforilación por cinasa con frecuencia requiere la presencia de ATP. Adicionalmente, puede que no sea fácil eliminar el ATP de la mezcla de reacción sin dañar el ADN. Por ejemplo, un tratamiento con fosfatasa de la mezcla de reacción para eliminar ATP también tendrá como resultado la desfosforilación de ADN (a menos que el ADN está protegido, por ejemplo, por preadenilación), haciendo que cadenas de ADN no ligables. Como resultado, llevar a cabo una reparación de fosforilación de ADN fragmentado y generación de los círculos de ADNmc en un único tubo sin que intervengan etapas de purificación y aislamiento es con frecuencia difícil. Los métodos proporcionados en el presente documento usan GTP, CTP, UTP o dTTP en lugar de ATP durante la reacción de cinasa. Puesto que la CircLigase II™ es más tolerante a GTP o un donador de fosfato alternativo (por ejemplo, CTP o UTP), la etapa de reparación de cinasa y la etapa de ligación se pueden llevar a cabo en un único recipiente de reacción sin que intervenga ninguna etapa de purificación y/o aislamiento. La mezcla de reacción de cinasa puede comprender además reactivos adicionales tales como sales de manganeso y betaína (trimetilglicina de ion híbrido). Una vez ligados, los círculos de ADNmc se pueden amplificar. Llevando a cabo la ligación y reacción de amplificación en una concentración relativamente baja de GTP, el flujo de trabajo de un único tubo descrito en el presente documento evita las etapas intermedias de limpieza entre tratamientos enzimáticos y minimiza la pérdida de la plantilla de ADN (véase la FIG. 9 para una representación esquemática de un flujo de trabajo de un único tubo que incluye reparación, ligación y amplificación de cinasa).

En algunas formas de realización, se proporciona un método alternativo para generar un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal, donde el método emplea una etapa de preadenilación de ADN antes de la etapa de ligación intramolecular. Primero, el ADN lineal puede incubarse con una polinucleótido cinasa en presencia de ATP para generar una secuencia de ADN ligable que comprende un grupo fosfato en un extremo 5' terminal y un grupo hidroxilo en el extremo 3' terminal. La secuencia de ADN ligable se incuba entonces con una enzima de adenilación en presencia de adenosina trifosfato para generar una secuencia de ADN 5' adenilado. La secuencia de ADN 5' adenilado tiene un grupo 3' hidroxilo libre. La concentración de ATP en la reacción de ligación está seleccionada de modo que no se produce adenilación en el extremo 3' de la secuencia de ADN ligable. La secuencia de ADN 5' adenilado se incuba entonces con una ligasa no adenilada, que es ligable intramolecularmente independiente de la plantilla de la secuencia de ADN 5' adenilado, para generar el círculo de ADN monocatenario. Si se emplea una ligasa no adenilada dependiente de ATP para la reacción de ligación intramolecular, el ATP se elimina de la mezcla de reacción tratando la mezcla de reacción con una fosfatasa antes de la reacción de ligación intramolecular. El 5' fosfato en el nucleótido terminal de ADN, que normalmente se eliminaría por una fosfatasa, está protegido del tratamiento con fosfatasa debido a la preadenilación. Si El ADN está en forma bicatenaria, es necesario desnaturalizarlo antes de la reacción de ligación intramolecular. Todas las etapas del método se llevan a cabo en un único recipiente de reacción sin intervención de ninguna etapa de aislamiento o purificación.

En algunas formas de realización, una ARN ligasa, tal como ARN ligasa I derivada de arqueobacteria termófila, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (ARN ligasa 1 Mth) se usa en presencia de ATP para generar la forma adenilada del ADN lineal. Puede usarse una ligasa independiente de ATP mutante o diseñada adecuadamente que es defectuosa en la autoadenilación, desadenilación y/o transferencia de adenilado para la reacción de ligación intramolecular de ADN lineal adenilado para generar el círculo de ADN monocatenario. Por ejemplo, se puede usar un mutante de lisina de motivo V (K246A) de ARN ligasa Mth. Este mutante tiene una actividad de ligación completa con sustratos preadenilados. También puede usarse ARN ligasa Mth mutante que tiene una sustitución de alanina para la lisina catalítica en el motivo I (K97A). La actividad del mutante K97A es similar bien con el ARN preadenilado o bien con ADN monocatenario (ADNmc) como sustratos donadores pero tiene una preferencia del doble para ARN como un sustrato aceptor en comparación con ADNmc con una secuencia idéntica. Si se emplean ligasas dependientes de ATP

tales como ARN ligasa TS2126 para la reacción de ligación intramolecular de las secuencias de ADN 5' adeniladas, el ATP puede tener que eliminarse antes de la reacción de ligación.

En algunas formas de realización, se proporciona amplificación del genoma completo asistida por ligasa empleando el flujo de trabajo alternativo. Una representación esquemática de este flujo de trabajo se proporciona en la FIG. 11. El método comprende la reparación de ADN fragmentado con una cinasa y preadenilación de ADN fragmentado en el extremo 5' con una ARN o ADN ligasa en presencia de ATP antes de la ligación y amplificación. Los ADN fragmentado que comprenden secuencias que tienen extremos no ligables (por ejemplo, secuencias que comprenden grupos hidroxilo 5' y/o grupos fosforilo 3') son fosforilados en los extremos 5' y desfosforilados en los extremos 3' tratando con una cinasa para generar una secuencia de ADN ligable. La secuencia de ADN ligable puede adenilarse entonces usando una ARN ligasa, tal como una ARN ligasa Mth (MthRnl 1), en presencia de ATP para generar una forma adenilada de ADN fragmentado. El ATP se elimina a continuación de la mezcla de reacción tratando la mezcla de reacción con una fosfatasa (por ejemplo fosfatasa alcalina de camarón (SAP)). Puede emplearse cualquier método que esté disponible en la técnica para la adenilación del 5' de un ADN (por ejemplo, ARN ligasa, ADN ligasa o métodos sintéticos). El ADN lineal monocatenario preadenilado se trata entonces con una ARN ligasa que tiene un bajo grado de adenilación tal como CircLigase I™ para generar círculos de ADN por ligación intramolecular. Los círculos de ADN se amplifican usando RCA. En formas de realización donde se usa CircLigase I™ para generar círculos de ADN mediante ligación intramolecular, la ligación intramolecular de ADN y posterior reacción de amplificación se llevan a cabo en ausencia de ATP. La eliminación de ATP de la mezcla de reacción después del tratamiento con cinasa y reacción de preadenilación es esencial puesto que la circularización de ADNmc preadenilado por CircLigase I™ es inhibida por ATP. En algunas formas de realización, el ATP se convierte en adenosina y fosfato por tratamiento con una fosfatasa. Aunque la adenosina no es inhibidora de la reacción de circularización, el fosfato resultante puede inhibir la reacción de ligación intramolecular. El fosfato generado puede eliminarse seguidamente tratando la mezcla de reacción con enzimas secuestradoras de fosfato o con reaccionantes que precipitan o eliminan el fosfato (por ejemplo, resina de unión a fosfato, tal como resina LayneRT) de la solución. La eliminación de fosfato también puede conseguirse tratando la mezcla de reacción con una enzima tal como maltosa fosforilasa, que cataliza la conversión de maltosa en glucosa y glucosa-1-fosfato, eliminando de este modo el fosfato de la solución. La inclusión de cinasa en la reacción permite la circularización y amplificación de los fragmentos de ADN en un conjunto que no contiene grupos fosfato 5' y/o hidroxilo 3', creando de este modo una biblioteca más representativa por amplificación asistida por ligasa. La preadenilación de ADN diana facilita el uso de ligasas que tienen un bajo grado de adenilación (por ejemplo, CircLigase I™, que está aproximadamente 30% adenilada) para la reacción de ligación intramolecular. Esto puede ser de interés puesto que las ligasas que tienen un alto grado de adenilación (por ejemplo, CircLigase II™) ligan ADN no adenilado sólo una única vez. Así, con frecuencia se requiere una cantidad estequiométrica de ligasa para conducir una reacción de ligación intramolecular hasta su finalización. En contraste, ligasas que tienen un bajo grado de adenilación (tales como CircLigase I™) tienen una rotación completa, y pueden actuar de forma reversible y catalítica o repetida sobre varias moléculas de ADN preadeniladas. Esto aumenta la cinética de ligación, reduce la cantidad de ligasa requerida y permite potencialmente una mayor circularización de moldes de ADN más difíciles o complejos.

En algunas formas de realización, métodos para la amplificación del genoma completo asistida por ligasa se usan para la posterior detección de ácidos nucleicos circulantes (por ejemplo, ADN circulante de la fracción no celular de una muestra biológica) en una muestra biológica tal como sangre completa u orina. Los ácidos nucleicos circulantes pueden originarse de células apoptóticas o necróticas, o pueden ser liberados de forma activa de las células. Puesto que las nucleasas celulares rompen el ADN genómico de alto peso molecular en fragmentos pequeños del tamaño de nucleosomas, los ácidos nucleicos circulantes por naturaleza altamente fragmentados. El ácido nucleico circulante altamente fragmentado con frecuencia no se presta a los métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales. Además, los ácidos nucleicos circulantes están presentes en cantidades muy bajas en el torrente sanguíneo. La amplificación en círculo rodante convencional (RCA) de ácidos nucleicos lineales circulantes bicatenarios es ineficiente y altamente sesgada. La separación de ácidos nucleicos circulantes a cadenas sencillas y circularización con una ligasa antes de la amplificación en círculo rodante mejora la eficiencia y conduce a un sesgo menor. Para permitir una buena cinética RCA y alta sensibilidad con tal plantilla de ADN diluido, se emplean métodos RCA que emplean cebadores que comprenden LNAs. Esta RCA mejorada se ha optimizado para el ADN en muy pequeñas cantidades y amplificación de una sola célula.

En algunas formas de realización, se proporciona un método de amplificación de ADN circulante a partir de la sangre completa. El ADN circulante se amplifica de la fracción no celular de la sangre completa (por ejemplo, plasma o suero). Este método comprende las etapas de recolectar la fracción no celular de la sangre completa, recolectar de ADN circulante (en su mayoría presente en su forma bicatenaria nativa) de la fracción no celular, desnaturalizar el ADN bicatenario para generar un ADN lineal monocatenario, circularizar la molécula de ADN monocatenario circulante para generar círculos de ADN monocatenario, y amplificar los círculos de ADN monocatenario mediante amplificación en círculo rodante. Debido a la longitud de persistencia, en general no es posible circularizar el ADNbc que tiene una longitud de secuencia menor a 150 pb, y es muy difícil circularizar los ADNbc hasta que el ADN es más largo de 200 pb. En contraste, las moléculas de ADNmc lineal que tienen una longitud de secuencia de 15 nucleótidos (nt) o más se circularizan de forma eficiente por una ligasa adecuada siempre que el extremo 5' esté forsforilado y el extremo 3' esté hidroxilado. La circularización de ADN monocatenario para generar un círculo de ADN monocatenario se consigue empleando una ligasa que es capaz de ligación intramolecular independiente de la plantilla de ADN monocatenario.

En algunas formas de realización, la circularización de las moléculas de ADN monocatenarias se lleva a cabo tratando ADN lineal monocatenario con una ARN ligasa tal como CircLigase™.

En algunas formas de realización, la sensibilidad de la detección de ADN circulante se aumenta adicionalmente fosforilando los ácidos nucleicos circulantes con polinucleótido cinasa (PNK) antes de la etapa de ligación de ADNmc y RCA. Tras incorporar la etapa de PNK en el flujo de trabajo, los métodos de amplificación del genoma completo asistida por ligasa presentados en el presente documento podrían detectar el ADN circulantes masculino en sangre completa de mujeres cuando se adicionan a niveles de un 1% (repetido por triplicado). La ligación intramolecular independiente de la plantilla no puede conseguirse a menos que la plantilla de ADNmc tenga un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo 3'. Una diversidad de condiciones produce hidroxilos 5' en el ADN (incluyendo escisión enzimática con DNasa II y actividad de fosfatasa en sangre). El tratamiento PNK elimina este problema y mejora la diversidad de la biblioteca de CNA amplificada en círculo rodante.

Los kits son un medio conveniente para la generación de un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal. El kit puede comprender una polinucleótido cinasa, un donador de fosfato y una ligasa preadenilada que es capaz de ligación intramolecular independiente de la plantilla de la secuencia de ADNmc, empaquetados juntos. La polinucleótido cinasa puede ser una PNK T4. El donador de fosfato puede seleccionarse de GTP, UTP, CTP o dTTP. El kit puede incluir una TS2126 ligasa. Más de un 60% de la TS2126 ligasa puede ser preadenilada. El kit puede comprender además tampones (por ejemplo, HEPES), reaccionantes de amplificación de ADN (por ejemplo ADN polimerasa, cebadores, dNTPs) y otros reaccionantes (por ejemplo $MnCl_2$, betaína) que se emplean para la generación de un círculo de ADN monocatenario por los métodos proporcionados. El kit puede incluir una ADN polimerasa Phi29 y cebadores restringidos aleatoriamente/parcialmente. El kit puede comprender además una enzima de adenilación, una fosfatasa y una ligasa no adenilada empaquetadas juntas. El kit puede comprender además una polinucleótido cinasa y/o un donador de fosfato. La enzima de adenilación puede ser una ARN ligasa I derivada de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (ARN ligasa Mth). La ligasa no adenilada puede ser una composición de TS2126 ligasa, donde más de un 60% de la ligasa está en forma no adenilada. Los kits pueden incluir además instrucciones para la generación del círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal.

La práctica de la invención se comprenderá todavía más completamente a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan en el presente documento para ilustración y se interpretarán como limitantes del ámbito de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas. Algunas abreviaturas usadas en la sección de ejemplos se desarrollan como sigue: "mg": miligramos; "ng": nanogramos; "pg": picogramos; "fg": femtogramos; "ml": mililitros: "mg/ml": miligramos por mililitro; "mM": milimolar; "mmol": milimoles; "pM": picomolar; "pmol": picomoles; "μL": microlitros; "min.": minutos y "h": horas.

**EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Amplificación del genoma completo de ácido nucleico circulante de plasma sanguíneo:

El ADN circulante se aisló del plasma sanguíneo estabilizado con citrato-fosfato-dextrosa (CPD) de individuos aparentemente sanos usando un kit SP de extracción de ADN Wako (Wako Pure Chemical Industries). Se analizaron aproximadamente 1,3 ng por electroforesis a través de gel de agarosa al 2% usando tampón TBE, teñido con SYBR Gold y visualizado usando un generador de imágenes Typhoon. Como se describe en la FIG. 2, la mayoría de ADN circulante tenía una longitud de aproximadamente 180 pb, con una cantidad sustancialmente menor de secuencias que tenían una longitud de aproximadamente 370 pb y una cantidad sustancialmente menor de secuencia de peso molecular más alto.

El ADN circulante de 350 pg de plasma se calentó a 95°C para desnaturalizar la plantilla. La plantilla de ADN monocatenario desnaturalizado se trató a continuación con una ARN o ADN ligasa para generar círculos de ADN monocatenario. Se usaron ADN T4 ligasa dependiente de ATP, ADN ligasa de E. coli dependiente de NAD codificada por células o una ARN ligasa termoestable (CircLigase II) para la reacción de ligación. A continuación, se sometieron 100 pg de los círculos de ADN monocatenario ligado a ADN al kit de amplificación del genoma completo GenomiPhi (GE Healthcare) empleando una ADN polimerasa Phi29. La amplificación se llevó a cabo usando la mezcla de cebador +N+N(en N)(en N)(en N)*N donde "en N" representa una mezcla aleatoria que contiene 2-amino dA, 2-tio-dT G normal y C normal. La amplificación en tiempo real se llevó a cabo añadiendo una pequeña cantidad de SYBR verde I a la mezcla de amplificación y monitorizando el incremento de la señal de fluorescencia en el tiempo en un lector de placas Tecan (Tecan SNiPer, Amersham-Pharmacia Biotech). Para la comparación, se incluyeron una concentración equivalente de ADN genómico no tratado, ADN plasmático no tratado y una muestra sin plantilla de ADN (amplificación sin plantilla).

Como se representa en la FIG. 3, la cinética de amplificación de ADN plasmático fragmentado no tratado fue mucho menor cuando se compara con una cantidad equivalente de ADN genómico de alto peso molecular, indicando un defecto en la amplificación. Sin embargo, cuando el ADN plasmático fragmentado se pretrató y convirtió en círculos de ADN monocatenario usando CircLigase II™, se consiguió una cinética de amplificación rápida (FIG. 3A). Las ligasas, incluyendo la ADN ligasa T4 dependiente de ATP (FIG. 3B) y la ADN ligasa de *E. coli* dependiente de NAD codificada por células (FIG. 3C) también fueron eficaces, pero con menos eficiencia, en restaurar la cinética de amplificación del ADN plasmático fragmentado. En estos ejemplos, el incremento relativo en la cinética de

amplificación indica la eficacia de cada una de las ligasas para promover la ligación intramolecular de la plantilla de ADN monocatenario.

Ejemplo 2: Análisis de ácidos nucleicos circulantes amplificados del plasma sanguíneo por amplificación del genoma completo asistida por ligasa.

Se analizó adicionalmente el ADN amplificado generado en el Ejemplo 1 por RCP cuantitativa usando cebadores dirigidos a cuatro loci CODIS diferentes (vWA, TPOX, D8S1129 y D13S317) para analizar la eficacia del método de amplificación del genoma completo asistida por ligasa para promover la amplificación sensible y equilibrada de ADN. Estos niveles de ADN se compararon con los valores de ADN no amplificado para determinar los niveles de representación relativos después de la amplificación. Como se ilustra en la FIG. 4, en ambos ejemplos, la amplificación de ADN plasmático no tratado llevó al fracaso de secuencia o a ADN producido que estaba enormemente subrepresentado en los loci analizados. En contraste, incluir bien CircLigase II™ o ADN ligasa T4 en el método evitó el fracaso de secuencia de los cuatro loci y produjo ADN que fue más similar en la representación al ADN genómico de alto peso molecular amplificado. En el ejemplo que usa CircLigase II™ como la ligasa de ADN monocatenario, de 12 loci CODIS deferentes analizados por RCP (RCPc) cuantitativa usando cebadores dirigidos a 12 loci CODIS diferentes, 11 se recuperaron después de la amplificación, mientras que solo 4 estuvieron presentes en el ADN plasmático no tratado amplificado (FIG. 5). En la FIG. 5, los valores Ct presentados son un promedio de dos réplicas. Las reacciones RCP donde los valores Ct no se determinaron están marcadas por una “X”.

Ejemplo 3: Optimización de las condiciones de reacción para la amplificación del genoma completo asistida por ligasa.

La reacción de amplificación de ADN asistida por ligasa se optimizó adicionalmente mediante la optimización de la eficiencia de la reacción de ligación de la molécula de ADN monocatenario por ARN ligasa TS2126. La presencia de los iones metálicos fue esencial para la reacción de ligación puesto que eliminar el manganeso del tampón recomendado por el fabricante convencional redujo las tasas de amplificación a niveles de fondo. Se compararon ADN genómico no tratado y ADN plasmático no tratado con muestras de ADN plasmático tratado con CircLigase II™ usando condiciones con tampones modificados (FIG. 6). Todas las condiciones de tampón contenían KOAc 33 mM, DTT 0,5 mM y betaína 1M. Cuando se indica, los tampones contenían Tris-acetato 33 mM (pH 7,5) o HEPES-KOH 33 mM (pH 8,0) y adicionalmente contenían 2,5 mM de $MgCl_2$ o 2,5 mM de $MnCl_2$. La amplificación en tiempo real se llevó a cabo añadiendo una pequeña cantidad de SYBR verde I a la mezcla de amplificación y monitorizando 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 niveles de fondo (2000 RFU).

En la FIG. 6 se representa la comparación de la cinética de amplificación de las reacciones de amplificación del genoma completo asistida por ligasa (muestras de 100 pg). Tanto magnesio como manganeso promovieron efectos similares en presencia del tampón TRIS convencional, pero se observó que la combinación de manganeso y magnesio en presencia del tampón HEPES, pH 8,0 fue la más efectiva para promover altas tasas de amplificación. La eficiencia de circularización incrementada por tampón HEPES del ADN plasmático en estas condiciones de reacción puede ser debida a oxidación reducida del catión de manganeso en el tampón HEPES.

Ejemplo 4: Inhibición de amplificación de ADN genómico de alto peso molecular en amplificación del genoma completo asistida por ligasa.

La cinética de amplificación de reacciones de amplificación del genoma completo de ADN genómico no tratado se comparó con muestras de ADN genómico tratadas con CircLigase I™ y CircLigase II™ (muestras de 100 pg). Los resultados se representan en la FIG. 7. Como se representa en la FIG. 7, el tratamiento de ADN genómico con CircLigase produjo un efecto inhibidor sobre la tasa de amplificación de ADN genómico de alto peso molecular (a diferente de los efectos positivos en el ADN plasmático). La inhibición fue aparente tanto para CircLigase I™ como para CircLigase II™.

Para investigar si la amplificación basada en Phi29 era inhibida por la ligasa, se amplificó ADN genómico no tratado en presencia de la ligasa activa. La amplificación en tiempo real se llevó a cabo añadiendo una pequeña cantidad de SYBR verde I a la mezcla de amplificación y monitorizando el incremento en la fluorescencia con el tiempo en un lector de placas Tecan. El umbral de amplificación es el tiempo en el cual la fluorescencia crece por encima de los niveles de fondo (2000 RFU). Se observó que la inhibición de la amplificación de ADN genómico no tuvo un efecto de ligasa activa que estaba presente durante la amplificación.

Una preferencia para la amplificación de ADN circulante sobre el genómico de alto peso molecular podría ser una ventaja para algunas aplicaciones, puesto que el ADN genómico de células sanguíneas con frecuencia contamina las preparaciones de ácidos nucleicos circulantes y es de menor valor diagnóstico.

Ejemplo 5: Amplificación de ADN fragmentado en un único tubo empleando amplificación del genoma completo asistida por ligasa - Efecto de la fosforilación de los fragmentos de ADN circulantes con cinasa antes de ligación intramolecular.

La fosforilación de los fragmentos de ADN circulante con cinasa permitió una detección más sensible de ADN circulante en el plasma sanguíneo. Se llevó a cabo un experimento de mezcla de plasma/sangre de hombre-mujer para

establecer que la biblioteca creada a partir de ADN de entrada tratado con cinasa era más representativa, permitiendo una detección más sensible del marcador DYS14 específico masculino (FIG. 10, 3/3 réplicas, mientras que solo se detectó 1/3 si no se realizaba fosforilación). Se prepararon 100 μl de mezclas de sangre/plasma como sigue: 100A: plasma masculino 100%; 5A-C: plasma masculino añadido en sangre completa femenina en 5% v/v; 1A-C: plasma masculino añadido en sangre completa femenina a 1% v/v; y 0A: sangre femenina 100%. El plasma se separó de las células sanguíneas por flujo lateral a través de una membrana MF1 (Whatman), seguido de recolección sobre una almohadilla de celulosa que se secó y se almacenó durante la noche. A continuación, el ADN circulante se aisló de la almohadilla de celulosa mediante una modificación del kit de extracción SP Wako (Wako Pure Chemical Industries), un método basado en yoduro de sodio/detergente convencional. Se trataron entonces aproximadamente 1,8 ng de DNA con o sin polinucleótido cinasa T4 en presencia de GTP, manganeso y betaína y después se trató con CircLigase II™ para circularizar los fragmentos de ADN monocatenario. A continuación, el ADN se sometió a amplificación del genoma completo con GenomiPhi (GE Healthcare) y los productos se analizaron por RCP cuantitativa para evaluar la detección de dos marcadores: Dys14, que es un gen de múltiples copias ubicado en el cromosoma Y, y debe detectarse a partir de la única fracción masculina, y D16S539, que es un locus STR localizado en el cromosoma 16 y debe detectarse a partir de fracciones masculinas y femeninas. La reacción se llevó a cabo en un único recipiente de reacción, sin intervención de ninguna etapa de purificación o aislamiento en el flujo de trabajo. Esto se consiguió llevando a cabo la reacción de fosforilación en una concentración relativamente baja de GTP.

La FIG. 10 ilustra que la inclusión de una cinasa en la reacción permite la circularización y amplificación de fragmentos de ADN en un conjunto que no contiene fosfato 5', creando de ese modo una biblioteca más representativa. Esto incluiría los fragmentos de ADN que contienen hidroxilo 5', que se generan específicamente por digestión con DNasa II durante la muerte celular. Usando un experimento de mezcla de plasma/sangre de hombre-mujer, se demuestra que la biblioteca creada a partir de ADN de entrada tratado con cinasa era más representativo, permitiendo una detección más sensible del marcador específico de hombre DYS14 (3/3 réplicas, mientras que solo se detectó 1/3 si no se realizaba fosforilación).

Ejemplo 6: Efecto de preadenilación de ADN fragmentado antes de la reacción de circularización.

Se valora la eficiencia de la circularización de un fragmento pequeño de ADN que bien se ha fosforilado o preadenilado en 40 minutos con diferentes cantidades de enzima de CircLigase™. Se trataron 2,5 pmol de un oligonucleótido de 64-mer que contiene bien un grupo fosfato o una adenilación en la posición 5' con cantidades crecientes de CircLigase I™ o CircLigase II™ durante 40 minutos a 60°C. El porcentaje de circularización se determinó escaneando la intensidad de las bandas en las posiciones lineal y circular. Como se muestra en la FIG. 12, la preadenilación de ADN fragmentado mejoró la cinética de ligación y amplificación. En la FIG. 12, P-64-mer representa un oligonucleótido de 64-nt 5'-fosforilado; y ad-64 representa un oligonucleótido de 64-nt preadenilado. El ADN preadenilado se circularizó más rápidamente que el ADN fosforilado convencional. Adicionalmente, la enzima de ligación, que tiene bajo grado de adenilación catalizó la ligación de un exceso molar de sustrato indicando que la ligasa tiene múltiples oportunidades para ligar la molécula de ADN preadenilado, lo que aumenta la cinética de ligación y permite potencialmente una mayor circularización de plantillas más difíciles.

Ejemplo 7: Circularización de oligonucleótidos que contienen 5'-fosfato y 5'-hidroxilo usando el flujo de trabajo de preadenilación.

Se trataron con 1,25 U de polinucleótido cinasa T4 a 37°C cuando se indica, reacciones que contienen 5 pmol de un oligonucleótido de 64-mer bien con un grupo fosfato o un grupo hidroxilo en la posición 5'. Después de la incubación con 25 pmol de ARN ligasa Mth a 65°C, las reacciones se trataron con 0,25 unidades de fosfatasa alcalina de camarón. Puesto que la ARN ligasa Mth es muy sensible a la concentración de ATP, en una concentración patrón de ATP 100 μM, la ARN ligasa Mth casi adenila exclusivamente los extremos del ADN. No se produce ligación intramolecular alguna por la ARN ligasa Mth en esta concentración de ATP. Las enzimas se inactivaron por calor después de cada incubación. Finalmente, las reacciones se trataron con 50 unidades CircLigase™ I cuando se indica y se incubó durante 60 minutos a 60°C. El porcentaje de circularización se determinó escaneando la intensidad de las bandas en las posiciones lineal y circular (FIG. 13). P-64mer representa un oligonucleótido de 64-nt 5'-fosforilado y ad-64mer representa un oligonucleótido 64-nt preadenilado.

La FIG. 11 muestra un flujo de trabajo de preadenilación en un "único tubo" en el que oligonucleótidos lineales que contienen un grupo 5'-fosfato o un grupo 5'-hidroxilo se convierten en formas circulares. En este proceso de "único tubo" los sustratos se tratan sucesivamente con polinucleótido cinasa, ARN ligasa Mth, fosfatasa alcalina de camarón y CircLigase I™ sin intervención de ninguna etapa de purificación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para generar un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal, comprendiendo el método:

(a) proporcionar el ADN lineal;

(b) incubar el ADN lineal con una polinucleótido cinasa en presencia de un donador de fosfato para generar una secuencia de ADN ligable que tiene un grupo fosfato en un extremo 5' terminal y un grupo hidroxilo en un extremo 3' terminal; y

(c) incubar la secuencia de ADN ligable con una ligasa que es capaz de ligación intramolecular independiente de la plantilla de una secuencia de ADN monocatenario para generar el círculo de ADN monocatenario,

donde todas las etapas del método se llevan a cabo en un único recipiente de reacción sin intervención de ninguna etapa de aislamiento o purificación y donde la etapa (b) se lleva a cabo usando un donador de fosfato distinto de adenosina trifosfato o desoxiadenosina trifosfato.

2. El método de la reivindicación 1, donde el donador de fosfato es guanosina trifosfato y donde el ADN lineal se incuba con la polinucleótido cinasa en presencia de menos de 200 μM de guanosina trifosfato.

3. El método de la reivindicación 2, donde el ADN lineal se incuba con la polinucleótido cinasa en presencia de hasta 30 μM de guanosina trifosfato y hasta 2,5 mM de iones manganeso.

4. El método de la reivindicación 2, que comprende además desnaturalizar la secuencia de ADN ligable antes de la etapa (c) si la secuencia de ADN ligable está en forma bicatenaria, donde la ligasa es una ligasa preadenilada.

5. El método de la reivindicación 4, donde la ligasa preadenilada es una ARN ligasa TS2126.

6. El método de la reivindicación 1, donde las etapas (a) a (c) se llevan a cabo de una manera secuencial en el único recipiente de reacción.

7. El método de la reivindicación 6, donde todas las etapas del método se llevan a cabo en tampón HEPES y en ausencia de adenosina trifosfato o desoxiadenosina trifosfato.

8. El método de la reivindicación 1, donde el ADN lineal es un ADN circulante, un ADN aislado de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina, una muestra de ADN forense que se ha expuesto a condiciones ambientales, o una muestra de ADN antiguo.

9. El método de la reivindicación 1, que comprende además amplificar el círculo de ADN monocatenario mediante amplificación en círculo rodante en condiciones isotérmicas.

10. El método de la reivindicación 9, donde la amplificación en círculo rodante se lleva a cabo usando un cebador resistente a nucleasa.

11. Un método de generación de un círculo de ADN monocatenario a partir de un ADN lineal, comprendiendo el método:

(a) proporcionar el ADN lineal;

(b) incubar el ADN lineal con una polinucleótido cinasa en presencia de un adenosina trifosfato para generar una secuencia de ADN ligable que tiene un grupo fosfato en un extremo 5' terminal y un grupo hidroxilo en un extremo 3' terminal;

(c) incubar la secuencia de ADN lineal o la secuencia de ADN ligable con una enzima de adenilación en presencia de adenosina trifosfato para generar una secuencia de ADN 5' adenilado y tratar la mezcla de reacción con una fosfatasa para eliminar el ATP de la mezcla de reacción; y

(d) incubar la secuencia de ADN 5' adenilado con una ligasa no adenilada, que es capaz de ligación intramolecular independiente de la plantilla de una secuencia de ADN monocatenario 5' adenilado para generar el círculo de ADN monocatenario,

donde todas las etapas del método se llevan a cabo en un único recipiente de reacción sin intervención de ninguna etapa de aislamiento o purificación.

12. El método de la reivindicación 11, donde la ligasa no adenilada es un mutante de ARN ligasa 1 derivada de arqueobacteria termófila, *Methanobacterium thermoautotrophicum.*

13. El método de la reivindicación 11, que comprende además:

(i) incubar la mezcla de reacción de la etapa (c) que comprende la secuencia de ADN 5' adenilado con una fosfatasa

para eliminar la adenosina trifosfato de la mezcla de reacción; y

(ii) desnaturalizar la secuencia de ADN 5' adenilado antes de la etapa (d) si la secuencia de ADN 5' adenilado está en forma bicatenaria;

donde la enzima de adenilación es una ARN ligasa 1 derivada de arqueobacteria termófila, *Methanobacterium thermoautotrophicum.*

14. El método de la reivindicación 13, donde la ligasa no adenilada es una ARN ligasa TS2126 derivada de bacteriófago Thermus, TS2126.

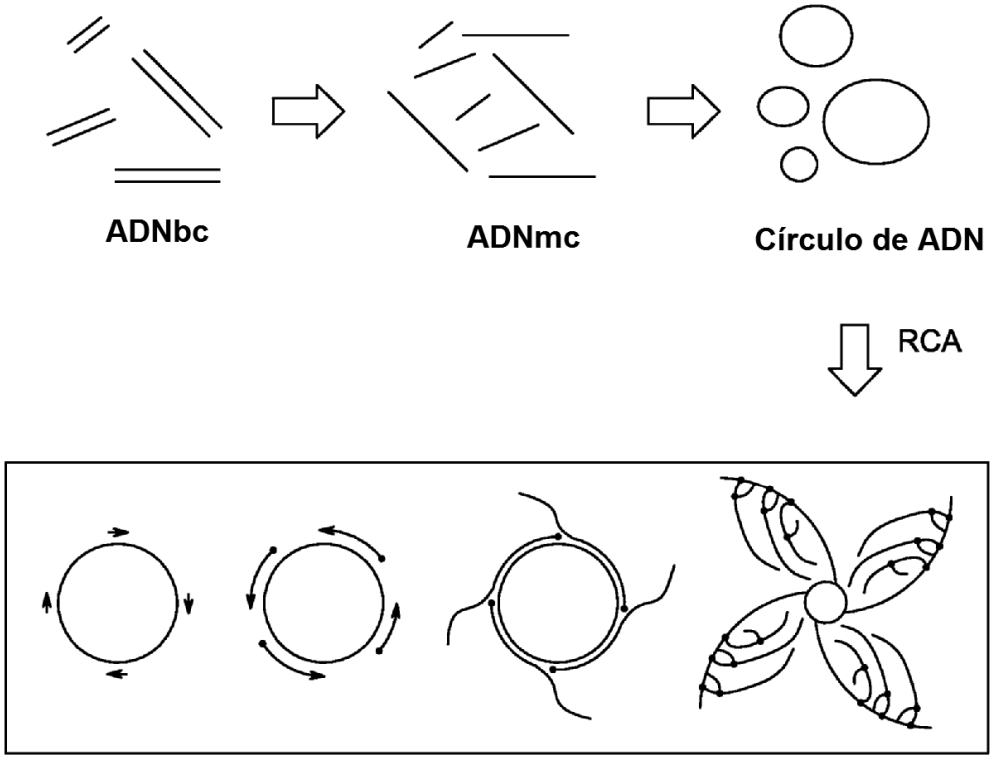



FIG. 1

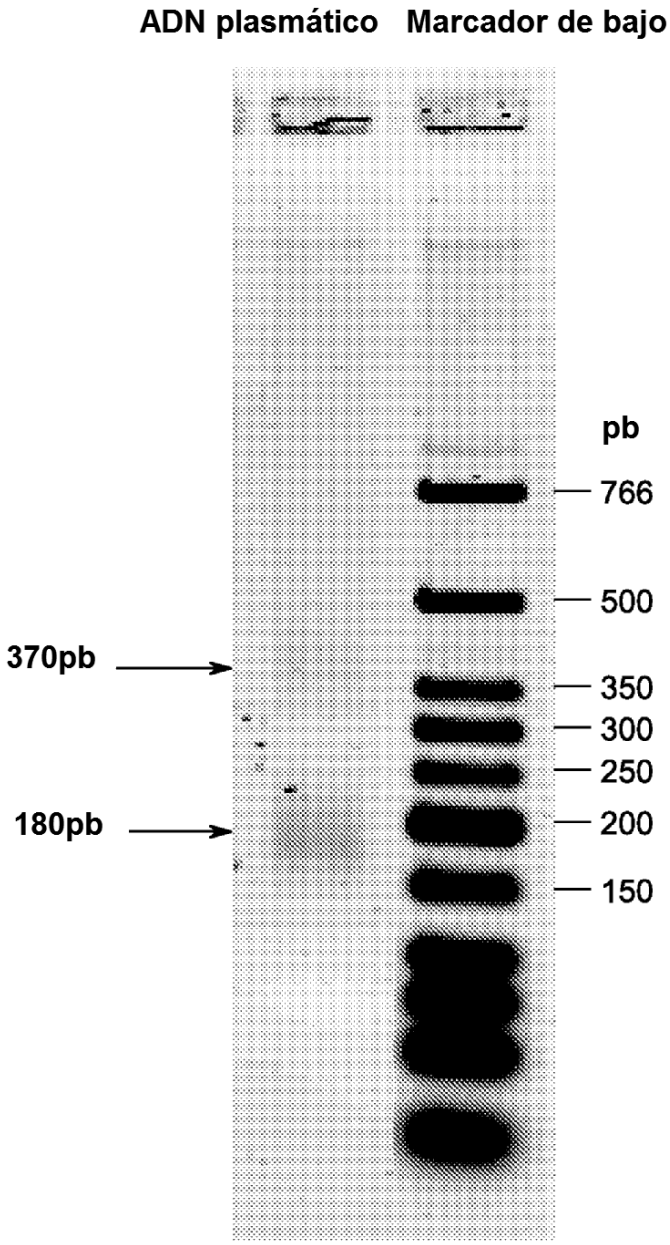

ADN plasmático
Marcador de bajo PM
pb
766
500
370pb
350
300
250
180pb
200
150

FIG. 2

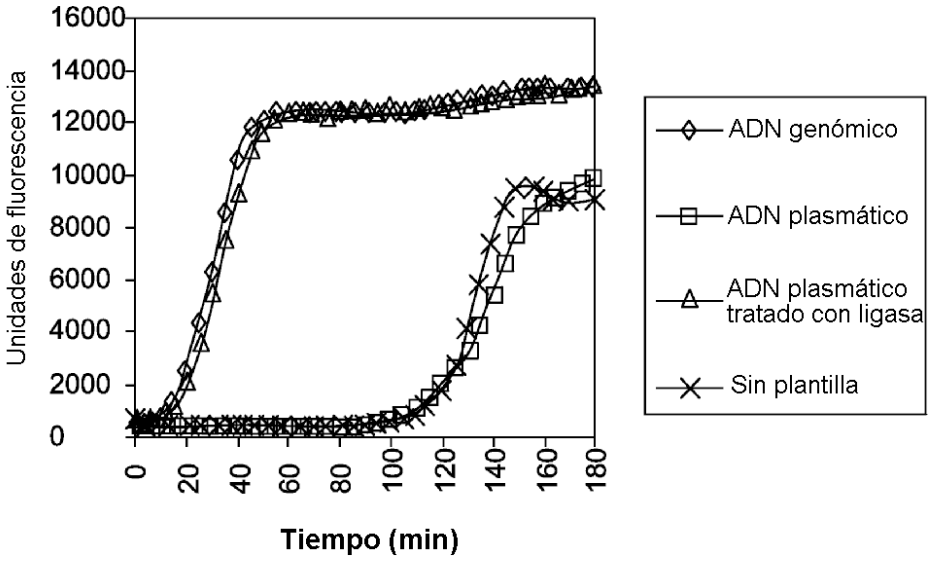

16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Unidades de fluorescencia
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Tiempo (min)
ADN genómico
ADN plasmático
ADN plasmático tratado con ligasa
Sin plantilla

FIG. 3A

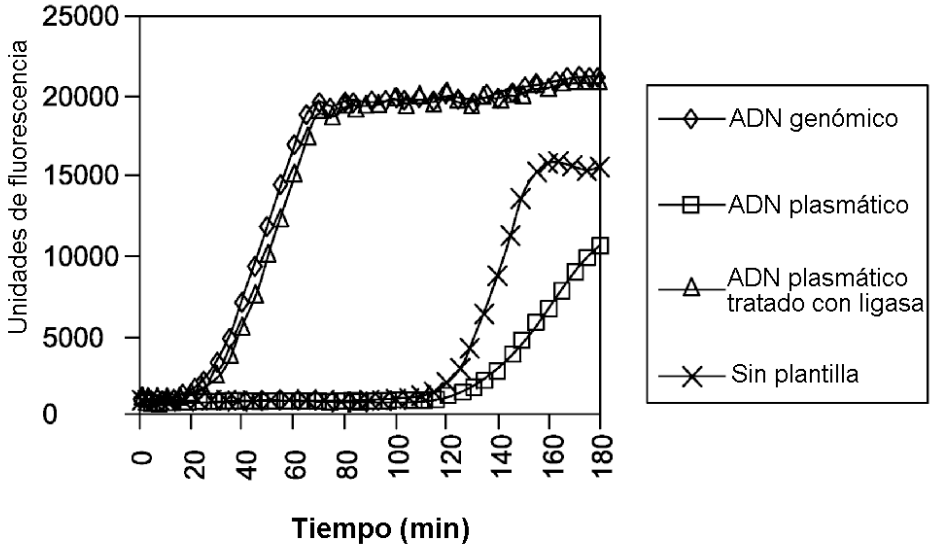

25000
20000
15000
10000
5000
0
Unidades de fluorescencia
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Tiempo (min)
ADN genómico
ADN plasmático
ADN plasmático tratado con ligasa
Sin plantilla

FIG. 3B

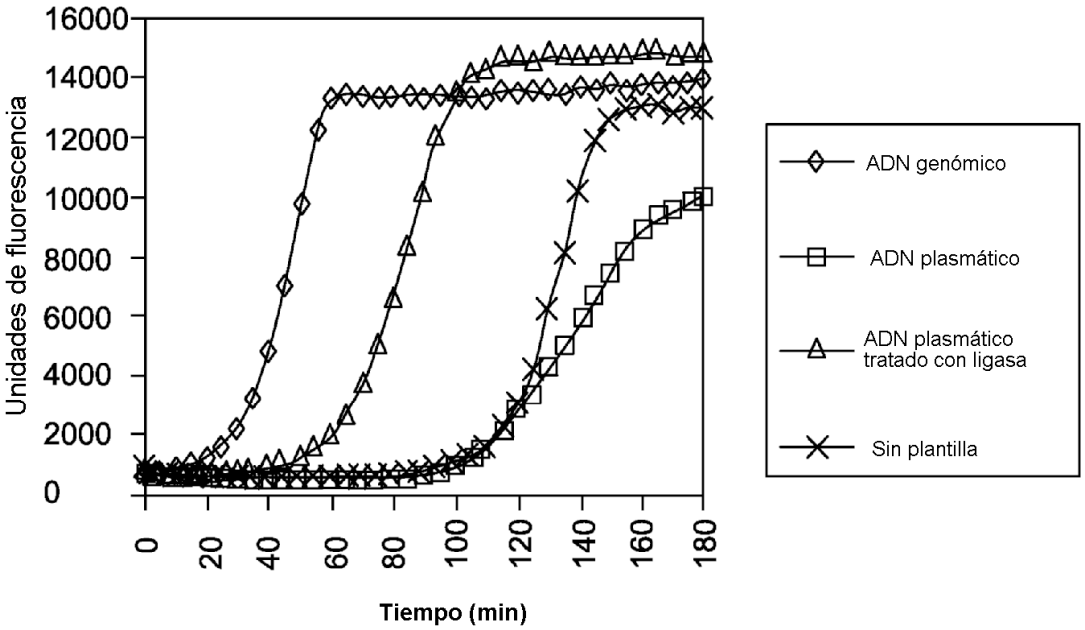

16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Unidades de fluorescencia
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Tiempo (min)
ADN genómico
ADN plasmático
ADN plasmático tratado con ligasa
Sin plantilla

FIG. 3C

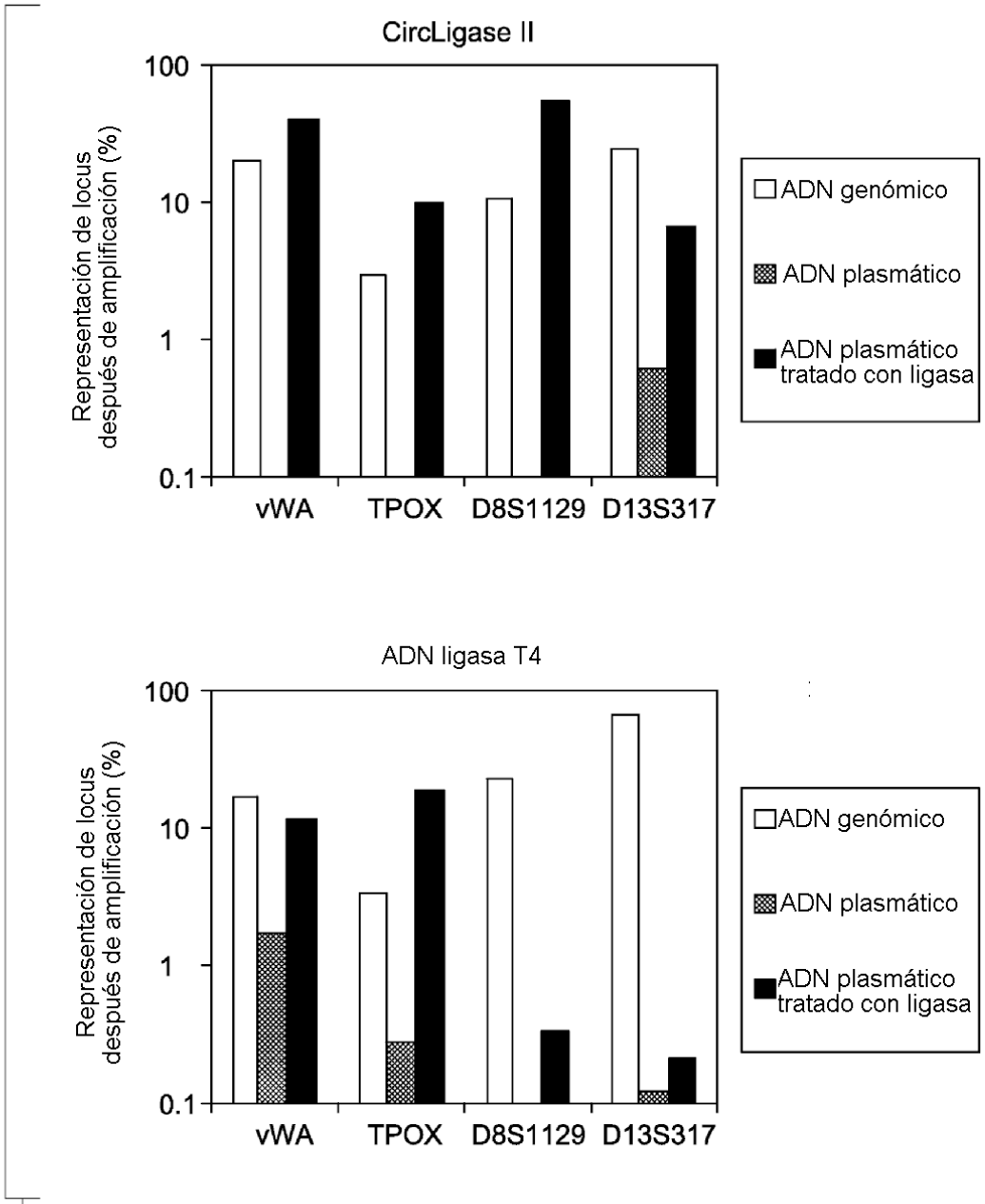

CircLigase II
Representación de locus después de amplificación (%)
100
10
1
0.1
vWA
TPOX
D8S1129
D13S317
ADN genómico
ADN plasmático
ADN plasmático tratado con ligasa
ADN ligasa T4
Representación de locus después de amplificación (%)
100
10
1
0.1
vWA
TPOX
D8S1129
D13S317
ADN genómico
ADN plasmático
ADN plasmático tratado con ligasa

FIG. 4

| Locus | Tamaño de Amplicon (pb) | 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 |
| Amelogenina | 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. 5

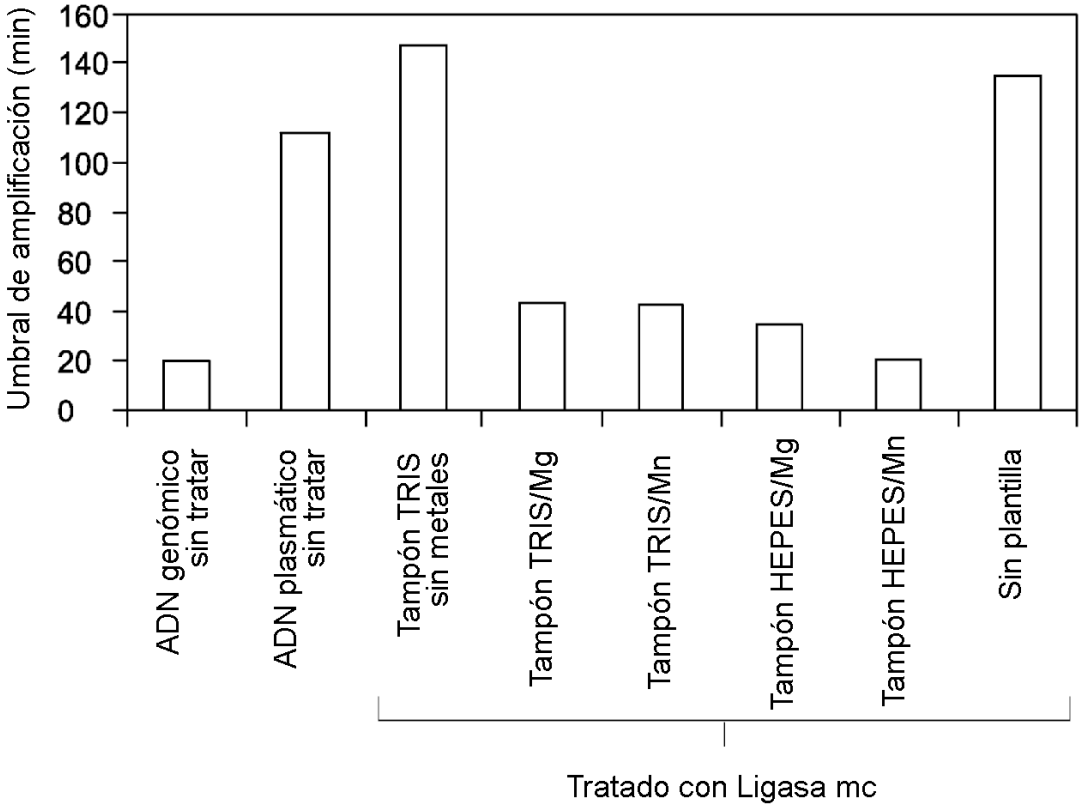

Umbral de amplificación (min)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ADN genómico sin tratar
ADN plasmático sin tratar
Tampón TRIS sin metales
Tampón TRIS/Mg
Tampón TRIS/Mn
Tampón HEPES/Mg
Tampón HEPES/Mn
Sin plantilla
Tratado con Ligasa mc

FIG. 6

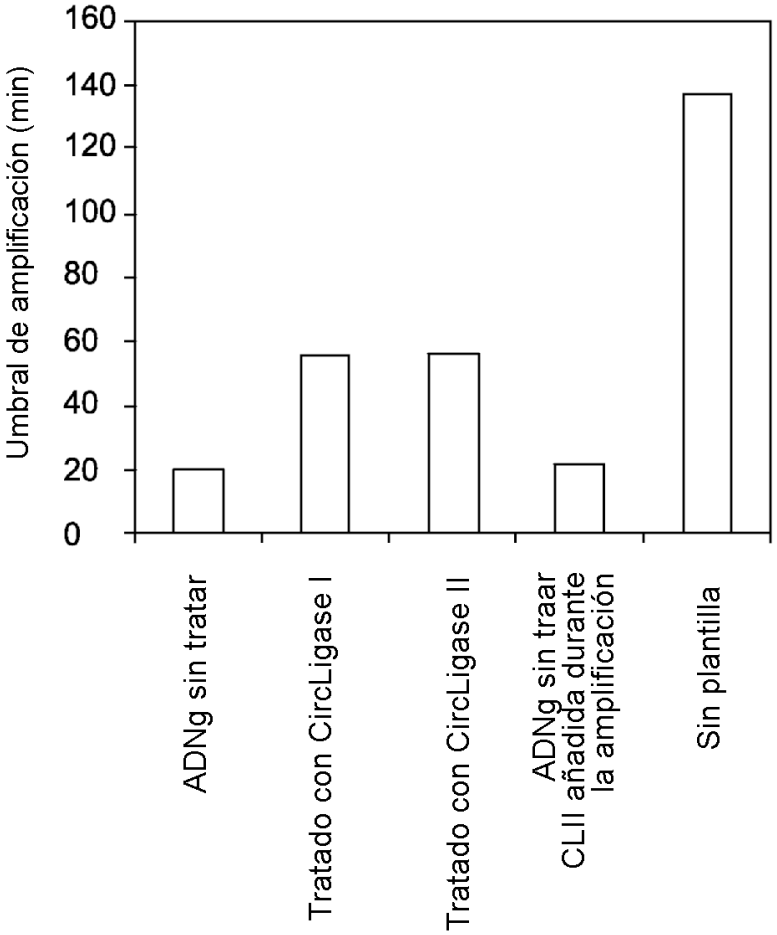

Umbral de amplificación (min)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ADNg sin tratar
Tratado con CircLigase I
Tratado con CircLigase II
ADNg sin traar CLII añadida durante la amplificación
Sin plantilla

FIG. 7

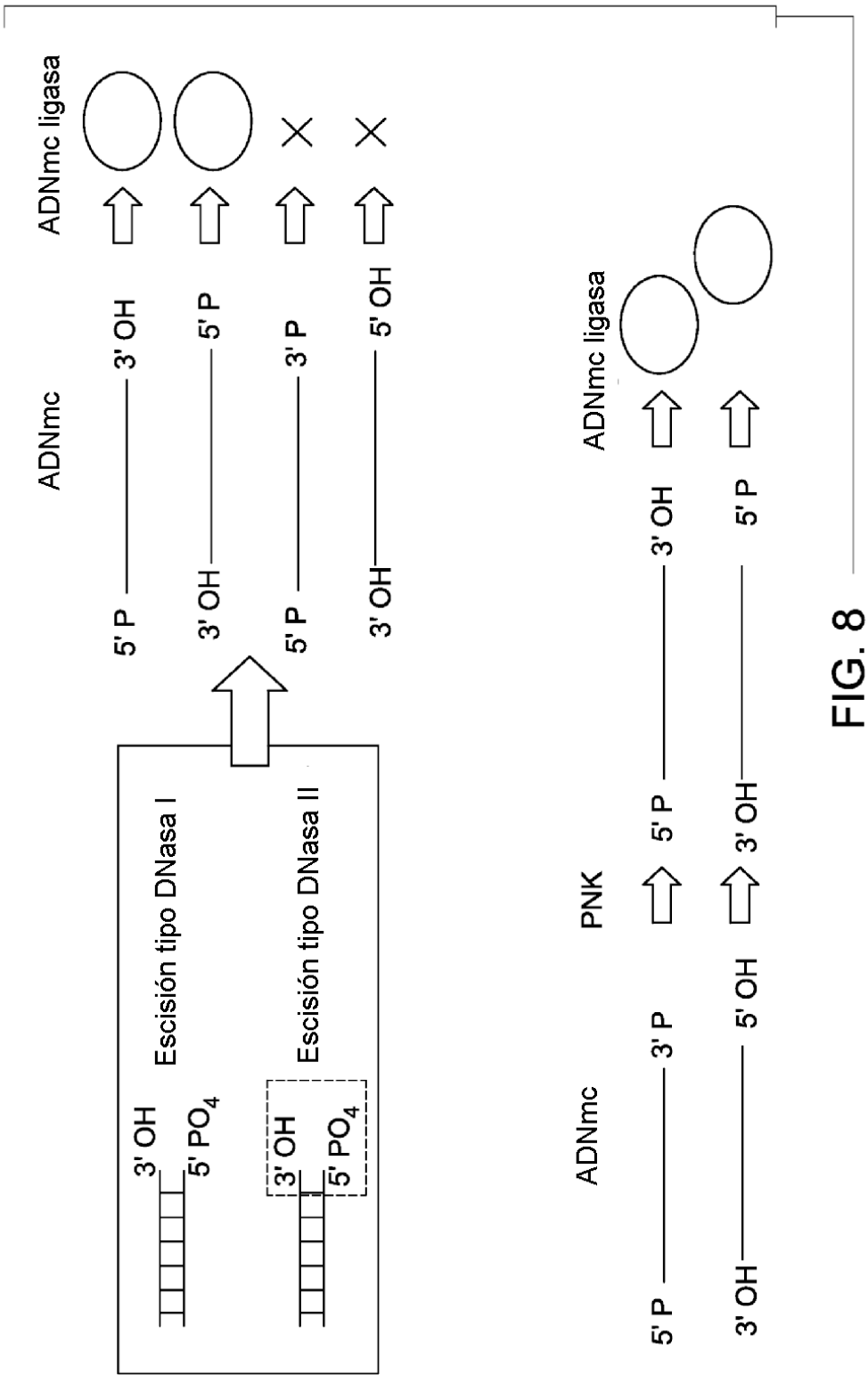

ADNmc
ADNmc ligasa
5' P
3' OH
3' OH
5' P
5' P
3' P
3' OH
5' OH
Escisión tipo DNasa I
Escisión tipo DNasa II
3' OH
5' PO4
3' OH
5' PO4
ADNmc
PNK
ADNmc ligasa
5' P
3' P
3' OH
5' OH
5' P
3' OH

FIG. 8

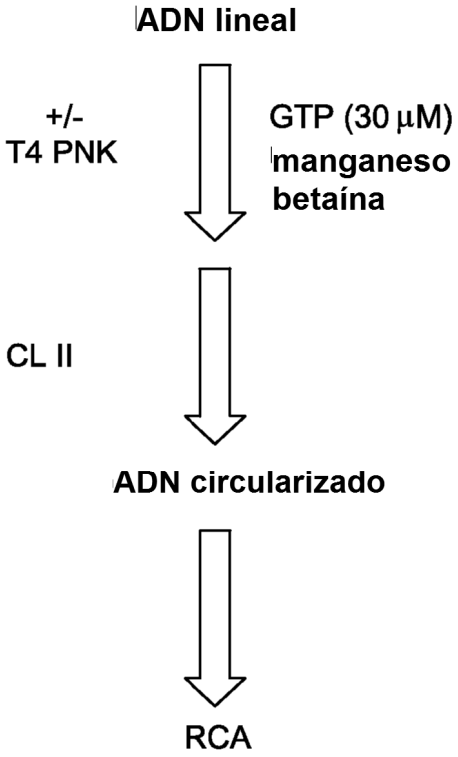
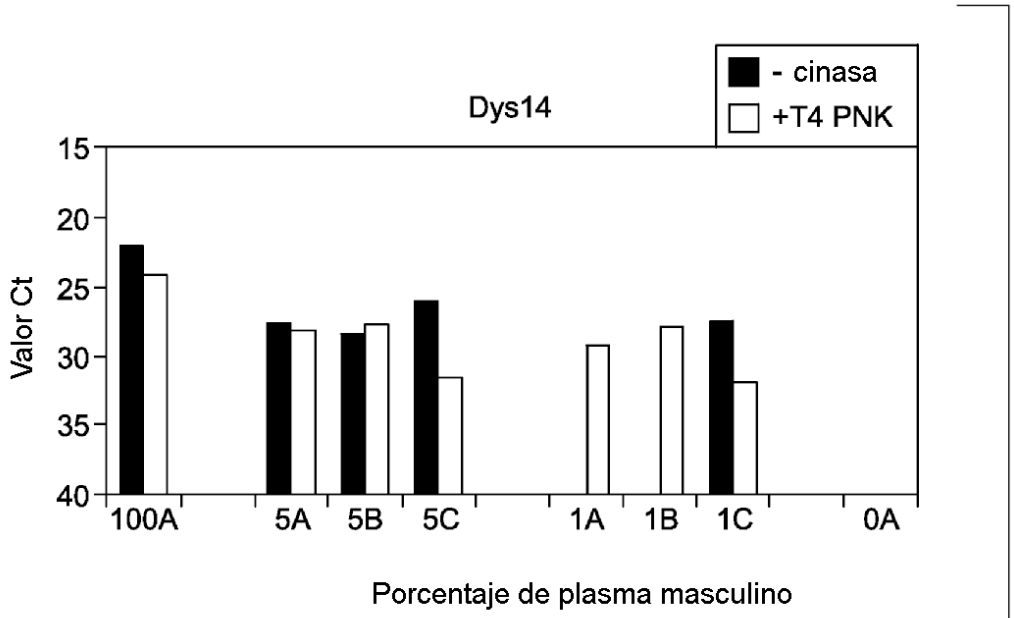

ADN lineal
+/-
T4 PNK
GTP (30 µM)
manganeso
betaína
CL II
ADN circularizado
RCA

FIG. 9


Dys14
- cinasa
+T4 PNK
Valor Ct
15
20
25
30
35
40
100A
5A
5B
5C
1A
1B
1C
0A
Porcentaje de plasma masculino

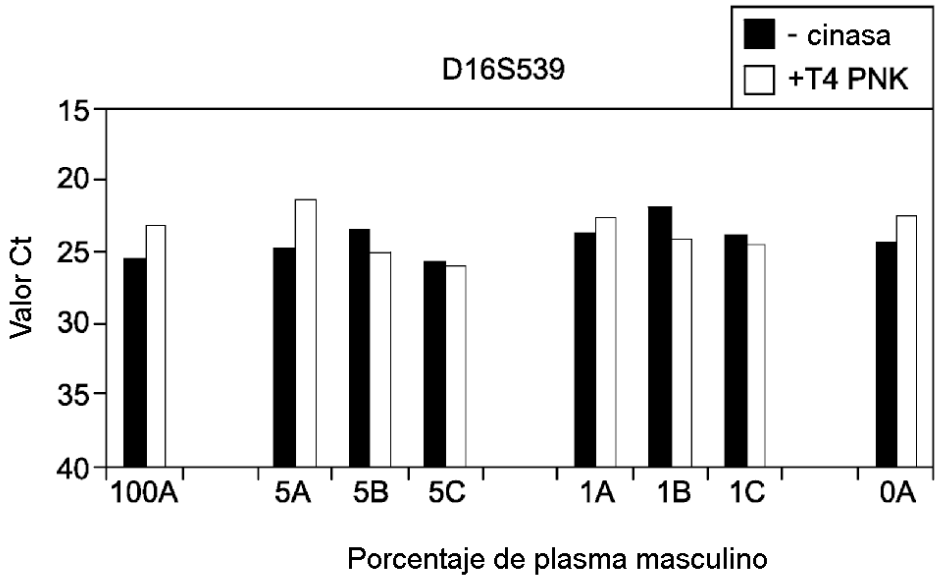

D16S539
- cinasa
+T4 PNK
Valor Ct
15
20
25
30
35
40
100A
5A
5B
5C
1A
1B
1C
0A
Porcentaje de plasma masculino

FIG. 10

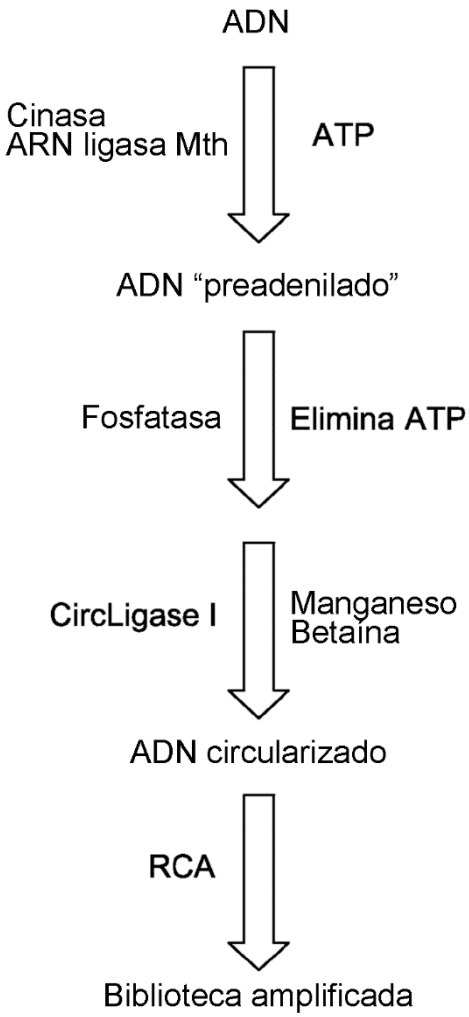

ADN
Cinasa
ARN ligasa Mth
ATP
ADN “preadenilado”
Fosfatasa
Elimina ATP
CircLigase I
Manganeso
Betaína
ADN circularizado
RCA
Biblioteca amplificada

FIG. 11

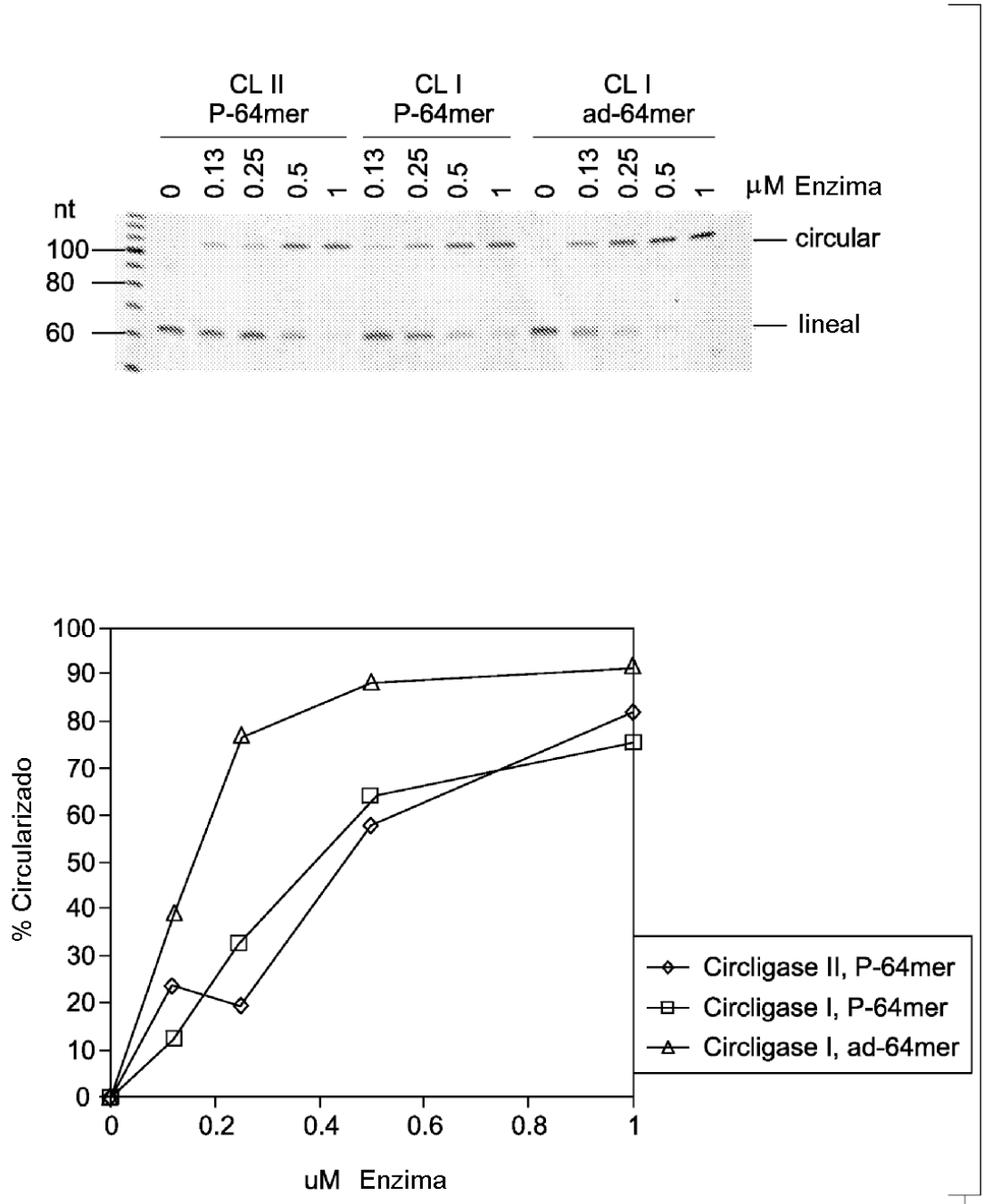

CL II
P-64mer
CL I
P-64mer
CL I
ad-64mer
0
0.13
0.25
0.5
1
0.13
0.25
0.5
1
0
0.13
0.25
0.5
1
µM Enzima
nt
100
80
60
circular
lineal
% Circularizado
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
uM Enzima
Circligase II, P-64mer
Circligase I, P-64mer
Circligase I, ad-64mer

FIG. 12

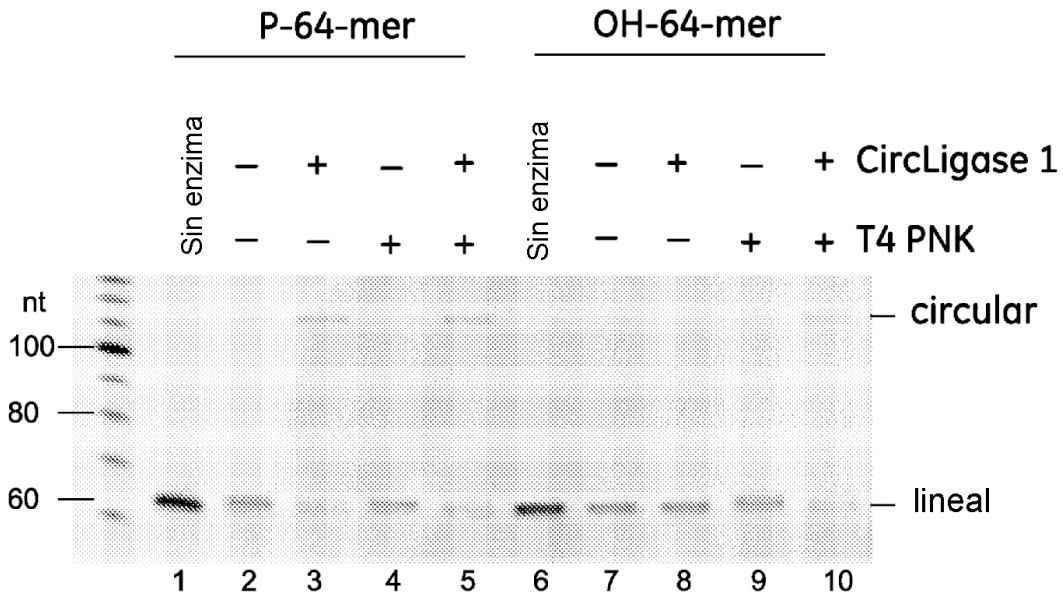

P-64-mer
OH-64-mer
Sin enzima
Sin enzima
CircLigase 1
T4 PNK
nt
100
80
60
circular
lineal
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FIG. 13