

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 349**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6806** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016 PCT/GB2016/051574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193695**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016 E 16726415 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3303614**

54 Título: **Utilización mejorada de cebadores de superficie en grupos**

30 Prioridad:

**29.05.2015 US 201562168602 P**

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

**26.10.2020**

73 Titular/es:

**ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (100.0%)  
19 Granta Park, Great Abington  
Cambridge CB21 6DF, GB**

72 Inventor/es:

**BOUTELL, JONATHAN MARK y  
SKINNER, GARY MARK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 789 349 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Utilización mejorada de cebadores de superficie en grupos

### Antecedentes

5 La tarea de catalogar la variación genética humana y correlacionar esta variación con la sensibilidad a la enfermedad es desalentadora y costosa. Una reducción drástica en este costo es imprescindible para avanzar en la comprensión de la salud y la enfermedad. Una reducción en los costos de secuenciación requerirá una serie de avances técnicos en el campo. Los avances técnicos que podrían reducir el costo del análisis del genoma incluyen: (1) generación de genotecas; (2) amplificación y análisis clonales muy paralelos; (3) desarrollo de bioquímica de secuenciación de ciclo robusta; (4) desarrollo de tecnología de diagnóstico por la imagen ultrarrápida; y (5) desarrollo de algoritmos para el ensamblaje de secuencias a partir de lecturas cortas.

10 El documento US2014/0349891 da a conocer un método para generar una plantilla para una reacción de secuenciación de ácido nucleico que comprende la amplificación en puente sobre un soporte sólido.

15 La creación de amplificaciones clonales de manera muy paralela es importante para una secuenciación rentable. La secuenciación generalmente se realiza en poblaciones clonales de moléculas de ADN preparadas tradicionalmente a partir de plásmidos cultivados a partir de la selección de colonias bacterianas individuales. En el proyecto del genoma humano, cada clon se seleccionó individualmente, creció y el ADN se extrajo o amplificó fuera del clon. En los últimos años, ha habido una serie de innovaciones para permitir el análisis muy en paralelo de los clones de ADN, especialmente utilizando métodos basados en matrices. En el enfoque más sencillo, la genoteca puede analizarse en una sola molécula, que por su propia naturaleza es clonal. La principal ventaja de la secuenciación de una sola molécula es que la secuenciación cíclica puede ocurrir de forma asincrónica ya que cada molécula se lee individualmente. Por el contrario, el análisis de amplificaciones clonales requiere la finalización casi cuantitativa de cada ciclo de secuenciación, de lo contrario, el ruido de fondo crece progresivamente con cada ciclo que sigue limitando gravemente la longitud de lectura. Como tal, el análisis clonal impone una mayor carga a la robustez de la bioquímica de secuenciación y puede limitar posiblemente las longitudes de lectura.

25 Por lo tanto, hay necesidad de desarrollar métodos para mejorar el análisis genómico y proporcionar métodos más rentables para el análisis de secuencias. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

### Breve compendio

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 Los métodos y composiciones proporcionados en este documento permiten la amplificación de superficie a densidades mejoradas. En la presente memoria se describen métodos para mejorar la utilización de cebadores de superficie durante el proceso de amplificación de superficie. Los métodos son útiles para la amplificación de superficie a densidades mejoradas. Los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria permiten la creación de grupos que son más brillantes, pero con las mismas densidades que se consiguen actualmente usando la amplificación de grupos habitual. Los grupos más brillantes pueden tener una serie de ventajas, por ejemplo, mejor calidad de lectura, soporte para lecturas más largas, tiempos de exploración más rápidos para la secuenciación y mayor robustez del sistema.

40 En la presente memoria se presentan métodos y composiciones para preparar plantillas inmovilizadas para una reacción de secuenciación de ácido nucleico que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido que tiene un gran número de cebadores de amplificación directa e inversa inmovilizados sobre el mismo, en el que un subconjunto del gran número de cebadores de amplificación comprende un punto de escisión; (b) amplificar una plantilla usando el subconjunto de cebadores en el soporte para producir un gran número de moléculas de ácido nucleico bicatenario, en donde ambas cadenas de cada molécula de ácido nucleico bicatenario están unidas al soporte sólido en sus extremos 5'; (c) escindir el subconjunto de cebadores en el punto de escisión; y (d) someter la cadena escindida a condiciones parcialmente desnaturizantes para facilitar la hibridación de una parte de la cadena no inmovilizada del producto de amplificación con el cebador de amplificación inmovilizado complementario, seguido de la ampliación del cebador de amplificación inmovilizado para generar una copia de la cadena no inmovilizada del producto de amplificación.

50 En algunas realizaciones, las condiciones de desnaturización parcial comprenden agregar uno o más componentes de una reacción de amplificación de recombinasa/polimerasa para facilitar la invasión de la cadena. En algunas realizaciones, las condiciones de desnaturización parcial comprenden someter la plantilla a condiciones adecuadas para la migración de la plantilla.

En algunas realizaciones, la etapa (d) comprende aplicar cebadores en solución para facilitar la hibridación de los cebadores al extremo no inmovilizado del producto de amplificación inmovilizado.

55 Los detalles de una o más realizaciones se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un esquema que muestra un método de amplificación según una realización.

La figura 2 es un esquema que muestra un método de amplificación según una realización.

La figura 3 muestra resultados comparativos de grupos de tinción SyBr Green amplificados según varios métodos.

- 5 La figura 4 muestra resultados comparativos agrupados amplificados según varios métodos. El cuadro superior muestra la exploración por imágenes después del primer ciclo de incorporación de nucleótidos. El cuadro inferior muestra la tinción Cy3 y Cy5 de los grupos en cada carril.

La figura 5 es un esquema que muestra un enfoque alternativo para generar una espira final emparejada.

La figura 6 es un esquema que muestra etapas adicionales en el enfoque que se muestra en la figura 5.

**10 Descripción detallada**

15 En la presente memoria se presentan métodos y composiciones para mejorar la utilización de cebadores de superficie durante el proceso de amplificación de superficie. Los métodos son útiles para la amplificación de superficie a densidades mejoradas. Los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria permiten la creación de grupos que son más brillantes, pero con las mismas densidades que se consiguen actualmente usando la amplificación de grupos habitual.

20 Las tecnologías de secuenciación disponibles actualmente utilizan la amplificación de superficie para formar grupos de ácido nucleico amplificado sobre un soporte sólido. Los enfoques más frecuentes incluyen la amplificación en puente y la amplificación isotérmica se puede realizar utilizando la amplificación de exclusión cinética (KEA), también conocida como amplificación de exclusión (ExAmp). Ambas metodologías de amplificación utilizan 2 cebadores de superficie diferentes, directo e inverso, inmovilizados en un soporte sólido. Sin embargo, los procesos de amplificación de grupo de puente y ExAmp hacen un uso ineficiente de los 2 cebadores de superficie. Las estimaciones actuales son que <10% de los cebadores de superficie se convierten en cadenas de plantilla después de la amplificación. Hay necesidad de métodos mejorados de amplificación de superficie que permitan una utilización más robusta de los cebadores de superficie existentes. Los métodos que pueden utilizar una fracción mayor de los cebadores de superficie proporcionarían grandes beneficios en cuanto al brillo de los grupos resultantes durante la secuenciación y una mejor calidad de secuenciación en plataformas de secuenciación de señal limitada.

25 En la presente memoria se presentan métodos para mejorar la ocupación de los cebadores de superficie, permitiendo grupos con una mayor densidad de producto de amplificación de ácido nucleico y dando como resultado una señal muy mejorada durante la secuenciación por síntesis. En algunas realizaciones presentadas en la presente memoria, los métodos de amplificación comprenden realizar un puente corriente o procedimiento de amplificación ExAmp. Una vez completada la amplificación habitual, uno de los dos cebadores de superficie se escinde y se retira del soporte sólido. Las moléculas amplificadas permanecen limitadas en un solo extremo, pero lo dejan en forma de ADNbc. Luego se realiza una ronda posterior de amplificación en condiciones de desnaturalización parcial para facilitar la hibridación de una parte de la cadena no inmovilizada del producto de amplificación con el cebador de amplificación complementario inmovilizado, seguido de la ampliación del cebador de amplificación inmovilizado para generar una copia de la cadena no inmovilizada del producto de amplificación.

30 Una representación general del método según una realización se ilustra en la Fig. 1. Como se muestra en la Fig. 1, se realiza un proceso de amplificación de superficie inicial con cebadores directos y cebadores inversos presentes en la superficie. Los cebadores directo e inverso se denominan en la Fig. 1 "P7" y "P5", aunque se apreciará que los métodos presentados en la presente memoria se pueden realizar con cualquier cebador de amplificación directa e inversa unido a la superficie. El proceso de amplificación de superficie inicial se puede realizar utilizando cualquier procedimiento de amplificación adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, por amplificación en puente o la amplificación de recombinasa/polimerasa (RPA), también conocida como ExAmp en la Fig. 1. Después de la ronda inicial de amplificación, una gran parte de los cebadores directos e inversos con superficie continúan sin ampliar. Si bien no desea estar limitado por la teoría, la baja utilización de los cebadores de superficie durante la amplificación en puente y/o RPA puede deberse a un impedimento estérico u otras restricciones físicas debido a la necesidad de que las moléculas de plantilla se "unan" a los 2 cebadores de superficie.

35 A continuación, como se ilustra en la Fig. 1, un subconjunto de los cebadores unidos a la superficie se escinde de la superficie. El subconjunto de cebadores unidos a la superficie que se escinden puede ser, por ejemplo, los cebadores directos o, alternativamente, los cebadores inversos. Se apreciará que, en algunas realizaciones, no todos los cebadores directos o inversos se escindirán de la superficie. Por ejemplo, después de la escisión de los cebadores inversos (P5), una parte de los cebadores P5 puede permanecer unida a la superficie. En algunas realizaciones, menos del 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos del 5% de los cebadores directos unidos originalmente permanecen unidos a la superficie. En algunas realizaciones, menos del 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos del 5% de los cebadores inversos unidos originalmente permanecen unidos a la superficie.

En la realización mostrada en la Fig. 1, la etapa de escisión divide tanto a los cebadores P5 no ampliados como a los ampliados. Por lo tanto, después de la escisión, algunos de los cebadores escindidos permanecen atados al soporte sólido mediante la estructura en puente linealizado. Los cebadores escindidos, no ampliados estarán en solución y pueden eliminarse del soporte sólido mediante una etapa de lavado si se desea.

- 5 Aunque los términos P5 y P7 se usan a lo largo de la presente descripción para referirse a cebadores inversos y directos, se apreciará que los métodos presentados aquí no se limiten a la escisión de cebadores inversos solamente. En realizaciones alternativas a las descritas en las figuras, el cebador directo se puede escindir, dejando el cebador inverso inmovilizado sobre el soporte sólido.

10 Se puede utilizar cualquiera de los diversos enfoques de oligonucleótidos escindibles, enlazadores escindibles y escisión en los métodos presentados en la presente memoria. Los métodos para escindir oligonucleótidos de un soporte sólido son conocidos en la técnica, como se ejemplifica en la descripción de la patente de EE.UU. nº 8.715.966. Por ejemplo, los cebadores oligonucleotídicos pueden escindirse por vía química, fotoquímica, enzimática o cualquier otra metodología adecuada que escinde todo o una parte de un cebador oligonucleotídico del soporte sólido. Un punto de escisión puede estar situado, por ejemplo, en un punto predeterminado durante la síntesis de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, la escisión química puede lograrse incorporando una o más unidades de diol en el cebador durante la síntesis de oligonucleótidos, o en un enlazador que conecta el oligonucleótido con el soporte sólido, y luego tratando el oligonucleótido que contiene diol con un agente de escisión química tal como peroyodato. En algunas realizaciones, la escisión enzimática puede ser producida por cualquier enzima que pueda cortar o escindir el oligonucleótido inmovilizado. En algunas realizaciones, se puede usar una endonucleasa de restricción o endonucleasa de corte. En algunas realizaciones, se puede generar un punto abásico en el oligonucleótido incorporando desoxiuridina (U) o cualquier otro desoxirribonucleótido no natural o modificado como se describe en los materiales incorporados de la patente de EE.UU. nº 8.715.966. Por ejemplo, la desoxiuridina (U), la 8-oxo-guanina o la desoxiinosina se pueden incorporar en un punto predeterminado durante la síntesis de oligonucleótidos, y luego se puede generar un punto abásico usando uracil ADN glucosilasa (UDG) para la desoxiuridina, FPG glicosilasa para 8-oxo-guanina y AlkA glucosilasa para desoxiinosina. La cadena de polinucleótidos que incluye el punto abásico se puede escindir a continuación por tratamiento con endonucleasa (p. ej. endonucleasa endoIV, AP liasa, FPG glucosilasa/AP liasa, Endo VIII glucosilasa/AP liasa), calor o álcali. Además, o alternativamente, las estrategias de escisión pueden incluir el uso de ribonucleótidos, escisión fotoquímica, ADN hemimetilado o tapones de PCR, como se describe en los materiales incorporados de la patente de EE.UU. nº 8.715.966.

20 Después de la etapa de escisión, el producto de amplificación del proceso de amplificación inicial comprende una cadena inmovilizada y una cadena no inmovilizada, y la cadena no inmovilizada puede amplificarse más luego usando los cebadores restantes inmovilizados en el soporte sólido. Por ejemplo, como se muestra en la figura 1, el producto de amplificación bicatenario se somete a condiciones parcialmente desnaturizantes para facilitar la hibridación de una parte de la cadena no inmovilizada (mostrada como P7') a un cebador no ampliado (P7). El cebador P7 puede ampliarse luego mediante una polimerasa en condiciones adecuadas para la ampliación, generando así una nueva copia de la cadena de plantilla no inmovilizada. Las etapas de desnaturización parcial de la plantilla, hibridación con un cebador nuevo y no ampliado y ampliación pueden repetirse tantas veces como se desee. El proceso puede repetirse muchas veces hasta que los cebadores de superficie disponibles se agoten sustancialmente. En algunas realizaciones, el ciclo a través del proceso puede controlarse, por ejemplo, por desnaturización química o ciclo de temperatura. En algunas realizaciones, el ciclo continúa en condiciones que permiten que el proceso se repita continuamente, sin necesidad de ciclos de temperatura de las condiciones químicas. Por lo tanto, las etapas de desnaturización parcial de la plantilla y la hibridación con el cebador inmovilizado pueden producirse empleando cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la amplificación del cebador recombinasa (RPA) se usa para facilitar la invasión de la cadena y la ampliación posterior de cebadores inmovilizados. Los métodos y componentes para su uso en RPA se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.223.414 y nº 7.399.590 y la publicación de EE.UU. 2013/0225421.

30 Un reactivo para usar en RPA puede incluir componentes adicionales que facilitan la formación de amplicones y, en algunos casos, aumentan la velocidad de formación de amplicones. Un ejemplo es una recombinasa. La recombinasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir la invasión/ampliación repetida. Más específicamente, la recombinasa puede facilitar la invasión de un ácido nucleico diana por la polimerasa y la ampliación de un cebador por la polimerasa usando el ácido nucleico diana como plantilla para la formación de amplicones. Este proceso puede repetirse como una reacción en cadena donde los amplicones producidos en cada ronda de invasión/ampliación sirven como plantillas en una ronda posterior. El proceso puede ocurrir más rápidamente que la PCR normal ya que no se requiere un ciclo de desnaturización (p. ej., por calentamiento o desnaturización química). Como tal, la amplificación facilitada por recombinasa se puede llevar a cabo isotérmicamente. Generalmente es deseable incluir ATP u otros nucleótidos (o en algunos casos análogos no hidrolizables de los mismos) en un reactivo de amplificación facilitado por recombinasa para facilitar la amplificación. Una mezcla de recombinasa y proteína de unión monocatenaria (SSB) es particularmente útil ya que SSB puede facilitar aún más la amplificación. Ejemplos de formulaciones para la amplificación facilitada por recombinasa incluyen las comercializadas como kits TwistAmp por TwistDx (Cambridge, Reino Unido). Los componentes útiles del reactivo de amplificación facilitado por recombinasa y las condiciones de reacción se exponen en las patentes de EE.UU. nº 5.223.414 y nº 7.399.590.

Otro ejemplo de un componente que puede incluirse en un reactivo de amplificación para facilitar la formación de

amplicones y, en algunos casos, para aumentar la velocidad de formación de amplicones es una helicasa. La helicasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir una reacción en cadena de formación de amplicones. El proceso puede tener lugar más rápidamente que la PCR normal ya que no se requiere un ciclo de desnaturalización (p. ej., por calentamiento o desnaturalización química). Como tal, la amplificación facilitada por helicasa se puede llevar a cabo isotérmicamente. Una mezcla de helicasa y proteína de unión monocatenaria (SSB) es especialmente útil ya que SSB puede facilitar aún más la amplificación. Ejemplos de formulaciones para la amplificación facilitada por helicasa incluyen las comercializadas como kits IsoAmp de Biohelix (Beverly, MA). Además, se describen ejemplos de formulaciones útiles que incluyen una proteína helicasa en los documentos US nº 7.399.590 y US nº 7.829.284. Además, o alternativamente, la topoisomerasa se puede usar de manera similar a la helicasa y/o la recombinasa.

10 Alternativamente o además a la metodología RPA descrita anteriormente, las etapas de desnaturalizar e hibridar parcialmente la plantilla a un nuevo cebador inmovilizado pueden tener lugar empleando la tecnología de migración a la plantilla. En algunas realizaciones, la migración a la plantilla usa una  $T_m$  baja del oligo superficial (generalmente > 60% de cebador AT) para facilitar la respiración de los extremos del ADN para que una cadena pueda migrar de cebador a cebador. Los métodos para diseñar oligonucleótidos de superficie y las condiciones para migrar a plantillas se describen en los materiales incorporados de la publicación de EE.UU. 2013/0225421.

15 Alternativa o además a RPA y la migración a la plantilla, las etapas de desnaturalizar e hibridar parcialmente la plantilla a un nuevo cebador inmovilizado pueden producirse usando metodologías cíclicas para alternar entre las condiciones de desnaturalización e hibridación. Por ejemplo, el ciclo de temperatura y el ciclo de desnaturalizantes químicos y similares son conocidos en la técnica y se pueden usar en los métodos presentados en la presente memoria.

20 Además, o alternativamente a las realizaciones descritas anteriormente, se puede proporcionar un cebador en solución en la mezcla RPA para formar parejas plantilla/cebador en solución. Un ejemplo se ilustra en la Fig. 2. Como se muestra en la Fig. 2, después de la escisión de uno de los conjuntos de cebadores (P5), RPA se realiza en presencia de cebadores P5 en solución. Por lo tanto, la ampliación se produce a partir de ambos extremos de la plantilla. Se lleva a cabo una reacción de ampliación para ampliar los cebadores P7 inmovilizados. Además, la invasión de cadenas, la hibridación y la ampliación se llevan a cabo para ampliar los cebadores P5 en fase de solución para formar una copia complementaria de las cadenas inmovilizadas. Esto formará entonces copias adicionales de la cadena P5 que pueden usarse para ocupar mejor los cebadores P7 y acelerar la amplificación, como se muestra en la Fig. 2. En algunas realizaciones, se agrega en solución un nuevo conjunto de cebadores. En algunas realizaciones, los cebadores escindidos se recogen después de la reacción de escisión y se usan en solución para facilitar la amplificación.

Los métodos descritos anteriormente se describen además en las figuras y ejemplos a continuación. En las figuras y ejemplos, la expresión "refuerzo lateral" se refiere a la escisión de uno de los cebadores de superficie, seguido de una segunda ronda de amplificación usando el cebador inmovilizado restante. En algunas realizaciones, el refuerzo lateral se realiza con cebador agregado en solución.

35 La segunda ronda de amplificación que se propone en la presente memoria tiene algunas similitudes con la tecnología de amplificación por migración de plantilla descrita en los materiales incorporados de la publicación de EE.UU. 2013/0225421, también conocida como amplificación "wildfire". Sin embargo, varias diferencias importantes se describen a continuación. Wildfire utiliza la migración de plantilla para hacer la amplificación completa del ADN de la superficie de una sola molécula. Por el contrario, el esquema de amplificación propuesto se utiliza como un refuerzo de intensidad adicional, para amplificar aún más los cientos a miles de moléculas dentro de un grupo que ya se han realizado por amplificación de superficie de 2 cebadores. Por lo tanto, los grupos resultantes son mucho más densos con el producto de amplificación, y la obtención de imágenes de los nucleótidos en los grupos es muchas veces más robusta de lo que cabría esperar usando la amplificación en puente sola o la amplificación wildfire sola. De hecho, es contradictorio escindir uno de los cebadores utilizados en la amplificación de superficie, ya que cabría esperar que la amplificación utilizando cebadores tanto directos como inversos proceda exponencialmente, en comparación con una amplificación lineal con un solo cebador inmovilizado. Como se evidencia en la sección de Ejemplos más adelante, se ha descubierto sorprendentemente que la combinación de la amplificación de superficie habitual en puente o ExAmp con la escisión de uno de los cebadores, seguida de un refuerzo lateral, produce un producto de amplificación que es muchas veces más robusto, lo que permite una utilización significativamente mayor de cebadores de superficie y grupos generadores que son muchas veces más brillantes durante el análisis de exploración óptica. No era de esperar que de la escisión de uno de los cebadores de amplificación en puente resultara la ocupación mejorada.

Realizaciones para la secuenciación de extremos emparejados

Algunas metodologías de secuenciación incluyen la secuenciación de extremos emparejados, que implica una segunda lectura de secuenciación en la cadena opuesta de la primera lectura, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 7.754.429 y nº 8.017.335. En realizaciones típicas, los métodos de extremos emparejados se aprovechan de dos cebadores unidos a la superficie para generar una copia de una cadena secuenciada. Este proceso de regeneración de una cadena complementaria a menudo se conoce como espira de extremos emparejados. Sin embargo, en los métodos descritos anteriormente, uno de los dos tipos de cebadores se escinde de la superficie del soporte sólido, y los extremos emparejados pueden no ser posibles utilizando técnicas tradicionales.

Como alternativa a la regeneración de una cadena complementaria, se podría usar un método alternativo junto con los métodos de amplificación descritos en la presente memoria, como cualquiera de los métodos descritos en la patente de EE.UU. nº 8.192.930.

5 También se proporciona en la presente memoria un método alternativo para generar una cadena complementaria para una segunda lectura. En algunas realizaciones, el método puede comprender proporcionar un primer cebador de superficie que está bloqueado en todas las etapas de amplificación, pero que se desbloquea antes de generar la espira de extremos emparejados. La secuencia complementaria a este cebador de superficie adicional podría estar presente, por ejemplo, en los adaptadores para las genotecas, pero simplemente se amplificaría junto con las inserciones durante la amplificación del grupo. Solo después de desbloquear el cebador de superficie, estaría disponible para  
10 generar las moléculas de la espira del extremo emparejado.

Las figuras 5 y 6 ilustran una realización de este método de espira del extremo emparejado. Como se ilustra en la Fig. 5, un tercer cebador de amplificación (denominado P9) está presente en el soporte sólido durante todo el proceso de agrupación, pero tiene un bloque 3' reversible que evita la ampliación en condiciones adecuadas para la amplificación. Como se muestra en la figura, la genoteca también incluye adaptadores que comprenden el complemento de P9 (denominado P9') colocado entre la secuencia del adaptador P5' y la parte interna a secuenciar. Un punto de escisión, que se puede escindir cuando es monocatenario, también está situado en la parte del adaptador, entre las secuencias del adaptador P9' y P5'. Por lo tanto, después de completar la primera lectura de secuenciación, el bloque 3' se elimina de los cebadores P9 y el punto escindible se escinde, liberando la secuencia P5'. El producto de escisión y desbloqueo resultante se ilustra en el cuadro B de la Fig. 5. Pasando ahora a la Fig. 6, la secuencia del adaptador P9' puede hibridarse con los cebadores P9 en la superficie, y una cadena complementaria puede regenerarse, como se lleva a cabo normalmente en metodologías de espira de extremos emparejados.  
15  
20

#### Fijación de oligonucleótidos a soportes sólidos

En los métodos y composiciones presentados en la presente memoria, los polinucleótidos se inmovilizan en el soporte sólido. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se inmovilizan con enlace covalente al soporte. Cuando se hace referencia a la inmovilización de moléculas (p. ej., ácidos nucleicos) a un soporte sólido, los términos "inmovilizado" y "unido" se emplean indistintamente en la presente memoria y ambos términos están pensados para abarcar el enlace directo o indirecto, covalente o no covalente, a menos que se indique lo contrario, ya sea explícitamente o por contexto. En algunas realizaciones de la invención, se puede preferir el enlace covalente, pero generalmente todo lo que se requiere es que las moléculas (p. ej., ácidos nucleicos) permanezcan inmovilizadas o unidas al soporte en las condiciones en las que se pretende usar el soporte, por ejemplo, en aplicaciones que requieren amplificación y/o secuenciación de ácidos nucleicos.  
25  
30

Algunas realizaciones de la invención pueden hacer uso de soportes sólidos compuestos por un sustrato inerte o matriz (p. ej., portaobjetos de vidrio, perlas de polímero, etc.) que se ha funcionalizado, por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o recubrimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten el enlace covalente a biomoléculas, como los polinucleótidos. Los ejemplos de dichos soportes incluyen, entre otros, hidrogeles de poliacrilamida soportados sobre un sustrato inerte tal como vidrio, especialmente hidrogeles de poliacrilamida como se describe en los documentos WO 2005/065814 y US 2008/0280773.  
35

En dichas realizaciones, las biomoléculas (p. ej., polinucleótidos) pueden estar directamente unidas por enlace covalente al material intermedio (p. ej., hidrogel) pero el material intermedio puede estar unido por enlace no covalente al sustrato o matriz (por ejemplo, sustrato de vidrio). La expresión "enlace covalente a un soporte sólido" debe interpretarse en consecuencia como que abarca este tipo de disposición.  
40

Ejemplos de enlaces covalentes incluyen, por ejemplo, los que resultan del uso de técnicas de química clic. Ejemplos de enlaces no covalentes incluyen, entre otros, interacciones no específicas (p. ej., enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones de Van Der Waals, etc.) o interacciones específicas (p. ej., interacciones de afinidad, interacciones receptor-ligando, interacciones anticuerpo-epítipo, interacciones avidina-biotina, interacciones estreptavidina-biotina, interacciones lectina-carbohidrato, etc.). Ejemplos de enlaces se exponen en las patentes de EE.UU. nº 6.737.236; nº 7.259.258; nº 7.375.234 y nº 7.427.678; y la publicación de la patente de EE.UU. nº 2011/0059865 A1.  
45

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una superficie estampada. Una "superficie estampada" se refiere a una disposición de diferentes regiones en o sobre una capa expuesta de un soporte sólido. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser características donde están presentes uno o más cebadores de amplificación. Las características pueden estar separadas por regiones intersticiales donde los cebadores de amplificación no están presentes. En algunas realizaciones, el patrón puede estar en formato x-y de características que están en filas y columnas. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición repetitiva de características y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el patrón puede estar en una disposición aleatoria de características y/o regiones intersticiales. Ejemplos de superficies estampadas que se pueden usar en los métodos y composiciones expuestos en la presente memoria se describen en el documento US 2013/0116153 o la publicación de patente de EE.UU. nº 2012/0316086.  
50  
55

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una serie de pocillos o depresiones en una superficie. Esto puede fabricarse como se conoce generalmente en la técnica usando una variedad de técnicas, que incluyen, entre otras, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeo y técnicas de micrograbado. Como apreciarán los expertos en la técnica, la técnica utilizada dependerá de la composición y la forma del sustrato de la matriz.

- 5 Las características en una superficie estampada pueden ser pocillos en una serie de pocillos (p. ej. micropocillos o nanopocillos) sobre vidrio, silicio, plástico u otros soportes sólidos adecuados con gel estampado y unido por enlaces covalentes tal como poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM, véase, por ejemplo, el documento WO2013/184976. El proceso crea almohadillas de gel utilizadas para la secuenciación que pueden ser estables durante las series de secuenciación con una gran cantidad de ciclos. El enlace covalente del polímero a los pocillos es útil para mantener el gel en las características estructuradas durante toda la vida útil del sustrato estructurado durante una variedad de usos. Sin embargo, en muchas realizaciones, el gel no necesita estar unido por enlaces covalentes a los pocillos. Por ejemplo, en algunas condiciones, acrilamida libre de silano (SFA, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2011/0059865) que no está unida por enlace covalente a ninguna parte del sustrato estructurado, puede usarse como material de gel.
- 10
- 15 En determinadas realizaciones, se puede hacer un sustrato estructurado modelando un material de soporte sólido con pocillos (p. ej., micropocillos o nanopocillos), recubriendo el soporte modelado con un material de gel (p. ej., PAZAM, SFA o variantes químicamente modificadas de los mismos, como la versión azidolizada de SFA (azido-SFA)) y puliendo el soporte recubierto de gel, por ejemplo mediante pulido químico o mecánico, reteniendo así el gel en los pocillos pero eliminando o inactivando sustancialmente todo el gel de las regiones intersticiales en la superficie del sustrato estructurado entre el pocillos. Los ácidos nucleicos cebadores pueden unirse al material de gel. Una solución de ácidos nucleicos diana (p. ej., un genoma humano fragmentado) puede ponerse en contacto con el sustrato pulido de modo que cada uno de los ácidos nucleicos diana se sembrará en cada uno de los pocillos mediante interacciones con cebadores unidos al material de gel; sin embargo, los ácidos nucleicos diana no ocuparán las regiones intersticiales debido a la ausencia o inactividad del material de gel. La amplificación de los ácidos nucleicos diana se confinará en los pocillos ya que la ausencia o inactividad del gel en las regiones intersticiales evita la migración hacia el exterior de la colonia de ácido nucleico en crecimiento. El proceso se puede llevar a cabo convenientemente, pudiendo ampliarse y utilizando métodos convencionales de micro o nano fabricación.
- 20
- 25

#### Amplificación y agrupamiento

- 30 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se amplifican usando metodologías de amplificación en grupo como se ejemplifica en las descripciones de las patentes de EE.UU. nº. 7.985.565 y nº 7.115.400. Los materiales incorporados de las patentes de EE.UU. nº 7.985.565 y nº 7.115.400 describen métodos de amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida que permiten que los productos de amplificación se inmovilicen sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas de grupos o "colonias" de moléculas de ácido nucleico inmovilizado. Cada grupo o colonia en dicha matriz se forma a partir de un gran número de cadenas polinucleotídicas inmovilizadas idénticas y un gran número de cadenas polinucleotídicas complementarias inmovilizadas idénticas. Las matrices así formadas se denominan generalmente en la presente memoria "matrices agrupadas". Los productos de las reacciones de amplificación en fase sólida como los descritos en las patentes de EE.UU. nº 7.985.565 y 7.115.400 son las denominadas estructuras "puenteadas" formadas por hibridación de pares de cadenas de polinucleótidos inmovilizadas y cadenas complementarias inmovilizadas, ambas cadenas están inmovilizadas en el soporte sólido en el extremo 5', preferiblemente mediante un enlace covalente. Las metodologías de amplificación en grupo son ejemplos de métodos en los que se usa una plantilla de ácido nucleico inmovilizado para producir amplicones inmovilizados. También se pueden usar otras metodologías adecuadas para producir amplicones inmovilizados a partir de fragmentos de ADN inmovilizados producidos según los métodos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, uno o más grupos o colonias pueden formarse por PCR en fase sólida, si uno o ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación están inmovilizados.
- 35
- 40
- 45

- En otras realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se amplifican en solución. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se escinden o si no se liberan del soporte sólido y los cebadores de amplificación se hibridan en solución con las moléculas liberadas. En otras realizaciones, los cebadores de amplificación se hibridan con los fragmentos de ADN inmovilizados por una o más etapas de amplificación iniciales, seguidas de las etapas de amplificación posteriores en solución. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede usar una plantilla de ácido nucleico inmovilizado para producir amplicones en fase de solución.
- 50

#### Métodos de secuenciación

- Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse junto con varias técnicas de secuenciación de ácido nucleico. Las técnicas especialmente aplicables son aquellas en las que los ácidos nucleicos se unen en puntos fijos en una matriz de manera que sus posiciones relativas no cambian y en las que la matriz se reproduce repetidamente. Las realizaciones en las que se obtienen imágenes en diferentes canales de color, por ejemplo, coincidiendo con diferentes marcadores utilizados para distinguir un tipo de base nucleotídica de otra, son especialmente aplicables. En algunas realizaciones, el proceso para determinar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana puede ser un proceso automatizado. Las realizaciones preferidas incluyen técnicas de secuenciación por síntesis ("SBS").
- 55

Las técnicas de SBS generalmente implican la ampliación enzimática de una cadena de ácido nucleico naciente a través de la adición iterativa de nucleótidos contra una cadena de plantilla. En los métodos tradicionales de SBS, se puede proporcionar un monómero nucleotídico único a un nucleótido diana en presencia de una polimerasa en cada suministro. Sin embargo, en los métodos descritos en la presente memoria, se puede proporcionar más de un tipo de monómero nucleotídico a un ácido nucleico diana en presencia de una polimerasa en un suministro.

SBS puede utilizar monómeros nucleotídicos que tienen un resto terminador o aquellos que carecen de cualquier resto terminador. Los métodos que utilizan monómeros nucleotídicos que carecen de terminadores incluyen, por ejemplo, pirosecuenciación y secuenciación usando nucleótidos marcados con  $\gamma$ -fosfato, como se expone con más detalle a continuación. En los métodos que usan monómeros nucleotídicos que carecen de terminadores, el número de nucleótidos añadidos en cada ciclo es generalmente variable y depende de la secuencia de plantilla y el modo de suministro de nucleótidos. Para las técnicas SBS que utilizan monómeros nucleotídicos que tienen un resto terminador, el terminador puede ser efectivamente irreversible en las condiciones de secuenciación utilizadas, como es el caso de la secuenciación de tradicional que utiliza dideoxinucleótidos, o el terminador puede ser reversible, como es el caso de los métodos de secuenciación desarrollados por Solexa (actualmente Illumina, Inc.).

Las técnicas de SBS pueden utilizar monómeros nucleotídicos que tienen un resto marcador o los que carecen de un resto marcador. En consecuencia, se pueden detectar casos de incorporación en función de una característica del marcador, como la fluorescencia del marcador; una característica del monómero nucleotídico tal como el peso molecular o la carga; un subproducto de la incorporación del nucleótido, como la liberación de pirofosfato; o similar. En realizaciones, donde dos o más nucleótidos diferentes están presentes en un reactivo de secuenciación, los diferentes nucleótidos pueden distinguirse entre sí, o alternativamente, los dos o más marcadores diferentes pueden ser indistinguibles en las técnicas de detección que se utilizan. Por ejemplo, los diferentes nucleótidos presentes en un reactivo de secuenciación pueden tener diferentes marcadores y pueden distinguirse usando ópticas apropiadas según se ejemplifica mediante los métodos de secuenciación desarrollados por Solexa (actualmente Illumina, Inc.).

Las realizaciones preferidas incluyen técnicas de pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPI) a medida que se incorporan cada uno de los nucleótidos en la cadena naciente (Ronaghi, M. Karamohamed, S. Pettersson, B. Uhlen, M. y Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release". *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing". *Genome Res.* 11 (1), 3-11; Ronaghi, M. Uhlen, M. y Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate". *Science* 281 (5375), 363; patente de EE.UU. nº 6.210.891; patente de EE.UU. nº 6.258.568 y patente de EE.UU. nº 6.274.320.). En la pirosecuenciación, el PPI liberado puede detectarse al convertirse inmediatamente en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfurilasa, y la cantidad de ATP generado se detecta por los fotones producidos por la luciferasa. Los ácidos nucleicos que se van a secuenciar se pueden unir a las características en una matriz y la matriz puede fotografiarse para capturar las señales quimioluminiscentes que se producen debido a la incorporación de nucleótidos en las características de la matriz. Se puede obtener una imagen después de que la matriz se trata con un tipo de nucleótido concreto (por ejemplo, A, T, C o G). Las imágenes obtenidas después de la adición de cada tipo de nucleótido diferirán con respecto a qué características de la matriz se detectan. Estas diferencias en la imagen reflejan el contenido de secuencia diferente de las características en la matriz. Sin embargo, las posiciones relativas de cada característica permanecerán sin cambios en las imágenes. Las imágenes se pueden almacenar, procesar y analizar utilizando los métodos expuestos en la presente memoria. Por ejemplo, las imágenes obtenidas después del tratamiento de la matriz con cada tipo de nucleótido diferente se pueden manejar de la misma manera que se ejemplifica en la presente memoria para imágenes obtenidas de diferentes canales de detección para métodos de secuenciación basados en terminadores reversibles.

En otro tipo de SBS a modo de ejemplo, la secuenciación del ciclo se lleva a cabo mediante la adición paso a paso de nucleótidos terminadores reversibles que contienen, por ejemplo, un marcador de colorante escindible o fotodecolorable como se describe, por ejemplo, en el documento WO 04/018497 y la patente de EE.UU. nº 7.057.026. Este método está siendo comercializado por Solexa (actualmente Illumina Inc.), y también se describe en los documentos WO 91/06678 y WO 07/123.744. La disponibilidad de terminadores marcados con fluorescencia en los que tanto la terminación puede invertirse como el marcador fluorescente escindir se facilita la secuenciación eficiente de terminación reversible cíclica (TRC). Las polimerasas también pueden diseñarse conjuntamente para incorporar y ampliarse eficazmente a partir de estos nucleótidos modificados.

Preferiblemente en realizaciones de secuenciación basadas en terminador reversible, los marcadores no inhiben sustancialmente la ampliación en condiciones de reacción de SBS. Sin embargo, los marcadores de detección pueden ser extraíbles, por ejemplo, por escisión o degradación. Se pueden capturar imágenes después de la incorporación de marcadores en características de ácido nucleico ordenadas. En determinadas realizaciones, cada ciclo implica el suministro simultáneo de cuatro tipos de nucleótidos diferentes a la matriz y cada tipo de nucleótido tiene un marcador espectralmente distinto. Entonces se pueden obtener cuatro imágenes, cada una utilizando un canal de detección que es selectivo para uno de los cuatro marcadores diferentes. Alternativamente, se pueden agregar diferentes tipos de nucleótidos secuencialmente y se puede obtener una imagen de la matriz entre cada paso de adición. En dichas realizaciones, cada imagen mostrará características de ácido nucleico que tienen nucleótidos incorporados de un tipo determinado. Diferentes características estarán presentes o ausentes en diferentes imágenes debido al diferente contenido de secuencia de cada característica. Sin embargo, la posición relativa de las características permanecerá inalterada en las imágenes. Las imágenes obtenidas de dichos métodos reversibles de terminador-SBS pueden

almacenarse, procesarse y analizarse como se expone en la presente memoria. Después de la etapa de captura de imágenes, se pueden eliminar los marcadores y se pueden eliminar los restos terminadores reversibles para los ciclos posteriores de adición y detección de nucleótidos. La eliminación de los marcadores una vez se hayan detectado en un ciclo concreto y antes de un ciclo posterior puede proporcionar la ventaja de reducir la señal de fondo y la diafonía entre ciclos. A continuación, se exponen ejemplos de marcadores útiles y métodos de eliminación.

En determinadas realizaciones, algunos o todos los monómeros nucleotídicos pueden incluir terminadores reversibles. En dichas realizaciones, los terminadores reversibles/flúoros escindibles pueden incluir flúor unido al resto ribosa mediante un enlace éster 3' (Metzker, *Genome Res.* 15: 1767-1776 (2005),). Otros métodos han separado la química del terminador de la escisión del marcador de fluorescencia (Ruparel *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5932-7 (2005),). Ruparel *et al.* describieron el desarrollo de terminadores reversibles que usaban un pequeño grupo alilo 3' para bloquear la ampliación, pero que podían desbloquearse fácilmente mediante un tratamiento breve con un catalizador de paladio. El fluoróforo se unió a la base a través de un enlazador fotoescindible que podría escindirse fácilmente por una exposición de 30 segundos a la luz UV de longitud de onda larga. Por lo tanto, pueden usarse la reducción con disulfuro o la fotoescisión como enlace escindible. Otro método para la terminación reversible es el uso de terminación natural que sigue después de la colocación de un tinte voluminoso en un dNTP. La presencia de un tinte voluminoso cargado en el dNTP puede actuar como un terminador eficaz por impedimento estérico y/o electrostático. La presencia de un episodio de incorporación evita nuevas incorporaciones a menos que se elimine el tinte. La escisión del tinte elimina el flúor y invierte eficazmente la terminación. En las patentes de EE.UU. nº 7.427.673 y nº 7.057.026 se describen también ejemplos de nucleótidos modificados.

Más sistemas y métodos SBS ejemplares que se pueden utilizar con los métodos y sistemas descritos en la presente memoria se describen en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0166705, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0188901, la patente de EE.UU. nº 7.057.026, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0240439, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0281109, la publicación PCT nº WO 05/065814, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2005/0100900, la publicación PCT nº WO 06/064199, la publicación PCT nº WO 07/010251, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2012/0270305 y la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2013/0260372.

Algunas realizaciones pueden utilizar la detección de cuatro nucleótidos diferentes usando menos de cuatro marcadores diferentes. Por ejemplo, SBS se puede realizar utilizando métodos y sistemas descritos en los materiales incorporados de la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2013/0079232. Como primer ejemplo, se puede detectar un par de tipos de nucleótidos en la misma longitud de onda, pero distinguidos en función de una diferencia de intensidad para un miembro del par en comparación con el otro, o en función de un cambio en un miembro del par (p. ej. mediante modificación química, modificación fotoquímica o modificación física) que hace que la señal aparente aparezca o desaparezca en comparación con la señal detectada para el otro miembro del par. Como segundo ejemplo, se pueden detectar tres de cuatro tipos diferentes de nucleótidos en determinadas condiciones, mientras que un cuarto tipo de nucleótido carece de un marcador que sea detectable en esas condiciones, o se detecta mínimamente en esas condiciones (p. ej., detección mínima debido a fluorescencia de fondo, etc. La incorporación de los primeros tres tipos de nucleótidos en un ácido nucleico puede determinarse en función de la presencia de sus respectivas señales y la incorporación del cuarto tipo de nucleótidos en el ácido nucleico puede determinarse en base a la ausencia o detección mínima de cualquier señal. Como tercer ejemplo, un tipo de nucleótido puede incluir marcador(es) que se detectan en dos canales diferentes, mientras que otros tipos de nucleótidos se detectan en no más de uno de los canales. Las tres configuraciones ejemplares mencionadas anteriormente no se consideran mutuamente excluyentes y pueden usarse en varias combinaciones. Un ejemplo de realización que combina los tres ejemplos, es un método SBS basado en fluorescencia que usa un primer tipo de nucleótido que se detecta en un primer canal (p. ej., dATP que tiene un marcador que se detecta en el primer canal cuando se excita por una primera longitud de onda de excitación), un segundo tipo de nucleótido que se detecta en un segundo canal (p. ej., dCTP que tiene un marcador que se detecta en el segundo canal cuando se excita por una segunda longitud de onda de excitación), un tercer tipo de nucleótido que se detecta tanto en el primer canal como en el segundo (p. ej., dTTP que tiene al menos un marcador que se detecta en ambos canales cuando se excita por la primera y/o la segunda longitud de onda de excitación) y un cuarto tipo de nucleótido que carece de un marcador que no se detecta, o mínimamente, en ninguno de los canales (p. ej., dGTP que no tiene marcador).

Además, como se describe en los materiales incorporados de la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2013/0079232, los datos de secuenciación se pueden obtener utilizando un solo canal. En los llamados métodos de secuenciación de un colorante, se marca el primer tipo de nucleótido, pero el marcador se elimina una vez que se genera la primera imagen, y el segundo tipo de nucleótido se marca solo después de que se genera una primera imagen. El tercer tipo de nucleótido conserva su marcador tanto en la primera como en la segunda imagen, y el cuarto tipo de nucleótido permanece sin marcar en ambas imágenes.

Algunas realizaciones pueden utilizar secuenciación mediante técnicas de ligadura. Dichas técnicas utilizan ADN ligasa para incorporar oligonucleótidos e identificar la incorporación de dichos oligonucleótidos. Los oligonucleótidos generalmente tienen diferentes marcadores que están correlacionados con la identidad de un nucleótido concreto en una secuencia con la cual los oligonucleótidos se hibridan. Al igual que con otros métodos de SBS, se pueden obtener imágenes después del tratamiento de una serie de características de ácido nucleico con los reactivos de secuenciación marcados. Cada imagen mostrará características de ácido nucleico que han incorporado marcadores de un tipo

determinado. Diferentes características estarán presentes o ausentes en las diferentes imágenes debido al contenido de secuencia diferente de cada característica, pero la posición relativa de las características permanecerá inalterada en las imágenes. Las imágenes obtenidas de los métodos de secuenciación basados en la ligadura se pueden almacenar, procesar y analizar como se expone en la presente memoria. Ejemplos de sistemas y métodos de SBS que se pueden utilizar con los métodos y sistemas descritos en la presente memoria se describen en la patente de EE.UU. nº 6.969.488, la patente de EE.UU. nº 6.172.218 y la patente de EE.UU. nº 6.306.597.

Algunas realizaciones pueden utilizar secuenciación de nanoporos (Deamer, D. W. y Akeson, M. "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing". *Trends Biotechnol.* 18, 147-151 (2000); Deamer, D. y D. Branton, "Characterization of nucleic acids nanopore analysis". *Acc. Chem Res.* 35: 817-825 (2002); Li, J. M. Gershow, D. Stein, E. Brandin y J. A. Golovchenko, "DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope" *Nat. Mater.* 2: 611-615 (2003),). En dichas realizaciones, el ácido nucleico objetivo pasa a través de un nanoporo. El nanoporo puede ser un poro sintético o una proteína de membrana biológica, como la  $\alpha$ -hemolisina. A medida que el ácido nucleico objetivo pasa a través del nanoporo, cada par de bases puede identificarse midiendo las fluctuaciones en la conductancia eléctrica del poro. (Patente de EE.UU. nº 7.001.792; Soni, G. V. y Meller, "A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores". *Clin. Chem.* 53, 1996-2001 (2007); Healy, K. "Nanopore-based single-molecule DNA analysis". *Nanomed.* 2, 459-481 (2007); Cockroft, S. L. Chu, J. Amorin, M. y Ghadiri, M. R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution". *J. Am. Chem. Soc.* 130, 818-820 (2008),). Los datos obtenidos de la secuenciación de nanoporos pueden almacenarse, procesarse y analizarse como se expone en la presente memoria. En particular, los datos pueden tratarse como una imagen según el tratamiento ejemplar de imágenes ópticas y otras imágenes que se exponen en la presente memoria.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican el seguimiento en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar mediante interacciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa que contiene fluoróforo y nucleótidos marcados con  $\gamma$ -fosfato como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.329.492 y la patente de EE.UU. nº 7.211.414 o las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse con guías de ondas en modo cero como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.315.019 y utilizando análogos de nucleótidos fluorescentes y polimerasas diseñadas como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.405.281 y la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 2008/0108082. La iluminación se puede restringir a un volumen a escala de zeptolitros alrededor de una polimerasa fijada a la superficie de manera que se pueda observar la incorporación de nucleótidos marcados con fluorescencia con poca información (Levene, M. J. *et al.* "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations". *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist, P. M. *et al.* "Parallel confocal detection of single molecules in real time". *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korchak, J. *et al.* "Selective aluminium passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode Waveguide nano structures". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008). Las imágenes obtenidas de dichos métodos pueden almacenarse, procesarse y analizarse como se expone en la presente memoria.

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de ampliación. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están comercializadas en Ion Torrent (Guilford, CT, subsidiaria de Life Technologies) o los métodos y sistemas de secuenciación descritos en los documentos US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1 o US 2010/0282617. Los métodos expuestos en la presente memoria para amplificar ácidos nucleicos objetivo usando exclusión cinética se pueden aplicar fácilmente a sustratos utilizados para detectar protones. Más específicamente, los métodos expuestos en la presente memoria pueden usarse para producir poblaciones clonales de amplicones que se utilizan para detectar protones.

Los métodos SBS anteriores pueden llevarse a cabo convenientemente en formatos múltiple de manera que múltiples ácidos nucleicos objetivo diferentes se manipulan simultáneamente. En determinadas realizaciones, se pueden tratar diferentes ácidos nucleicos objetivo en un recipiente de reacción común o en una superficie de un sustrato determinado. Esto permite la entrega conveniente de reactivos de secuenciación, la eliminación de reactivos sin reaccionar y la detección de casos de incorporación de manera múltiple. En realizaciones que usan ácidos nucleicos objetivo unidos a la superficie, los ácidos nucleicos objetivo pueden estar en un formato de matriz. En un formato de matriz, los ácidos nucleicos objetivo pueden unirse generalmente a una superficie de manera distinguible en el espacio. Los ácidos nucleicos objetivo pueden unirse por enlace covalente directo, enlace a una bolita u otra partícula o enlace a una polimerasa u otra molécula que está unida a la superficie. La matriz puede incluir una copia única de un ácido nucleico objetivo en cada punto (también denominado característica) o múltiples copias que tienen la misma secuencia pueden estar presentes en cada punto o característica. Se pueden producir copias múltiples por métodos de amplificación tales como amplificación en puente o PCR en emulsión como se describe con más detalle a continuación.

Los métodos expuestos en la presente memoria pueden usar matrices que tienen características en cualquiera de una variedad de densidades incluidas, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 características/cm<sup>2</sup>, 100 características/cm<sup>2</sup>, 500 características/cm<sup>2</sup>, 1.000 características/cm<sup>2</sup>, 5.000 características/cm<sup>2</sup>, 10.000 características/cm<sup>2</sup>, 50.000 características/cm<sup>2</sup>, 100.000 características/cm<sup>2</sup>, 1.000.000 características/cm<sup>2</sup>, 5.000.000 características/cm<sup>2</sup>, o más.

Una ventaja de los métodos expuestos en la presente memoria es que proporcionan una detección rápida y eficiente

de un gran número de ácidos nucleicos objetivo en paralelo. Por consiguiente, la presente descripción proporciona sistemas integrados capaces de preparar y detectar ácidos nucleicos usando técnicas conocidas en la técnica tales como las ejemplificadas anteriormente. Por lo tanto, un sistema integrado de la presente descripción puede incluir componentes fluidicos capaces de suministrar reactivos de amplificación y/o reactivos de secuenciación a uno o más fragmentos de ADN inmovilizados, comprendiendo el sistema componentes tales como bombas, válvulas, depósitos, líneas de fluidos y similares. Una celda de flujo puede configurarse y/o usarse en un sistema integrado para la detección de ácidos nucleicos objetivo. Ejemplos de celdas de flujo se describen, por ejemplo, en los documentos US 2010/0111768 A1 y WO2012/096703. Como se ejemplifica para las celdas de flujo, uno o más de los componentes fluidicos de un sistema integrado pueden usarse para un método de amplificación y para un método de detección. Tomando como ejemplo una realización de secuenciación de ácido nucleico, uno o más de los componentes fluidicos de un sistema integrado se pueden usar para un método de amplificación expuesto en la presente memoria y para la administración de reactivos de secuenciación en un método de secuenciación como los ejemplificados anteriormente. Alternativamente, un sistema integrado puede incluir sistemas fluidicos separados para llevar a cabo métodos de amplificación y llevar a cabo métodos de detección. Los ejemplos de sistemas de secuenciación integrados que son capaces de crear ácidos nucleicos amplificados y también determinar la secuencia de los ácidos nucleicos incluyen, entre otros, la plataforma MiSeq™ (Illumina, Inc. San Diego, CA) y los dispositivos descritos en el documento WO2012/096703.

#### Ejemplo 1

##### Análisis comparativo de los métodos de amplificación con el primer ciclo de secuenciación

Este ejemplo describe una comparación de la amplificación ExAmp típica con otros métodos incluidos un posterior episodio de escisión del cebador y amplificación en condiciones de desnaturalización parcial, con o sin la adición de cebador en solución.

Se sembró una celda de flujo HiSeq de lectura única típica (Illumina) con 2 pM de genoteca humana CT9814. Los grupos fueron generados por v1 ExAmp (Illumina, PCX1/2/3) con 15 minutos de amplificación. Los carriles se trataron con peryodato para linealizar el P5 escindiendo el enlazador diol, eliminando así completamente el cebador P5. Los grupos se trataron para aumentar la señal calentando a 38°C y luego enjuagando con reactivos v1 Ex1mp de Illumina (carril 2) o reactivos ExAmp y oligo P5/SBS3 (carril 3) durante 10 minutos. El carril 1 no se trató más y se usó como referencia (referencia sin ExAmp). La celda de flujo se tiñó con SYBR Green (Molecular, Probes dilución 1/5000 en Tris 0,1 M/ascorbato de sodio 0,1 M) y se tomó una imagen en un microscopio de fluorescencia.

Como se muestra en el cuadro superior de la Fig. 3, los grupos en el carril de referencia 1 eran grupos normales con intensidad normal, mientras que al quitar el cebador P5 de superficie y realizar una incubación adicional con ExAmp se demostró que resultaban grupos más brillantes, como se destaca al normalizar la escala de grises al carril 1 (carril 2, Fig. 3 cuadro inferior). El carril 3 mostró una amplificación adicional que se produce hacia afuera desde los grupos originales, como lo indica el resultado de blanqueamiento visto después de la normalización en escala de grises.

Por lo tanto, los grupos sometidos a refuerzo lateral parecen tener un producto de amplificación significativamente mayor en cada grupo, generando una señal fluorescente mucho más robusta.

#### Ejemplo 2

##### Análisis comparativo de los métodos de amplificación con el primer ciclo de secuenciación

Después del análisis descrito en el ejemplo 1 anterior, se preparó la celda de flujo a continuación para hacer un primer ciclo de incorporación de secuenciación hibridando un cebador de secuenciación y enjuagando sobre la mezcla IMX de Illumina Incorporation a 55°C durante 5 minutos. La mezcla de incorporación incluye polimerasa y una mezcla marcada de dNTP bloqueados en 3'. Después de lavar con el tampón de lavado PR2 de Illumina, se enjuagó una mezcla de análisis de Tris 0,1M/ascorbato de sodio 0,1M en la celda de flujo y se tomaron imágenes del primer ciclo en un microscopio de fluorescencia, como se muestra en la Fig. 4. Se realizó un análisis de imagen adicional por cuantificar la tinción Cy3 y Cy5 de los grupos en cada carril. Como se muestra en el cuadro inferior de la Fig. 4, la cuantificación demuestra que el refuerzo lateral solo (carril 2) genera grupos que son al menos 2 veces más brillantes en comparación con la referencia. El refuerzo lateral con el cebador de solución (carril 3) produce grupos que son más de 6 veces más brillantes en comparación con la referencia.

El término que comprende está pensado en la presente memoria para ser de extremos abiertos, incluidos no solo los elementos mencionados, sino que abarca además cualquier elemento adicional.

Se han descrito varias realizaciones. No obstante, debe entenderse que se pueden hacer varias modificaciones. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar plantillas inmovilizadas para una reacción de secuenciación de ácido nucleico que comprende:
  - 5 (a) proporcionar un soporte sólido que tiene un gran número de cebadores de amplificación directos e inversos inmovilizados sobre el mismo, en donde un subconjunto de dicho gran número de cebadores de amplificación comprende un punto de escisión;
  - (b) amplificar una plantilla de ácido nucleico objetivo usando el subconjunto de cebadores de amplificación en el soporte para producir un gran número de moléculas de ácido nucleico bicatenario, en donde ambas cadenas de cada molécula de ácido nucleico bicatenario están unidas al soporte sólido en sus extremos 5';
  - 10 (c) escindir el subconjunto de cebadores de amplificación en el punto de escisión para producir un producto de amplificación linealizado que comprende una cadena no inmovilizada hendida y una cadena inmovilizada complementaria; y
  - 15 (d) someter el producto de amplificación a condiciones parcialmente desnaturalizantes para facilitar la hibridación de una parte terminal 3'' de la cadena no inmovilizada escindida con un cebador de amplificación inmovilizado complementario, seguido de la ampliación del cebador de amplificación inmovilizado para generar una copia inmovilizada de la cadena no inmovilizada del producto de amplificación.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el subconjunto de cebadores unidos a la superficie son los cebadores directos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el subconjunto de cebadores unidos a la superficie son los cebadores inversos.
4. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones parcialmente desnaturalizantes comprenden agregar uno o más componentes de una reacción de amplificación de recombinasa/polimerasa para facilitar la invasión de la cadena.
5. El método de la reivindicación 1, en el que las condiciones parcialmente desnaturalizantes comprenden someter la plantilla a condiciones adecuadas para la migración de la plantilla.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (d) comprende aplicar cebadores en solución para facilitar la hibridación de los cebadores al extremo no inmovilizado del producto de amplificación inmovilizado.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el subconjunto de cebadores comprende cebadores directos de amplificación y los cebadores en solución comprenden cebadores directos de amplificación.
8. El método de la reivindicación 6, en el que el subconjunto de cebadores comprende cebadores inversos de amplificación y los cebadores en solución comprenden cebadores inversos de amplificación.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además secuenciar el ácido nucleico objetivo.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la secuenciación del ácido nucleico objetivo comprende:
  - hibridar uno o más cebadores de secuenciación con una cadena de ácido nucleico inmovilizado;
  - 35 ampliar uno o más cebadores de secuenciación incorporando uno o más nucleótidos marcados en una cadena naciente; y
  - detectar los nucleótidos marcados, obteniendo así información de secuencias sobre el ácido nucleico objetivo.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho soporte sólido es plano.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho soporte sólido comprende micropocillos.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho ácido nucleico objetivo tiene una longitud de al menos 10, 20, 50, 100, 200 o al menos 500 nucleótidos.

Refuerzo lateral - sin cebador en solución

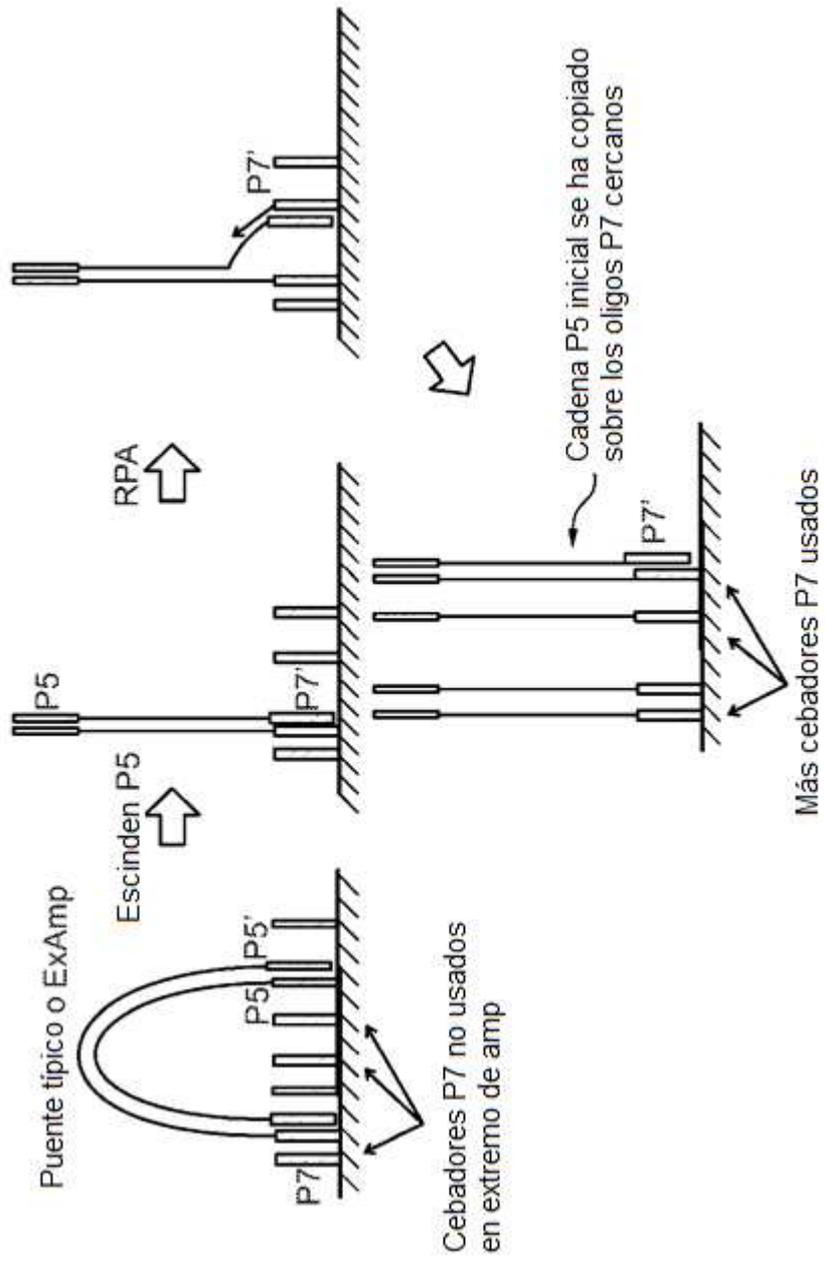


Fig. 1

Refuerzo lateral - cebador P5 en solución

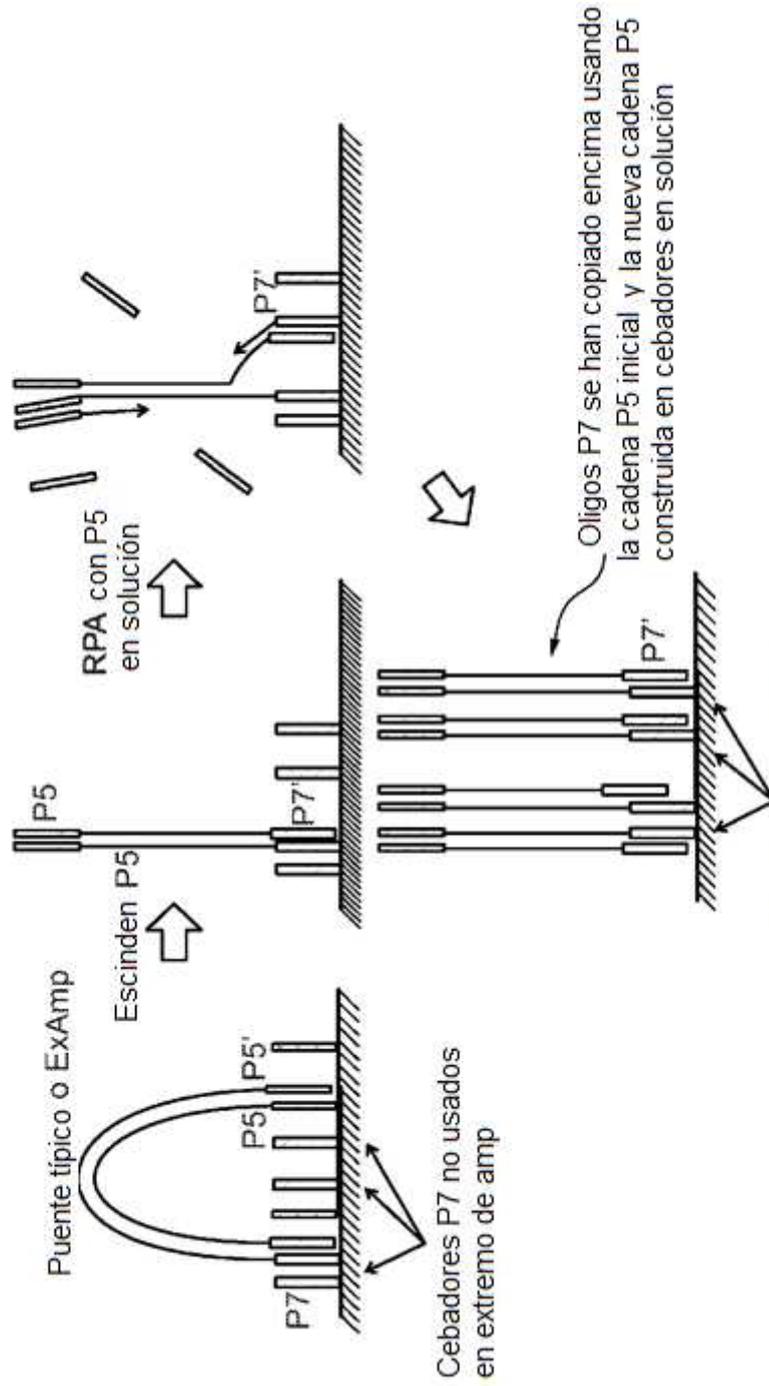


Fig. 2

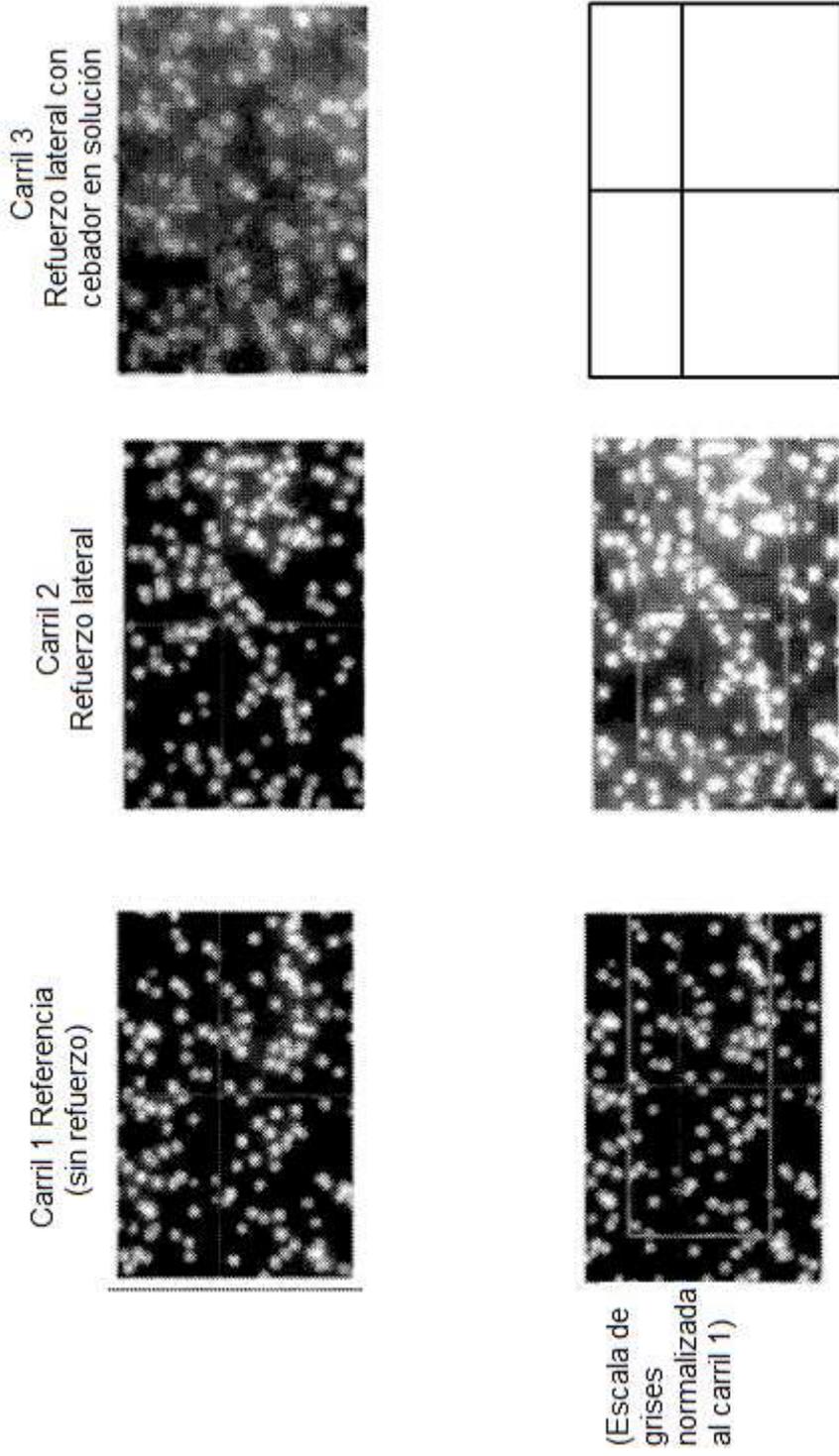


Fig. 3

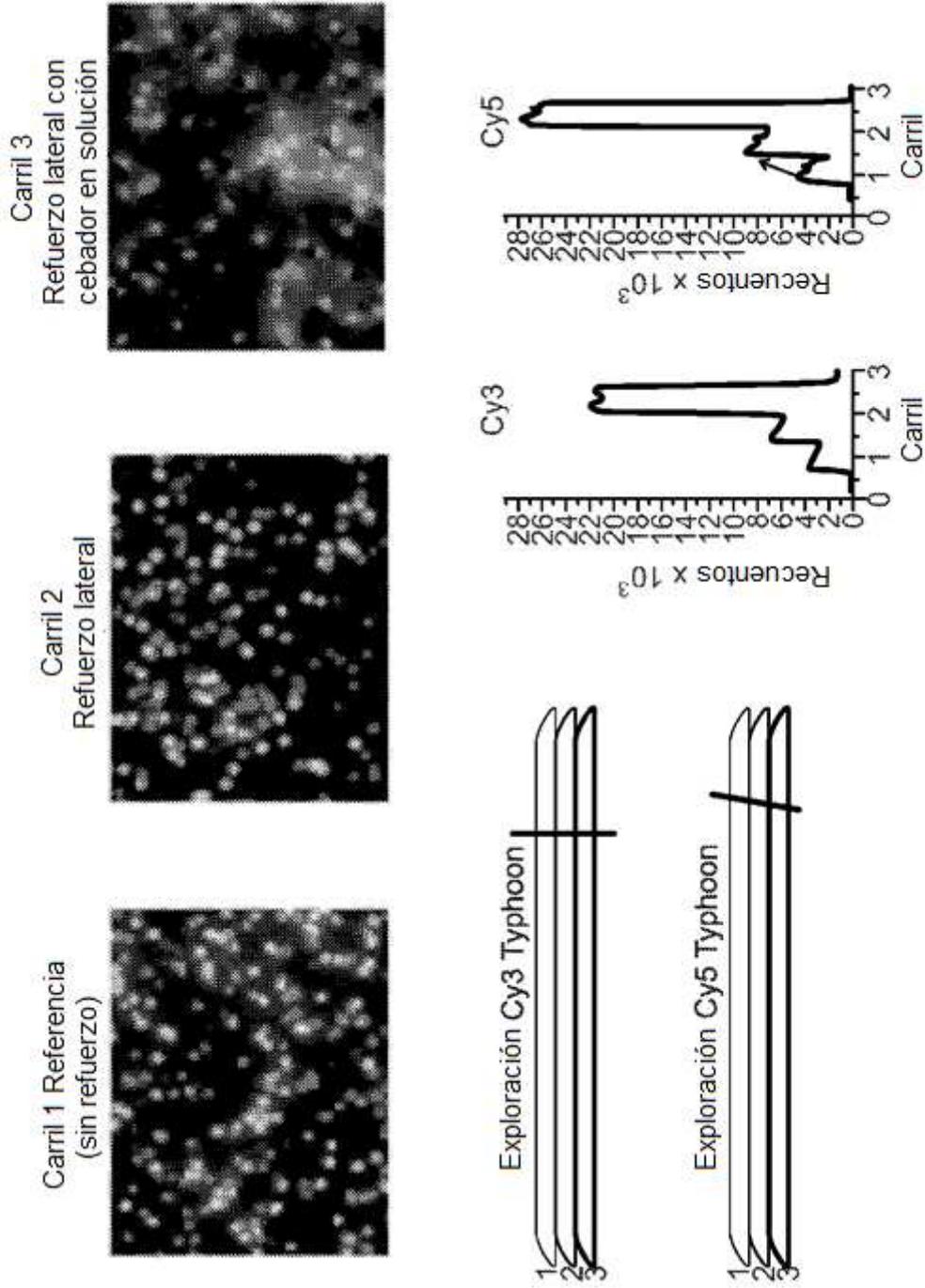


Fig. 4

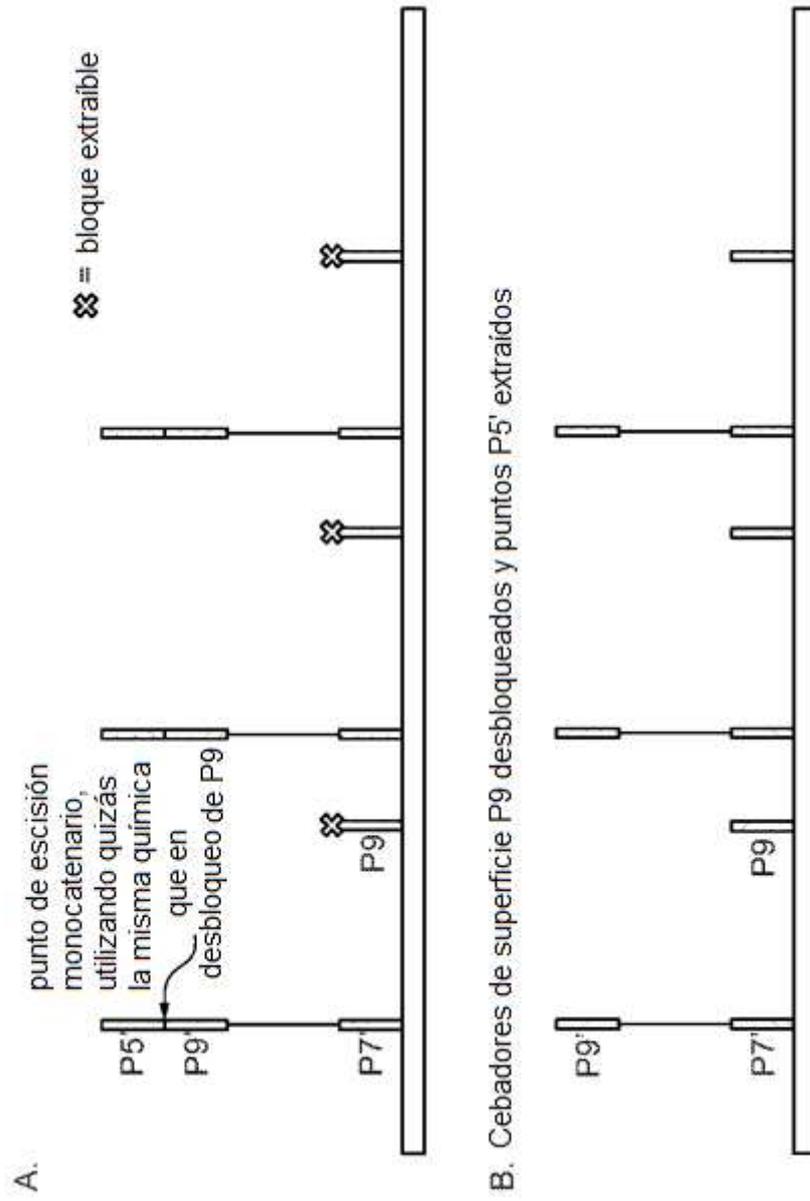
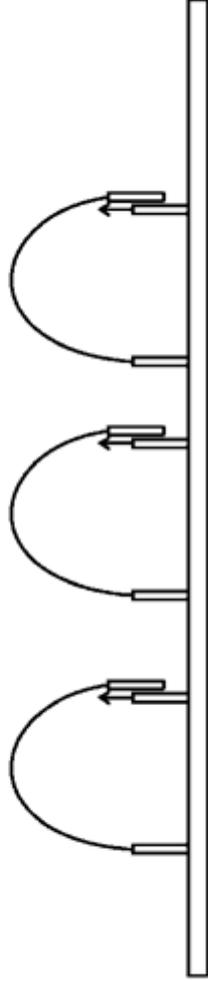


Fig. 5

C. Los puentes se forman ahora con hibridación P9/P9' y puede proceder la síntesis de cadenas 2 de lectura



D. Cebadores P7 linealizados y moléculas 1 de lectura extraída, moléculas 2 de lectura ahora listas para prep y secuenciación

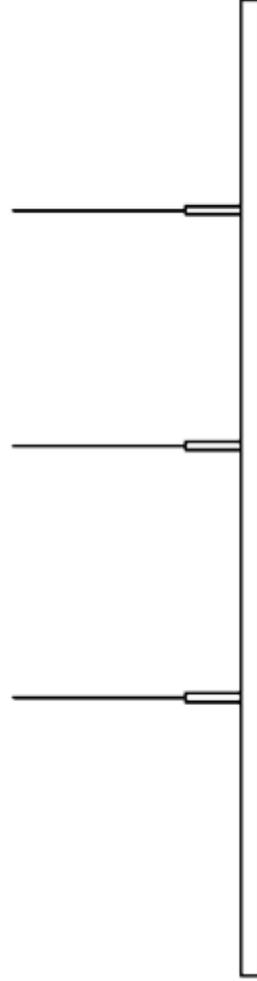


Fig. 6