

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 080**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6855 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2017 PCT/EP2017/068087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2018 WO18015365**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2017 E 17748413 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 3485037**

54 Título: **Moldes asimétricos y procedimiento asimétrico de secuenciación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

18.07.2016 US 201662363653 P

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

11.05.2022

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CHEN, RUI;
GUETTOUCHE, TOUMY;
NAVARRO, LOIDA y
RICHARDSON, AARON**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 910 080 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

Moldes asimétricos y procedimiento asimétrico de secuenciación de ácido nucleico

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la secuenciación de ácido nucleico y más específicamente, a preparar moldes circulares para la secuenciación de ácido nucleico.

10 **Antecedentes de la invención**

El uso de moldes circulares para secuenciación es conocido en la técnica. Por ejemplo, Pacific Biosciences usa un adaptador SMRTBell™ para producir dichos moldes. Véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 7.302.146 y 8.153.375. Los moldes monocatenarios circulares tienen varias ventajas en la secuenciación por síntesis: si una polimerasa de secuenciación puede realizar la replicación de círculo rodante, el molde se leerá múltiples veces y se leerán ambas hebras de Watson y Crick. Las múltiples lecturas de hebras emparejadas prometen un rendimiento de secuencias consenso más exacto. Sin embargo, los moldes circulares existentes se diseñan para unir dos polimerasas de secuenciación a cada molde. Las dos polimerasas tienen el potencial de interferir entre sí y provocar un estancamiento o terminación de la síntesis generando datos de secuenciación subóptimos. La presente invención mejora la tecnología existente para permitir lecturas de secuenciación más exactas.

Sumario de la invención

En algunos modos de realización, la divulgación es un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario con moléculas adaptadoras de horquilla que comprenden una región de tallo bicatenaria y una región de bucle monocatenaria; ligar cada extremo de la molécula de ácido nucleico diana a la región bicatenaria de la molécula adaptadora formando de este modo una molécula mixta circular que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y una región de bucle monocatenaria proximal y una región de bucle monocatenaria distal unida covalentemente a la región bicatenaria; poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótidos de bloqueo anclados a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa y es complementario a las regiones de bucle monocatenarias proximal y distal, capturando de este modo la molécula mixta circular en el soporte sólido y bloqueando la región de bucle monocatenaria proximal; poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a las regiones de bucle monocatenarias proximal y distal, hibridando de este modo el cebador a la región de bucle monocatenaria distal; extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario. En algunos modos de realización, los extremos del ácido nucleico diana y el adaptador son romos. En algunos modos de realización, los extremos del ácido nucleico diana y el adaptador se vuelven cohesivos por tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede ser adición nucleotídica y digestión del ácido nucleico diana y el adaptador con una endonucleasa de restricción. El oligonucleótido de bloqueo se ancla al soporte sólido por medio de medios seleccionados de un enlace covalente con la molécula de soporte o un enlace no covalente con la molécula de soporte. El enlace no covalente con la molécula de soporte puede ser una interacción específica seleccionada de biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno o hibridación del oligonucleótido de bloqueo a un oligonucleótido complementario unido covalente o no covalentemente al soporte sólido. El oligonucleótido de bloqueo no es extensible por la ácido nucleico polimerasa. El oligonucleótido de bloqueo se puede volver no extensible por la ácido nucleico polimerasa por una modificación química seleccionada de 3'-H, 2'-fosfato y 3'-fosfato. El oligonucleótido de bloqueo puede tener una modificación que evita la unión de una ácido nucleico polimerasa. El oligonucleótido de bloqueo puede no ser extensible por una ácido nucleico polimerasa en virtud de estar unido al soporte sólido por medio de su extremo 3'. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones estabilizadoras de dúplex tales como LNA, APN y nucleótidos no naturales. El oligonucleótido de bloqueo comprende una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas tales como una cadena principal de fosforotioato. Cada partícula de soporte sólido se une a múltiples oligonucleótidos bloqueadores. En algunos modos de realización, el procedimiento puede comprender además una etapa de retirar las moléculas circulares no capturadas en el soporte sólido. La secuenciación puede ser secuenciación de molécula individual, secuenciación por síntesis, secuenciación de nanoporos o secuenciación de reconocimiento de tunelización. En algunos modos de realización, la extensión del cebador es por una polimerasa que desplaza la hebra o por replicación de círculo rodante. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana bicatenario se genera *in vitro* a partir de un ácido nucleico diana monocatenario.

En algunos modos de realización, la divulgación es un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario con una mezcla de primera y segunda moléculas adaptadoras de horquilla, comprendiendo cada una una región de tallo bicatenaria y una primera región de bucle monocatenaria o una segunda región de bucle monocatenaria; ligar cada extremo de la molécula de ácido nucleico diana a la región bicatenaria de las moléculas adaptadoras formando de este modo una molécula mixta circular que comprende el

ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y la primera región de bucle monocatenaria en un extremo y la segunda región de bucle monocatenaria en el otro extremo unida covalentemente a la región bicatenaria; poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótidos de bloqueo anclados a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa y es complementario a la primera región de bucle monocatenaria, capturando de este modo la molécula circular en el soporte sólido y bloqueando la primera región de bucle monocatenaria; poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a la segunda región de bucle monocatenaria, hibridando de este modo el cebador a la segunda región de bucle monocatenaria; extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario. Los extremos del ácido nucleico diana y el adaptador pueden ser romos o volverse cohesivos por tratamiento enzimático que se puede seleccionar de adición nucleotídica y digestión del ácido nucleico diana y el adaptador con una endonucleasa de restricción. En algunos modos de realización, el oligonucleótido de bloqueo se ancla al soporte sólido por medio de medios seleccionados de un enlace covalente con la molécula de soporte o un enlace no covalente con la molécula de soporte. El enlace no covalente con la molécula de soporte puede ser una interacción específica seleccionada de biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno o hibridación del oligonucleótido de bloqueo a un oligonucleótido complementario unido covalente o no covalentemente al soporte sólido. El oligonucleótido de bloqueo puede no ser extensible por la ácido nucleico polimerasa debido, por ejemplo, a una modificación química seleccionada de 3'-H, 2'-fosfato y 3'-fosfato. El oligonucleótido de bloqueo puede tener una modificación que evita la unión de una ácido nucleico polimerasa. El oligonucleótido de bloqueo puede no ser extensible por una ácido nucleico polimerasa en virtud de estar unido al soporte sólido por medio de su extremo 3'. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones estabilizadoras de dúplex tales como, por ejemplo, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (APN) y un nucleótido no natural. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas, por ejemplo, una cadena principal de fosforotioato. En algunos modos de realización, cada partícula de soporte sólido se une a múltiples oligonucleótidos bloqueadores. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además retirar los ácidos nucleicos no capturados en el soporte sólido. En algunos modos de realización, la secuenciación es secuenciación de molécula individual, secuenciación por síntesis, secuenciación de nanoporos o secuenciación de reconocimiento de tunelización. En algunos modos de realización, la extensión del cebador es por una polimerasa que desplaza la hebra o por replicación de círculo rodante. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana bicatenario se genera *in vitro* a partir de un ácido nucleico diana monocatenario.

En algunos modos de realización, la divulgación es un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario que tiene dos extremos 5' y dos extremos 3' extensibles con una transferasa terminal, una especie nucleotídica extensible individual, y proporcionar medios para controlar la incorporación nucleotídica por la transferasa terminal, extendiendo los extremos 3' extensibles incorporando múltiples unidades del nucleótido individual formando de este modo una molécula mixta lineal que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal; poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótido de captura anclado a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de captura es complementario a las regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal capturando de este modo la molécula lineal en el soporte sólido; poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a las regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal, hibridando de este modo el cebador a la región homopolimérica monocatenaria distal; extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario. El medio para controlar la incorporación nucleotídica por la transferasa terminal es la presencia en la reacción de una especie de nucleótido terminador en una proporción que favorece al nucleótido extensible, o el momento de la reacción de incorporación. En algunos modos de realización, el oligonucleótido de captura es extensible y el procedimiento comprende además extender el oligonucleótido de captura para alcanzar el extremo del ácido nucleico diana. El procedimiento puede comprender además una etapa de ligar el oligonucleótido de captura extendido con el extremo del ácido nucleico diana para crear una hebra de ácido nucleico continua. El oligonucleótido de bloqueo se puede anclar al soporte sólido por medio de medios seleccionados de un enlace covalente con la molécula de soporte o un enlace no covalente con la molécula de soporte. El enlace no covalente con la molécula de soporte puede ser una interacción específica seleccionada de biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno o hibridación del oligonucleótido de bloqueo a un oligonucleótido complementario unido covalente o no covalentemente al soporte sólido. En algunos modos de realización, el oligonucleótido de bloqueo comprende una o más modificaciones estabilizadoras de dúplex tales como ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (APN) y un nucleótido no natural. En algunos modos de realización, el oligonucleótido de bloqueo comprende una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas, por ejemplo, una cadena principal de fosforotioato. En algunos modos de realización, cada partícula de soporte sólido se une a múltiples oligonucleótidos bloqueadores. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además una etapa de retirar los ácidos nucleicos no capturados en el soporte sólido. En algunos modos de realización, cada molécula lineal tiene dos homopolímeros diferentes creados bloqueando un extremo proximal del ácido nucleico diana mientras se extiende el extremo distal con una mezcla que comprende el primer nucleótido no terminador, desbloqueando el extremo proximal y extendiendo el extremo proximal con una mezcla que comprende el segundo nucleótido no terminador. En algunos modos de realización,

la secuenciación es secuenciación de molécula individual, secuenciación por síntesis, secuenciación de nanoporos o secuenciación de reconocimiento de tunelización. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana bicatenario se genera *in vitro* a partir de un ácido nucleico diana monocatenario.

5 En algunos modos de realización, la divulgación es una composición para determinar una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario que comprende: una molécula mixta circular que comprende el ácido nucleico diana ligado en cada extremo a una molécula adaptadora que comprende una región de tallo bicatenaria y una región de bucle monocatenaria, teniendo la molécula mixta circular una región bicatenaria y una región de bucle monocatenaria proximal y una región de bucle monocatenaria distal unida covalentemente a la región bicatenaria; un oligonucleótido de bloqueo anclado a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa y se hibrida a la región de bucle monocatenaria proximal, capturando de este modo la molécula mixta circular en el soporte sólido y bloqueando la región de bucle monocatenaria proximal; un cebador oligonucleotídico hibridado a la región de bucle monocatenaria distal; y una polimerasa de secuenciación.

15 En algunos modos de realización, la divulgación es una composición para determinar una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario que comprende: una molécula mixta lineal que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal; un oligonucleótido de captura anclado a un soporte sólido e hibridado a la región homopolimérica monocatenaria proximal, capturando de este modo la molécula lineal en el soporte sólido; un cebador oligonucleotídico hibridado a la región homopolimérica monocatenaria distal de; y una polimerasa de secuenciación.

Breve descripción de los dibujos

25 La **FIG. 1** muestra un procedimiento de la técnica anterior de preparación y secuenciación de moldes circulares. Las sondas de captura hibridadas a los adaptadores comprenden la secuencia expuesta como SEQ ID NO:7 más secuencias adicionales complementarias a las regiones de horquilla de los adaptadores.

30 La **FIG. 2** muestra un modo de realización del procedimiento de la divulgación. Las sondas de captura hibridadas a los adaptadores comprenden la secuencia expuesta como SEQ ID NO:8 más secuencias adicionales complementarias a las regiones de horquilla de los adaptadores.

35 La **FIG. 3** muestra detalles del detalle de la secuencia de nucleótidos de las estructuras diagramadas en la FIG. 2. El adaptador de horquilla A comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1. El adaptador de horquilla B comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:2. La sonda de captura se expone como SEQ ID NO:4. El cebador de secuenciación se expone como SEQ ID NO:5.

La **FIG. 4** muestra un molde lineal simétrico con homopolímeros (SEQ ID NO:9).

40 La **FIG. 5** muestra un molde lineal simétrico con carga asimétrica de la polimerasa de secuenciación. (Homopolímeros expuestos como SEQ ID NO:9.)

45 La **FIG. 6** muestra detalles del detalle de la secuencia de nucleótidos de otro modo de realización de las estructuras diagramadas en la FIG. 2. El adaptador de horquilla A comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1. El adaptador de horquilla C comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:3. La secuencia de captura unida a microesferas se expone como SEQ ID NO:10. El cebador de secuenciación se expone como SEQ ID NO:5.

50 La **FIG. 7** muestra detalles del detalle de la secuencia de nucleótidos de otro modo de realización de las estructuras diagramadas en la FIG. 2. El adaptador de horquilla A comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1. El adaptador de horquilla B comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:2. La sonda de captura/cebador de secuenciación se expone como SEQ ID NO:6.

55 Las **FIGS. 8A-8F** muestran un flujo de trabajo de ensamblaje en serie usado para preparar una colección de secuenciación para la secuenciación de acuerdo con los procedimientos de la invención. El flujo de trabajo comienza con microesferas de captura de oligo-dT (FIG. 8A). Se añaden sondas de captura (SEQ ID NO:4) a las microesferas de captura para formar complejos de sonda de captura-microesfera de captura (FIG. 8B). Los moldes de secuenciación circular que comprenden una molécula de ácido nucleico diana bicatenaria y dos adaptadores de horquilla (adaptadores de horquilla A y B, que comprenden SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente) se ponen en contacto con el complejo de sonda de captura-microesfera de captura (FIG. 8C) para formar un complejo de la microesfera de captura, sonda de captura y un molde de secuenciación circular. A continuación, se añaden un cebador de secuenciación (SEQ ID NO:5) (FIG. 8D) y una polimerasa de secuenciación (FIG. 8E). La FIG. 8F muestra un análisis de los componentes de la colección de secuenciación ensamblada cuando los componentes se añaden como se muestra en las FIGS. 8A-8E. Solo cuando se incluyeron las microesferas, la sonda de captura y la molécula de colección, se detectaron las tres en el complejo ensamblado final.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 El término "muestra" se refiere a cualquier composición que contiene o se supone que contiene ácido nucleico diana. Esto incluye una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, por ejemplo, piel, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial, orina, lágrimas, glóbulos sanguíneos, órganos y tumores, y también para muestras de cultivos *in vitro* establecidos a partir de células extraídas de un individuo, incluyendo los tejidos incluidos en parafina fijados con formol (FFPET) y ácidos nucleicos aislados de los
10 mismos. Una muestra también puede incluir material sin células, tal como una fracción sanguínea sin células que contiene ADN libre circulante (ADNlc) o ADN tumoral circulante (ADNtc).

Un término "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, tanto naturales como no naturales), incluyendo ADN, ARN y sus subcategorías, tales como ADNc, ARNm, etc. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario y, en general, contendrá enlaces fosfodiéster 5'-3', aunque en algunos casos, los análogos nucleotídicos pueden tener otros enlaces. Los ácidos nucleicos pueden incluir bases naturales (adenosina, guanosina, citosina, uracilo y timidina) así como bases no naturales. Algunos ejemplos de bases no naturales incluyen las descritas, por ejemplo, en Seela *et al.*, (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. Las bases no naturales pueden tener una función particular, por ejemplo, incrementar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico, inhibir la digestión con nucleasas o bloquear la extensión del cebador o la polimerización de hebra.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable. Polinucleótido es un ácido nucleico monocatenario o uno bicatenario. "Oligonucleótido" es un término usado a veces para describir un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede estar compuesto de al menos 6 nucleótidos o aproximadamente 15-30 nucleótidos. Los oligonucleótidos se preparan por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, por un procedimiento que implica síntesis química directa como se describe en Narang *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99; Brown *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151; Beaucage *et al.* (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862; Matteucci *et al.* (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191.

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido monocatenario que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana ("sitio de unión a cebador") y puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis a lo largo de una hebra complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para dicha síntesis.

El término "adaptador" quiere decir una secuencia de nucleótidos que se puede añadir a otra secuencia para importar propiedades adicionales a esa secuencia. Un adaptador es típicamente un oligonucleótido que puede ser mono o bicatenario, o puede tener tanto una porción monocatenaria como una porción bicatenaria.

El término "ligación" se refiere a una reacción de condensación que une dos hebras de ácido nucleico en la que un grupo 5'-fosfato de una molécula reacciona con el grupo 3'-hidroxilo de otra molécula. La ligación es típicamente una reacción enzimática catalizada por una ligasa o una topoisomerasa. La ligación puede unir dos hebras individuales para crear una molécula monocatenaria. La ligación también puede unir dos hebras que pertenecen cada una a una molécula bicatenaria uniendo por tanto dos moléculas bicatenarias. La ligación también puede unir ambas hebras de una molécula bicatenaria a ambas hebras de otra molécula bicatenaria, uniendo por tanto dos moléculas bicatenarias. La ligación también puede unir dos extremos de una hebra dentro de una molécula bicatenaria reparando por tanto una muesca en la molécula bicatenaria.

El término "código de barras" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se puede detectar e identificar. Los códigos de barras se pueden incorporar en diversos ácidos nucleicos. Los códigos de barras son suficientemente largos, por ejemplo, de 2, 5, 10 nucleótidos, de modo que en una muestra, los ácidos nucleicos que incorporan los códigos de barras se pueden distinguir o agrupar de acuerdo con los códigos de barras.

El término "identificador múltiple" o "MID" se refiere a un código de barras que identifica una fuente de un ácido nucleico diana (por ejemplo, una muestra de la que se deriva el ácido nucleico). Todos o sustancialmente todos los ácidos nucleicos diana de la misma muestra compartirán el mismo MID. Los ácidos nucleicos diana de diferentes fuentes o muestras se pueden mezclar y secuenciar simultáneamente. Usando los MID, las lecturas de secuencia se pueden asignar a muestras individuales a partir de las que se originaron los ácidos nucleicos diana.

El término "identificador molecular único" o "UID" se refiere a un código de barras que identifica un ácido nucleico al que está fijado. Todos o sustancialmente todos los ácidos nucleicos diana de la misma muestra tendrán diferentes UID. Toda o sustancialmente toda la descendencia (por ejemplo, amplicones) derivada del mismo ácido nucleico diana original compartirá el mismo UID.

El término "cebador universal" y "sitio de unión de cebado universal" o "sitio de cebado universal" se refieren a un cebador y un sitio de unión a cebador presentes en (típicamente, añadidos *in vitro* a) diferentes ácidos nucleicos diana. El sitio de cebado universal se añade a la pluralidad de ácidos nucleicos diana usando adaptadores o

usando cebadores específicos de diana (no universales) que tienen el sitio de cebado universal en la porción 5'. El cebador universal se puede unir a y dirigir la extensión del cebador desde el sitio de cebado universal.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "diana" se refieren a una porción de la secuencia de ácido nucleico en la muestra que se va a detectar o analizar. El término diana incluye todas las variantes de la secuencia diana, por ejemplo, una o más variantes mutantes y la variante natural.

10 El término "secuenciación" se refiere a cualquier procedimiento de determinación de la secuencia de nucleótidos en el ácido nucleico diana.

La presente divulgación proporciona un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende:

15 (a) poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario con moléculas adaptadoras de horquilla que comprenden una región de tallo bicatenaria y una región de bucle monocatenaria;

20 (b) ligar cada extremo de la molécula de ácido nucleico diana a la región bicatenaria de la molécula adaptadora formando de este modo una molécula mixta circular que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y una región de bucle monocatenaria proximal y una región de bucle monocatenaria distal unida covalentemente a la región bicatenaria;

25 (c) poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótidos de bloqueo anclados a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa y es complementario a la región de bucle monocatenaria proximal, capturando de este modo la molécula mixta circular en el soporte sólido y bloqueando la región de bucle monocatenaria proximal;

30 (d) poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a la región de bucle monocatenaria distal, hibridando de este modo el cebador a la región de bucle monocatenaria distal;

(e) extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario.

35 De forma alternativa, la presente divulgación proporciona un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende:

40 (a) poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario con una mezcla de primera y segunda moléculas adaptadoras de horquilla, comprendiendo cada una una región de tallo bicatenaria y una primera región de bucle monocatenaria o una segunda región de bucle monocatenaria;

45 (b) ligar cada extremo de la molécula de ácido nucleico diana a la región bicatenaria de las moléculas adaptadoras formando de este modo una molécula mixta circular que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y la primera región de bucle monocatenaria en un extremo y la segunda región de bucle monocatenaria en el otro extremo unida covalentemente a la región bicatenaria;

50 (c) poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótidos de bloqueo anclados a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa y es complementario a la primera región de bucle monocatenaria, capturando de este modo la molécula circular en el soporte sólido y bloqueando la primera región de bucle monocatenaria;

(d) poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a la segunda región de bucle monocatenaria, hibridando de este modo el cebador a la segunda región de bucle monocatenaria;

55 (e) extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario.

Después de la etapa (c), las moléculas mixtas no capturadas en el soporte sólido se pueden retirar.

60 Los extremos del ácido nucleico diana y el adaptador pueden ser romos o se pueden volver cohesivos por tratamiento enzimático. Dicho tratamiento enzimático se puede seleccionar de adición nucleotídica y digestión del ácido nucleico diana y el adaptador con una endonucleasa de restricción. El oligonucleótido de bloqueo se puede anclar al soporte sólido por medio de medios seleccionados de un enlace covalente con la molécula de soporte o un enlace no covalente con la molécula de soporte. El enlace no covalente con la molécula de soporte puede ser una interacción específica seleccionada de biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno o hibridación del oligonucleótido de bloqueo a un oligonucleótido complementario unido covalente o no covalentemente al soporte sólido. El oligonucleótido de bloqueo puede no ser extensible por la ácido nucleico polimerasa y se puede volver

- no extensible por una modificación química seleccionada de 3'-H, 2'-fosfato y 3'-fosfato. El oligonucleótido de bloqueo puede tener una modificación que evita la unión de una ácido nucleico polimerasa. El oligonucleótido de bloqueo puede no ser extensible por una ácido nucleico polimerasa en virtud de estar unido al soporte sólido por medio de su extremo 3'. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones estabilizadoras de dúplex, que se pueden seleccionar de ácido nucleico enlazado (LNA), ácido peptidonucleico (APN) y un nucleótido no natural. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas, por ejemplo, una cadena principal de fosforotioato. El soporte sólido puede estar compuesto de partículas y cada partícula se puede unir a múltiples oligonucleótidos bloqueadores.
- 5
- 10 La secuenciación puede ser secuenciación de molécula individual, secuenciación por síntesis, secuenciación de nanoporos o secuenciación de reconocimiento de tunelización. La extensión del cebador se puede realizar por una polimerasa que desplaza la hebra y/o por replicación de círculo rodante. Dicho ácido nucleico diana bicatenario se puede generar *in vitro* a partir de un ácido nucleico diana monocatenario.
- 15 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende:
- (a) poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario que tiene dos extremos 5' y dos extremos 3' extensibles con una transferasa terminal y una especie nucleotídica extensible individual, y proporcionar medios para controlar la incorporación nucleotídica por la transferasa terminal;
- 20
- (b) extender los extremos 3' extensibles incorporando múltiples unidades del nucleótido individual formando de este modo una molécula mixta lineal que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria, una región homopolimérica monocatenaria proximal y una región homopolimérica monocatenaria distal;
- 25
- (c) poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótido de captura anclado a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de captura es complementario a las regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal capturando de este modo la molécula lineal en el soporte sólido;
- 30
- (d) poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a las regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal, hibridando de este modo el cebador a la región homopolimérica monocatenaria distal;
- 35
- (e) extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario.
- Después de la etapa c), los ácidos nucleicos no capturados en el soporte sólido se pueden retirar.
- 40 El medio para controlar la incorporación nucleotídica por la transferasa terminal puede ser la presencia en la reacción de una especie de nucleótido terminador en una proporción que favorece al nucleótido extensible o el momento de la reacción de incorporación.
- Si el oligonucleótido de captura es extensible, el procedimiento puede comprender además, después de la etapa (c), extender el oligonucleótido de captura para alcanzar el extremo del ácido nucleico diana. A continuación, el procedimiento puede comprender además una etapa de ligar el oligonucleótido de captura extendido con el extremo del ácido nucleico diana para crear una hebra de ácido nucleico continua.
- 45
- El oligonucleótido de bloqueo se puede anclar al soporte sólido por medio de medios seleccionados de un enlace covalente con la molécula de soporte o un enlace no covalente con la molécula de soporte. Dicho enlace no covalente con la molécula de soporte puede ser una interacción específica seleccionada de biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno o hibridación del oligonucleótido de bloqueo a un oligonucleótido complementario unido covalente o no covalentemente al soporte sólido. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones estabilizadoras de dúplex tales como ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (APN) o un nucleótido no natural. El oligonucleótido de bloqueo puede comprender una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas tales como una cadena principal de fosforotioato. El soporte sólido puede estar compuesto de partículas y cada partícula se puede unir a múltiples oligonucleótidos bloqueadores.
- 50
- 55 Cada molécula lineal puede tener dos homopolímeros diferentes creados bloqueando un extremo proximal del ácido nucleico diana mientras se extiende el extremo distal con una mezcla que comprende el primer nucleótido no terminador, desbloqueando el extremo proximal y extendiendo el extremo proximal con una mezcla que comprende el segundo nucleótido no terminador.
- 60
- La secuenciación puede ser secuenciación de molécula individual, secuenciación por síntesis, secuenciación de nanoporos o secuenciación de reconocimiento de tunelización. El ácido nucleico diana bicatenario se puede generar *in vitro* a partir de un ácido nucleico diana monocatenario.
- 65

En algunos modos de realización, la presente divulgación es un procedimiento que convierte un ácido nucleico diana bicatenario en una estructura de molde de hebra bloqueada circular útil en la secuenciación. El uso de moldes circulares es conocido en la técnica y tiene varias ventajas en las aplicaciones de secuenciación por síntesis. Véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 7.302.146 y 8.153.375 y la FIG. 1. Si se usa una polimerasa que desplaza la hebra, participará en la replicación de círculo rodante, es decir, desplazará continuamente la hebra naciente y realizará múltiples rondas de copiado del molde circular. La capacidad para secuenciar (leer) la diana múltiples veces y comparar ambas hebras de Watson y Crick del ácido nucleico diana unidas en la estructura circular permite generar secuencias consenso sin errores o con pocos errores.

Sin embargo, los moldes circulares existentes se diseñan para tener un adaptador ligado a ambos extremos del ácido nucleico diana. (FIG. 1). Cada adaptador tiene un sitio de unión para el cebador de secuenciación que permite la unión de dos cebadores de secuenciación y dos polimerasas de secuenciación para cada molde circular. Una vez que ha comenzado la reacción de secuenciación, las dos polimerasas tienen el potencial de interferir entre sí y provocar un estancamiento o terminación de la síntesis, disminuyendo la longitud de lectura y el rendimiento de los datos de secuenciación. Esto es especialmente problemático con moldes más cortos. En algunas aplicaciones, tales como secuenciación de molécula individual por síntesis, la presencia de dos polimerasas por punto de detección (por ejemplo, un nanoporo o una guía de ondas molecular cero (ZMW)) reducirá la calidad de los datos de secuenciación.

La presente invención mejora la tecnología existente asegurando que solo se une una sola polimerasa de secuenciación a cada molde de secuenciación y que la síntesis procede en una sola dirección. (FIG. 2). La presente invención es un procedimiento novedoso que puede incrementar la calidad, longitud de lectura y eficacia de la secuenciación. En los modos de realización de la invención, el ácido nucleico diana bicatenario se conjuga a dos adaptadores, uno en cada extremo de la molécula. Cada secuencia adaptadora tiene un sitio de unión a cebador (por ejemplo, un sitio de unión a cebador universal) donde se va a iniciar la secuenciación. La molécula mixta resultante se captura en un extremo mientras que el segundo extremo permanece disponible para la polimerasa de secuenciación. (FIG. 2).

La divulgación es un procedimiento para crear un molde para secuenciar un ácido nucleico diana o una colección de ácidos nucleicos diana. En algunos modos de realización, en la primera etapa, el ácido nucleico diana se pone en contacto con moléculas adaptadoras tallo-bucle que comprenden una región de tallo bicatenaria y una región de bucle monocatenaria. Cada extremo del ácido nucleico diana se liga al adaptador formando de este modo una molécula mixta. Si el adaptador tiene una estructura tallo-bucle, la molécula mixta resultante tiene una región bicatenaria (que comprende el ácido nucleico diana) y una región de bucle monocatenaria proximal y una región de bucle monocatenaria distal unida covalentemente a la región bicatenaria. La molécula mixta es una molécula circular topológicamente cerrada compuesta de una hebra continua individual. En algunos modos de realización, los adaptadores no ligados y los ácidos nucleicos diana no ligados se retiran de la muestra antes del procesamiento adicional.

En algunos modos de realización, todas las moléculas adaptadoras son iguales. En otros modos de realización, está presente una mezcla de dos moléculas adaptadoras. En el caso de una mezcla igual de dos adaptadores (por ejemplo, A y B), un 50 % de las moléculas mixtas tendrán la estructura de adaptador asimétrica deseada (por ejemplo, A-B).

A continuación, la molécula mixta se pone en contacto con una concentración limitante de oligonucleótidos de bloqueo anclados a un soporte sólido. Los oligonucleótidos de bloqueo también se pueden denominar "oligonucleótidos de captura" porque se pueden usar para capturar la molécula mixta, por ejemplo, en solución o en el soporte sólido. La captura puede comprender formar simplemente un complejo de hibridación con el oligonucleótido de captura o la captura puede comprender capturar en un soporte sólido al que se pueden anclar los oligonucleótidos de captura. Se usa una concentración limitante del oligonucleótido de bloqueo para garantizar que solo uno de los dos extremos de adaptador se captura o bloquea mientras el otro extremo de adaptador permanece accesible para otras etapas enzimáticas. En los modos de realización donde cada molécula mixta tiene dos adaptadores diferentes, el oligonucleótido de captura es complementario solo a uno y no al otro adaptador garantizando que solo se captura uno de los extremos de adaptador. En modos de realización donde cada molécula mixta tiene el mismo adaptador en ambos extremos, el oligonucleótido de bloqueo es complementario al adaptador. El uso de concentración limitante de los oligonucleótidos de bloqueo garantiza que solo uno de los extremos de adaptador se captura y el otro permanece accesible. Por conveniencia, en esta divulgación, el extremo de adaptador capturado se designa como proximal y el extremo de adaptador libre se designa como distal.

Como será evidente a partir de las siguientes etapas descritas a continuación, el oligonucleótido de captura de bloqueo debe ser no extensible por una ácido nucleico polimerasa en su extremo 3'. El oligonucleótido de captura es al menos parcialmente complementario al extremo de adaptador proximal y se hibrida a la porción monocatenaria del extremo de adaptador bloqueando de este modo el extremo de adaptador. Debido a que el extremo 3' del oligonucleótido de bloqueo no es extensible, puede que no sirva como inicio de polimerización de

hebra en presencia de una ácido nucleico polimerasa. Opcionalmente, las moléculas mixtas no capturadas se pueden retirar antes de las siguientes etapas.

5 A continuación, la muestra se pone en contacto con un cebador oligonucleotídico complementario al sitio de unión a cebador en la región monocatenaria del adaptador. Debido a que el extremo proximal está bloqueado, solo el extremo distal está disponible para la unión de cebador e hibridación. El cebador se puede extender con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario. La secuenciación es secuenciación por síntesis, incluyendo secuenciación de molécula individual o cualquier
10 secuenciación de ácidos nucleicos o derivados de ácido nucleico. La tecnología de secuenciación puede incluir el sistema PacBio® RS, un sistema de secuenciación de nanoporos o sistema de secuenciación de reconocimiento de tunelización o cualquier sistema de secuenciación donde la lectura continua de un molde es posible y deseada.

15 En algunos modos de realización, la extensión de cebador se realiza por una polimerasa de desplazamiento de hebra. En algunos modos de realización, la extensión del cebador se produce por medio de replicación de círculo rodante permitiendo que se lea cada molde múltiples veces por una sola polimerasa.

20 En algunos modos de realización del procedimiento, el adaptador que flanquea los extremos del ácido nucleico diana es una región homopolimérica monocatenaria. En lugar de ligar adaptadores a los extremos del ácido nucleico diana como se describe en los modos de realización anteriores, los extremos 3' extensibles del ácido nucleico diana se extienden poniendo en contacto la muestra con una enzima adecuada y una especie nucleotídica extensible individual. La enzima adecuada es una ADN polimerasa independiente del molde, tal como, por ejemplo, la desoxinucleótido transferasa terminal (TdT). La adición secuencial de una especie de nucleótido genera las regiones homopoliméricas en ambos lados del ácido nucleico diana. En algunos modos de
25 realización, el procedimiento incluye medios para controlar el tamaño de la región homopolimérica. El control se puede lograr por la presencia en la reacción de una especie de nucleótido terminador en una proporción que favorece al nucleótido extensible, o el momento de la reacción de incorporación. Una enzima adecuada puede ser una transferasa terminal.

30 En este modo de realización, la molécula mixta es una molécula lineal que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y una región homopolimérica monocatenaria proximal y una distal. En este modo de realización, el oligonucleótido de captura puede ser complementario a las regiones homopoliméricas y puede capturar las regiones homopoliméricas monocatenarias capturando de este modo la molécula mixta lineal en un soporte sólido. La región homopolimérica capturada en el soporte sólido se denomina región proximal y la
35 región libre es una región distal. Como en otros modos de realización de la divulgación, el cebador de secuenciación se puede unir e hibridar a la región homopolimérica distal libre e iniciar la extensión del cebador. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además una etapa de retirar los ácidos nucleicos no capturados en el soporte sólido.

40 En algunos modos de realización, cada molécula lineal tiene dos homopolímeros diferentes creados bloqueando secuencialmente un extremo del ácido nucleico diana mientras se extiende el otro extremo con un nucleótido diferente. En dichos modos de realización, el oligonucleótido de captura y el cebador son complementarios a los homopolímeros en el lado opuesto de la molécula mixta.

45 La presente divulgación comprende detectar un ácido nucleico diana en una muestra.

50 En algunos modos de realización, la muestra se deriva de un sujeto o un paciente. En algunos modos de realización, la muestra puede comprender un fragmento de un tejido sólido o un tumor sólido derivado del sujeto o del paciente, por ejemplo, por biopsia. La muestra también puede comprender líquidos corporales (por ejemplo, orina, esputo, suero, plasma o linfa, saliva, esputo, sudor, lágrima, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido quístico, bilis, líquido gástrico, líquido intestinal y/o muestras fecales). La muestra puede comprender sangre completa o fracciones sanguíneas donde pueden estar presentes células tumorales. En algunos modos de realización, la muestra, especialmente una muestra líquida, puede comprender material sin células, tal como ADN o ARN sin células incluyendo ADN
55 tumoral o ARN tumoral sin células. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra sin células, por ejemplo, muestra derivada de sangre sin células donde está presente ADN tumoral o ARN tumoral sin células. En otros modos de realización, la muestra es una muestra cultivada, por ejemplo, un cultivo o sobrenadante de cultivo que contiene o se sospecha que contiene un agente infeccioso o ácidos nucleicos derivados del agente infeccioso. En algunos modos de realización, el agente infeccioso es una bacteria, un protozoo, un virus o un micoplasma.
60

65 Un ácido nucleico diana es el ácido nucleico de interés que puede estar presente en la muestra. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana es un gen o un fragmento génico. En otros modos de realización, el ácido nucleico diana contiene una variante genética, por ejemplo, un polimorfismo, incluyendo un polimorfismo o variante mononucleotídica (SNP o SNV), o un reordenamiento genético que da como resultado, por ejemplo, una fusión génica. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana comprende un biomarcador. En otros

modos de realización, el ácido nucleico diana es característico de un organismo particular, por ejemplo, ayuda en la identificación del organismo patógeno o una característica del organismo patógeno, por ejemplo, sensibilidad a fármacos o resistencia a fármacos. Aún en otros modos de realización, el ácido nucleico diana es característico de un sujeto humano, por ejemplo, la secuencia de HLA o KIR que define el genotipo de HLA o KIR único del sujeto. Aún en otros modos de realización, todas las secuencias en la muestra son ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en secuenciación genómica indiscriminada.

En un modo de realización de la divulgación, un ácido nucleico diana bicatenario se convierte en la configuración de molde de la divulgación. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana se produce en la naturaleza en una forma monocatenaria (por ejemplo, ARN, incluyendo ARNm, microARN, ARN vírico; o ADN vírico monocatenario). El ácido nucleico diana monocatenario se convierte en la forma bicatenaria para permitir las otras etapas del procedimiento reivindicado. Los ácidos nucleicos diana más largos se pueden fragmentar, aunque en algunas aplicaciones, se pueden desear ácidos nucleicos diana más largos para lograr una lectura más larga. En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana se fragmenta de forma natural, por ejemplo, ADN libre circulante (ADNlc) o ADN degradado químicamente tal como el que se encuentra en muestras conservadas.

En algunos modos de realización de la presente divulgación, las moléculas adaptadoras se ligan al ácido nucleico diana. La ligación puede ser una ligación en extremo romo o una ligación en extremo cohesivo más eficaz. El ácido nucleico diana o los adaptadores se pueden volver de extremos romos por relleno de hebra, es decir, extendiéndose un extremo 3' por una ADN polimerasa para eliminar una protuberancia en 5'. En algunos modos de realización, los adaptadores de extremos romos y el ácido nucleico diana se pueden volver cohesivos por adición de un nucleótido individual al extremo 3' del adaptador y un nucleótido complementario individual a los extremos 3' del ácido nucleico diana, por ejemplo, por una ADN polimerasa o una transferasa terminal. Aún en otros modos de realización, los adaptadores y el ácido nucleico diana pueden adquirir extremos cohesivos (protuberancias) por digestión con endonucleasas de restricción. La última opción es más ventajosa para secuencias diana conocidas que son conocidas por contener el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. En cada uno de los modos de realización anteriores, la molécula adaptadora puede adquirir los extremos deseados (romos, extensión de base individual o protuberancia de múltiples bases) por el diseño de los oligonucleótidos adaptadores sintéticos descritos además a continuación. En algunos modos de realización, se pueden requerir otras etapas enzimáticas para lograr la ligación. En algunos modos de realización, se puede usar una polinucleótido cinasa para añadir 5'-fosfatos a las moléculas de ácido nucleico diana y moléculas adaptadoras.

La presente divulgación comprende el uso de moléculas adaptadoras que se van a ligar a uno o ambos extremos del ácido nucleico diana. En algunos modos de realización, el adaptador es una hebra individual de ácido nucleico que adopta una estructura secundaria tallo-bucle que comprende al menos una región bicatenaria y al menos una monocatenaria. La región bicatenaria comprende una región de autocomplementariedad al menos parcial que garantiza la estabilidad de la estructura secundaria en las condiciones de reacción empleadas en el presente documento. En algunos modos de realización, las moléculas adaptadoras son secuencias artificiales sintetizadas *in vitro*. En otros modos de realización, las moléculas adaptadoras son secuencias naturales sintetizadas *in vitro* conocidas por poseer la estructura secundaria deseada. Aún en otros modos de realización, las moléculas adaptadoras son moléculas naturales aisladas o moléculas no naturales aisladas.

En algunos modos de realización, el adaptador comprende al menos una región bicatenaria y al menos una región monocatenaria. En algunos modos de realización, el adaptador forma una estructura secundaria tallo-bucle con al menos un tallo bicatenario y al menos un bucle monocatenario. En algunos modos de realización, el tallo bicatenario se usa para la ligación al ácido nucleico diana bicatenario. En otros modos de realización, la porción monocatenaria del adaptador se liga a la porción monocatenaria del ácido nucleico diana. En algunos modos de realización, la ligación de ácidos nucleicos monocatenarios se realiza usando oligonucleótidos puente, véase, por ejemplo, la pub. de solicitud de EE. UU. n.º 20120003657. En otros modos de realización, la ligación de ácidos nucleicos monocatenarios o ácidos nucleicos parcialmente monocatenarios se realiza usando regiones monocatenarias en los extremos 5' y 3' (protuberancias), véase, por ejemplo, la pub. de solicitud de EE. UU. n.º 20140193860.

En algunos modos de realización, el adaptador comprende uno o más códigos de barras: un ID de muestra múltiple (MID), un ID único (UID) o una combinación de un UID y un MID. En algunos modos de realización, se usa un código de barras individual como ambos UID y MID.

En algunos modos de realización, el adaptador comprende un sitio de unión a cebador para un cebador universal, por ejemplo, un cebador de secuenciación universal. En algunos modos de realización, el adaptador comprende un sitio de unión para un oligonucleótido de captura. En algunos modos de realización, el adaptador usado en el procedimiento de la divulgación es una mezcla de adaptadores que comprenden un sitio de unión para un cebador y adaptadores que comprenden un sitio de unión para un oligonucleótido de captura.

En algunos modos de realización, la presente divulgación comprende el uso de un oligonucleótido de captura. En

- algunos modos de realización, el oligonucleótido de captura se une directamente a un soporte sólido. En este modo de realización, el oligonucleótido de captura comprende un resto de unión en un extremo y un extremo libre en el otro extremo. El oligonucleótido de captura se ancla a un soporte sólido (por ejemplo, esfera, microesfera) por medio del resto de unión. En algunos modos de realización, el extremo anclado del oligonucleótido comprende biotina y el soporte sólido está recubierto con estreptavidina. En otros modos de realización, el extremo anclado del oligonucleótido comprende una molécula de captura y el soporte sólido comprende un anticuerpo específico para la molécula de captura. Por ejemplo, se pueden usar digoxigenina y anticuerpo anti-digoxigenina.
- En algún modo de realización, el oligonucleótido de captura no se une al soporte sólido directamente sino que se hibrida a otro oligonucleótido ("oligonucleótido de microesfera") directamente unido al soporte sólido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. El oligonucleótido de captura y el oligonucleótido de microesfera comparten al menos una región de complementariedad. Por ejemplo, el oligonucleótido de microesfera puede comprender un homopolímero de dT (oligo-dT) mientras que una porción del oligonucleótido de captura es un homopolímero de dA (oligo-dA). (FIGS. 3, 6 y 7).
- En algunos modos de realización, el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa en el extremo 3'. El extremo 3' se puede volver no extensible por una modificación química. Por ejemplo, 3'-H, 2'-fosfato y 3'-fosfato son dichas modificaciones. El oligonucleótido de bloqueo puede tener una modificación que evita la unión de un ácido nucleico polimerasa, por ejemplo, un aducto voluminoso que bloquea estéricamente el extremo 3'. El oligonucleótido de bloqueo se puede volver no extensible en virtud de estar unido al soporte sólido por medio de su extremo 3'. El oligonucleótido de bloqueo también puede comprender una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas tales como una cadena principal de fosforotioato.
- En algunos modos de realización, el oligonucleótido comprende un extremo 5' libre y tiene un extremo 3' anclado al soporte sólido. En otros modos de realización, el oligonucleótido comprende un extremo 3' libre y tiene un extremo 5' anclado al soporte sólido. Al menos una porción del extremo 5' o extremo 3' libre es complementaria a una secuencia en el adaptador. En algunos modos de realización, el extremo libre es complementario a la porción monocatenaria del adaptador, por ejemplo, a la estructura de bucle. Por medio de esta porción complementaria, el oligonucleótido de captura anclado al soporte sólido se hibrida a una molécula mixta que comprende un ácido nucleico diana ligado a al menos un adaptador. El oligonucleótido de captura puede comprender una o más modificaciones que estabilizan dicho híbrido. En algunos modos de realización, las modificaciones se seleccionan de ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos peptidonucleicos (APN), nucleótidos no naturales tales como 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.990.303.
- En algunos modos de realización, el procedimiento implica la creación de una molécula mixta. La molécula de unión comprende un ácido nucleico diana bicatenario ligado a una o más moléculas adaptadoras. En algunos modos de realización, la molécula mixta es una hebra individual topológicamente circular (cerrada) que comprende una región bicatenaria (que comprende el ácido nucleico diana) flanqueada en cada extremo por una región monocatenaria de bucle cerrado (que comprende las secuencias adaptadoras).
- En algunos modos de realización, la molécula mixta tiene extremos idénticos, es decir, se liga a dos adaptadores idénticos. En otros modos de realización, la molécula mixta comprende diferentes extremos, cada uno ligado a una molécula adaptadora diferente. En algunos modos de realización, la molécula adaptadora es una mezcla de dos tipos de adaptadores (por ejemplo, A y B). A continuación la muestra comprende una mezcla de moléculas mixtas con adaptadores AA, AB y BB en una determinada proporción. En algunos modos de realización, se usa una proporción igual de A y B. Un 50 % de las moléculas mixtas resultantes tendrán la estructura deseada A-B. Un 25 % será A-A, es decir, sin sitio de unión para el cebador de secuenciación, y un 25 % será B-B, dos sitios para el cebador de secuenciación como se usó en la técnica anterior. En dicho caso, la presente invención ofrecerá una mejora sobre la técnica anterior ya que 2/3 de las moléculas mixtas (A-B) se procesarán de acuerdo con el procedimiento mejorado para generar lecturas mejoradas.
- En algunos modos de realización, la molécula mixta es una molécula lineal que comprende una región bicatenaria que comprende el ácido nucleico diana flanqueado en cada extremo por una secuencia adaptadora o similar. En algunos modos de realización, el adaptador es una molécula bicatenaria lineal. En otros modos de realización, el adaptador puede ser una molécula monocatenaria lineal. Aún en otros modos de realización, la región bicatenaria que comprende el ácido nucleico diana se flanquea por uno o dos homopolímeros.
- En algunos modos de realización, la divulgación utiliza enzimas. Las enzimas incluyen una ADN polimerasa (incluyendo polimerasa de secuenciación), una ADN ligasa y una transferasa terminal.
- En algunos modos de realización, la ADN polimerasa posee actividad de desplazamiento de hebra y no tiene actividad 5'-3'-exonucleasa. En algunos modos de realización, se usan la polimerasa Phi29 y sus derivados,

véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.001.050, 5576204, 7858747 y 8921086.

En algunos modos de realización, la invención también utiliza una ADN ligasa. En algunos modos de realización, se usa ADN ligasa T4 o ADN ligasa de *E. coli*.

5

En algunos modos de realización, la divulgación también utiliza una ADN polimerasa independiente de molde, por ejemplo, una transferasa terminal. En algunos modos de realización, la divulgación usa una transferasa terminal de mamífero.

10

En algunos modos de realización, la divulgación se refiere a una composición para determinar una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario que comprende una molécula mixta circular que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y una región de bucle monocatenaria proximal y una región de bucle monocatenaria distal unida covalentemente a la región bicatenaria, estando hibridada la región proximal a un oligonucleótido de bloqueo que no es extensible por una ácido nucleico polimerasa. El oligonucleótido de bloqueo se puede anclar a un soporte sólido. En algunos modos de realización, la composición comprende además un cebador oligonucleotídico complementario a regiones de bucle monocatenarias proximal y distal y opcionalmente, una ácido nucleico polimerasa.

15

20

En algunos modos de realización, la divulgación se refiere a una composición para determinar una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario que comprende una molécula mixta lineal que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y regiones homopoliméricas monocatenarias proximal y distal, en el que la región homopolimérica proximal se hibrida a un oligonucleótido de bloqueo que no es extensible por una ácido nucleico polimerasa. El oligonucleótido de bloqueo se puede anclar a un soporte sólido. En algunos modos de realización, la composición comprende además un cebador oligonucleotídico complementario a regiones de bucle monocatenarias proximal y distal y opcionalmente, una ácido nucleico polimerasa.

25

Ejemplos

30

Ejemplo 1 (hipotético) Preparación de moléculas mixtas circulares simétricamente adaptadas para secuenciación con carga asimétrica de la polimerasa de secuenciación

35

En este experimento, se obtiene el ADN diana bicatenario. El ADN se fragmenta a un tamaño adecuado *in vitro* o se fragmenta de forma natural. Un adaptador es una molécula de horquilla que tiene una porción bicatenaria y una porción de bucle. Se liga un adaptador idéntico a cada extremo del ADN diana para crear una molécula mixta como se describe en la Pacific Biosciences® Template Preparation and Sequencing Guide (2012) Pacific Biosciences of California, Inc. y la patente de EE. UU. 8.153.375. Véase la FIG. 2A. El oligonucleótido de captura es complementario a la porción monocatenaria de la molécula adaptadora (FIG. 2B). El oligonucleótido de captura también comprende una porción de poli-dA complementaria a un oligonucleótido de poli-dT unido a microesferas magnéticas recubiertas de poliestireno (DynaBeads®, ThermoFisher, Waltham, MA) (véase la FIG. 2A). El oligonucleótido de captura tiene varias bases de LNA estabilizando el complejo con el adaptador (véanse las FIG. 2A y FIG. 2B). En consecuencia, el otro adaptador está disponible para la carga de polimerasa y la iniciación de la secuenciación. Un cebador de secuenciación es complementario a la porción monocatenaria del adaptador y una polimerasa de secuenciación puede extender el cebador realizando de este modo una reacción de secuenciación. Los componentes se añaden en el orden mostrado en la FIG. 2.

40

45

El exceso de moléculas mixtas en comparación con la concentración de oligonucleótidos de captura unidos a microesferas (proporción colección:microesfera alta) garantiza una cantidad suficiente de moléculas mixtas capturadas en un solo extremo y que tienen un extremo disponible para secuenciación.

50

La secuenciación procede como se pretende por el fabricante del instrumento.

Ejemplo 2 (hipotético) Preparación de moléculas mixtas circulares asimétricamente adaptadas para secuenciación

55

En este experimento, se obtiene el ADN diana bicatenario. El ADN se fragmenta a un tamaño adecuado *in vitro* o se fragmenta de forma natural. Un adaptador es una molécula de horquilla que tiene una porción bicatenaria y una porción de bucle. Se añade una mezcla de cantidades iguales de dos adaptadores. Los adaptadores difieren al menos en la secuencia de bucle. Los adaptadores se ligan a cada extremo del ADN diana para crear una molécula mixta como se describe en la Pacific Biosciences® Template Preparation and Sequencing Guide (2012) Pacific Biosciences of California, Inc. y la patente de EE. UU. 8153375. Véase la FIG. 2A. El oligonucleótido de captura es complementario a la porción monocatenaria de la molécula adaptadora (FIG. 2B). El oligonucleótido de captura también comprende una porción de poli-dA complementaria a un oligonucleótido de poli-dT unido a microesferas magnéticas recubiertas de poliestireno (DynaBeads®, ThermoFisher, Waltham, MA) (véase la FIG. 2A). El oligonucleótido de captura tiene varias bases de LNA estabilizando el complejo con el adaptador (véanse las FIG. 2A y FIG. 2B). En consecuencia, el otro adaptador está disponible para la carga de polimerasa y la iniciación de la secuenciación. Un cebador de secuenciación es complementario a la porción monocatenaria del

60

65

adaptador y una polimerasa de secuenciación puede extender el cebador realizando de este modo una reacción de secuenciación. Los componentes se añaden en el orden mostrado en la FIG. 2. La secuenciación procede como se pretende por el fabricante del instrumento.

5 **Ejemplo 3 (hipotético) Preparación de moléculas mixtas lineales asimétricamente adaptadas para secuenciación**

10 En este experimento, se obtiene el ADN diana bicatenario. El ADN se fragmenta a un tamaño adecuado *in vitro* o se fragmenta de forma natural. Cada uno de los extremos 3' del ADN diana se extiende con la transferasa terminal y un solo nucleótido (por ejemplo, dATP) mezclado con pequeñas cantidades de un didesoxinucleótido (por ejemplo, ddCTP). El ADN diana tiene un homopolímero en cada extremo. (FIGS. 4, 5.) El oligonucleótido de captura se une directamente a un soporte sólido y es complementario al homopolímero (por ejemplo, tiene oligo-dT) (FIGS. 4, 5). El soporte sólido comprende microesferas magnéticas recubiertas de poliestireno (DynaBeads®, ThermoFisher, Waltham, MA) El homopolímero está disponible para la carga de polimerasa y la iniciación de secuenciación.

15 Para evitar que dos polimerasas se carguen en el mismo molde (FIG. 4), el extremo 3' del oligonucleótido de captura se extiende con dTTP y una ADN polimerasa para que no esté disponible para el cebador de secuenciación. El oligonucleótido de captura se extiende con una mezcla de dTTP y ddTTP para que ya no sea extensible el producto de extensión. De forma alternativa, el oligonucleótido de captura se extiende con dTTP y se une con el extremo 5' de la diana por medio de ligación.

20 **Ejemplo 4: Ensamblaje de flujo de trabajo para moléculas mixtas lineales asimétricamente adaptadas para secuenciación**

25 En este experimento, mostrado en las FIGS. 8A-8F, se usó el flujo de trabajo de ensamblaje en serie para preparar una colección de secuenciación para la secuenciación de acuerdo con los procedimientos de la invención. El flujo de trabajo comenzó con microesferas de captura de oligo-dT como se describe anteriormente (FIG. 8A). Se añadieron sondas de captura (SEQ ID NO:4) a las microesferas de captura para formar complejos de sonda de captura-microesfera de captura (FIG. 8B). Los moldes de secuenciación circular que comprenden una molécula de ácido nucleico diana bicatenaria y dos adaptadores de horquilla (adaptadores de horquilla A y B, que comprenden SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente) se pusieron en contacto con el complejo de sonda de captura-microesfera de captura (FIG. 8C) para formar un complejo de la microesfera de captura, sonda de captura y un molde de secuenciación circular. A continuación, se añadieron un cebador de secuenciación (SEQ ID NO:5) (FIG. 8D) y una polimerasa de secuenciación (FIG. 8E). La FIG. 8F muestra los resultados del análisis de los componentes de la colección de secuenciación ensamblada cuando los componentes se añaden como se muestra en las FIGS. 8A-8E. Solo cuando se incluyeron las microesferas, la sonda de captura y la molécula de colección, se detectaron las tres en el complejo ensamblado final.

40 Solo uno de los dos homopolímeros está ahora disponible para la carga de polimerasa y la iniciación de secuenciación. Un cebador de secuenciación es complementario al homopolímero (por ejemplo, tiene oligo-dT) y una polimerasa de secuenciación puede extender el cebador realizando de este modo una reacción de secuenciación. Los componentes se añaden en el orden mostrado en la FIG. 2. La secuenciación procede como se pretende por el fabricante del instrumento.

45

Listado de secuencias

- <110> Roche Sequencing Solutions, Inc.
- 5 <120> MOLDES ASIMÉTRICOS Y PROCEDIMIENTO ASIMÉTRICO DE SECUENCIACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO
- <130> P33719-WO
- 10 <150> 62/363.653
- <151> 18/07/2016
- <160> 10
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 45
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> adaptador de horquilla A
- 25 <400> 1
- atctctctcc tcgccgctgt tttgtctcc tctttgaga gagat 45
- <210> 2
- <211> 45
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> adaptador de horquilla B
- 35 <400> 2
- atctctctct tttctctctc ctccggtgtt gttgttgaga gagat 45
- <210> 3
- <211> 45
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> adaptador de horquilla C
- <400> 3
- atctctctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaga
gagat 45
- 50 <210> 4
- <211> 40
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> sonda de captura
- <220>
- <221> misc_feature
- 60 <222> (1)..(1)
- <223> alanina modificada con LNA
- <220>
- <221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> alanina modificada con LNA

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> alanina modificada con LNA

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> alanina modificada con LNA

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> alanina modificada con LNA

 <400> 4
 nacggnggng gnggnaaatt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 20 40

 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de secuenciación

 30 <400> 5
 gagacaaaaa cagcggcga 19

 <210> 6
 <211> 35
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda de captura / cebador de secuenciación
 40
 <400> 6
 aaaaaaaaaa aaaaaaatt aacggaggag gagga 35

 <210> 7
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> secuencia de sonda de captura parcial

 <400> 7
 aaaaaaaaaa aaaaaaatt 20

 55 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> secuencia de sonda de captura parcial

 <400> 8

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaatt 30

5 <210> 9
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> homopolímero poli-A

<400> 9
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 31

15 <210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de captura de poli-T

<400> 10
tttttttt tttttttt ttttt 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de una secuencia de un ácido nucleico diana bicatenario en una muestra, que comprende:
- 5 a) poner en contacto la muestra que comprende el ácido nucleico diana bicatenario con una mezcla de primera y segunda moléculas adaptadoras de horquilla, comprendiendo cada una una región de tallo bicatenaria y una primera región de bucle monocatenaria o una segunda región de bucle monocatenaria;
- 10 b) ligar cada extremo de la molécula de ácido nucleico diana a la región bicatenaria de las moléculas adaptadoras formando de este modo una molécula mixta circular que comprende el ácido nucleico diana y que tiene una región bicatenaria y la primera región de bucle monocatenaria en un extremo y la segunda región de bucle monocatenaria en el otro extremo unida covalentemente a la región bicatenaria;
- 15 c) poner en contacto la muestra con una concentración limitante de oligonucleótidos de bloqueo anclados a un soporte sólido en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa y es complementario a la primera región de bucle monocatenaria, capturando de este modo la molécula circular en el soporte sólido y bloqueando la primera región de bucle monocatenaria;
- 20 d) poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico complementario a la segunda región de bucle monocatenaria, hibridando de este modo el cebador a la segunda región de bucle monocatenaria;
- e) extender el cebador con una polimerasa de secuenciación determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico diana bicatenario.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los extremos del ácido nucleico diana y el adaptador se vuelven cohesivos por tratamiento enzimático.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el tratamiento enzimático se selecciona de adición nucleotídica y digestión del ácido nucleico diana y el adaptador con una endonucleasa de restricción.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de bloqueo se ancla al soporte sólido por medio de una interacción específica seleccionada de biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno o hibridación del oligonucleótido de bloqueo a un oligonucleótido complementario unido covalente o no covalentemente al soporte sólido.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por la ácido nucleico polimerasa debido a una modificación química seleccionada de 3'-H, 2'-fosfato y 3'-fosfato.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de bloqueo tiene una modificación que evita la unión de una ácido nucleico polimerasa.
- 45 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de bloqueo no es extensible por una ácido nucleico polimerasa en virtud de estar unido al soporte sólido por medio de su extremo 3'.
- 50 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de bloqueo comprende una o más modificaciones estabilizadoras de dúplex, que se seleccionan preferentemente de ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (APN) y un nucleótido no natural.
- 55 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de bloqueo comprende una o más modificaciones que bloquean la digestión con nucleasas, preferentemente una cadena principal de fosfortioato.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido está compuesto de partículas y cada partícula se une a múltiples oligonucleótidos bloqueadores.
- 60 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la extensión del cebador es por una polimerasa que desplaza la hebra.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la extensión del cebador es por replicación de círculo rodante.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana bicatenario se genera *in vitro* a partir de un ácido nucleico diana monocatenario.

FIGURA 1

TÉCNICA ANTERIOR

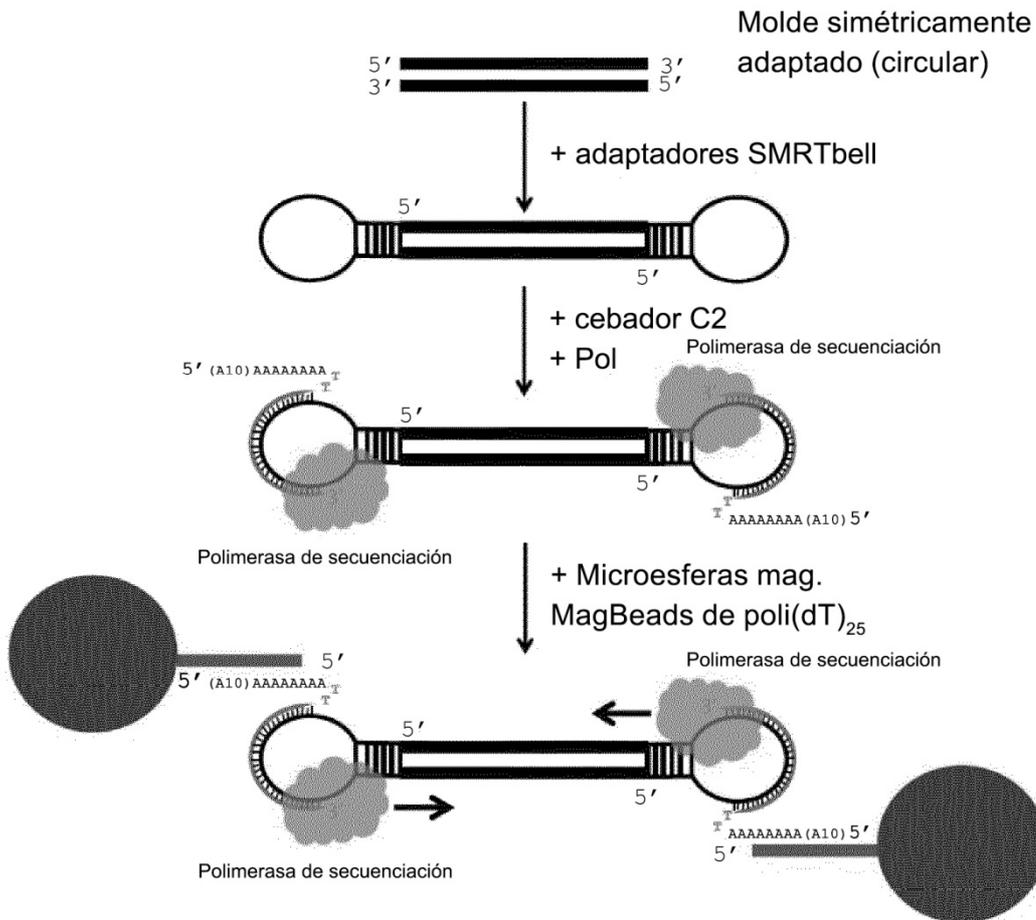


FIGURA 2

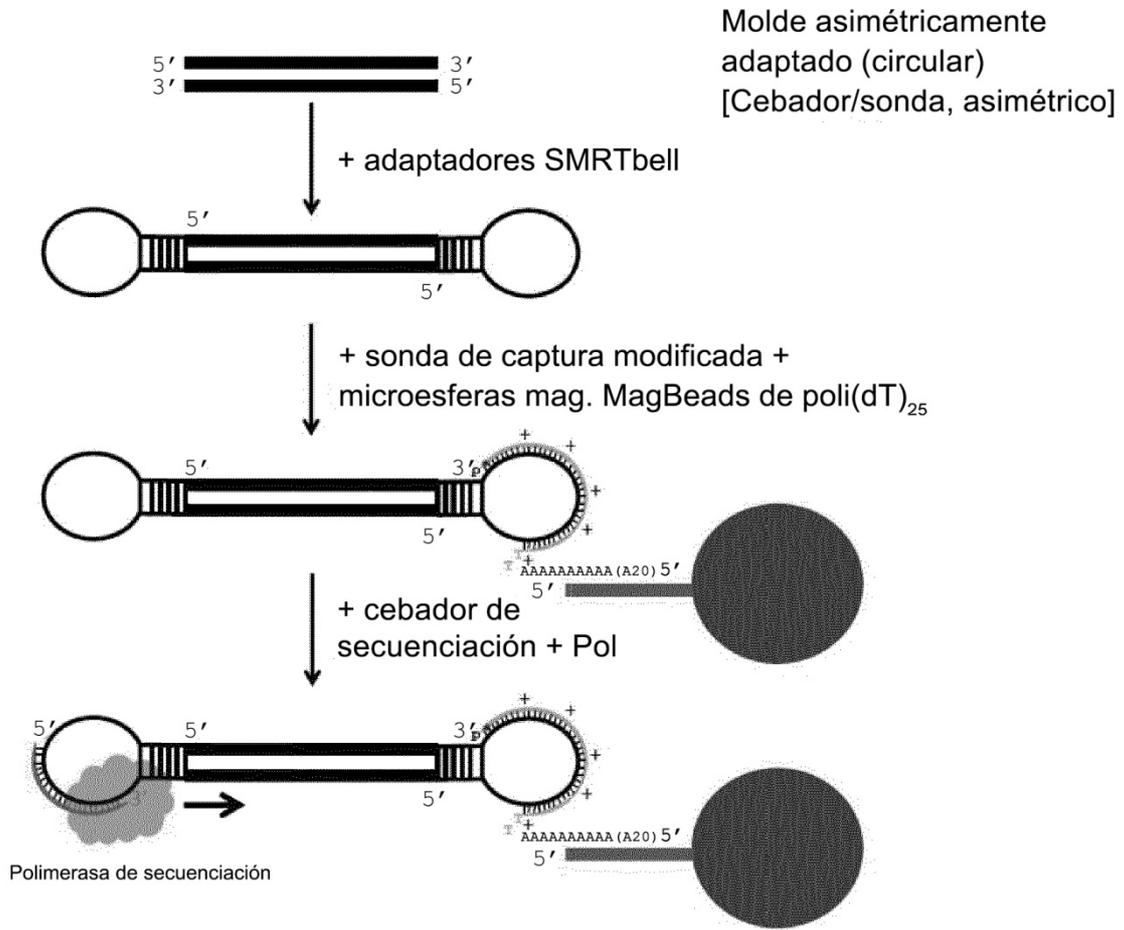


FIGURA 4

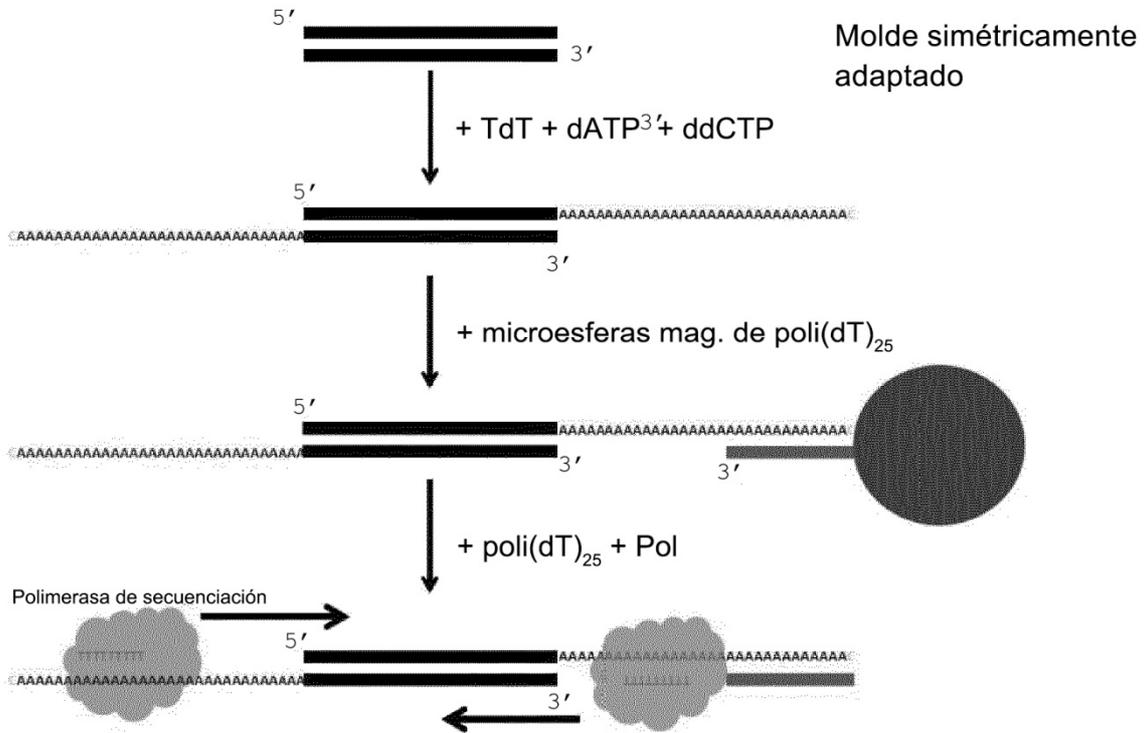


FIGURA 5

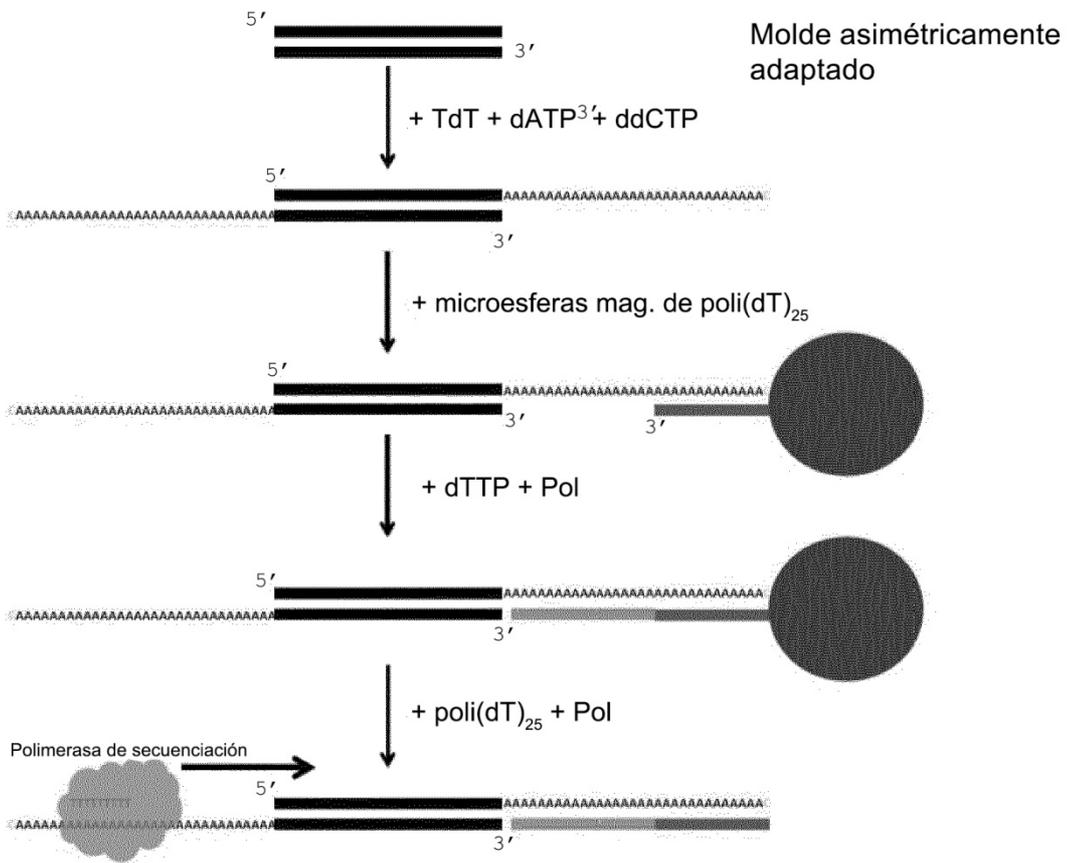


FIGURA 8A

Microesferas de oligo-dT

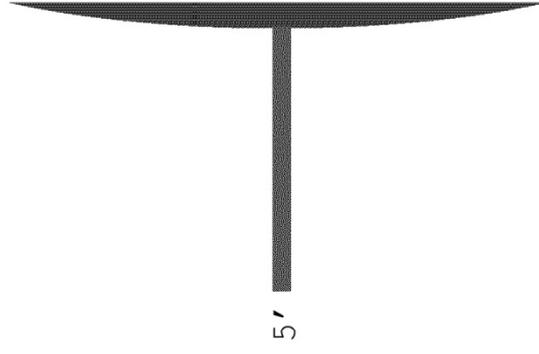


FIGURA 8F

