



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 359 058**

② Número de solicitud: 200930413

⑤ Int. Cl.:

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2011**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**18.05.2011**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Lázaro Bolos, José María;**  
**Vega José, Miguel de;**  
**Salas Falgueras, Margarita;**  
**Blanco Dávila, Luis y**  
**Mencía Caballero, Mario**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Quimera de ADN polimerasa del fago  $\phi$ 29.**

⑤ Resumen:

Quimera de ADN polimerasa del fago  $\phi$ 29.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a una quimera de ADN polimerasa que comprende una región amino-terminal (N-terminal), que codifica para una ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29, y una región carboxilo-terminal (C-terminal), que comprende, al menos, un dominio HhH, que se encuentran unidas mediante una secuencia aminoácida conectora y a su uso para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde. Asimismo, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con dicha quimera de ADN polimerasa y un kit para llevar a cabo dicho método.

ES 2 359 058 A1

## DESCRIPCIÓN

Quimera de ADN polimerasa del fago  $\phi 29$ .

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a una quimera de ADN polimerasa que comprende una región amino-terminal (N-terminal), que codifica para una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ , y una región carboxilo-terminal (C-terminal), que comprende, al menos, un dominio HhH, que se encuentran unidas mediante una secuencia aminoacídica conectora y a su uso para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde. Asimismo, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo la repli-

10 cación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con dicha quimera de ADN polimerasa y un kit para llevar a cabo dicho método.

## Estado de la técnica anterior

15 La única enzima requerida por el bacteriófago  $\phi 29$  para replicar su genoma es su ADN polimerasa, una proteína monomérica de 66 KDa, capaz de catalizar tanto la iniciación de la replicación como la elongación de la cadena sintetizada. Para la iniciación, esta polimerasa se une a una proteína denominada "terminal" (TP), reconoce el extremo del ADN de  $\phi 29$  y cataliza la formación de un complejo covalente TP-dAMP. Tras la polimerización de 10 nucleótidos, se disocia el heterodímero ADN polimerasa/TP y se lleva a cabo la elongación de la cadena naciente de ADN.

20 Las ADN polimerasas replicativas requieren la interacción con proteínas accesorias que estabilizan la unión entre la enzima y el ADN (Kuriyan y O'Donnell. *J Mol Biol.* 1993; 234: 915-925). Por otro lado, dichas ADN polimerasas necesitan acoplar la polimerización al desplazamiento de la cadena de ADN que no está siendo copiada, para lo cual requieren su asociación funcional a proteínas tipo helicasa. En este sentido, la ADN polimerasa del bacteriófago  $\phi 29$  presenta varias características funcionales intrínsecas que la hacen única:

- a) Elevada procesividad (definida como el número de nucleótidos incorporados por evento de unión).
- b) Alta capacidad de desplazamiento de cadena, lo que le permite replicar el genoma de dicho bacteriófago en ausencia de proteínas accesorias tipo helicasa. Estas dos características, procesividad y desplazamiento de cadena permiten que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  sea capaz de sintetizar cadenas de ADN de más de 70 kb de longitud (Blanco *et al.* *J Biol Chem.* 1989; 264: 8935-8940).
- c) Alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena (Esteban *et al.* *J Biol Chem.* 1993; 268: 2719-2726).

25 Todas estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos de procesos isotérmicos (a temperatura constante) para la amplificación de ADN de doble cadena (ADNbc), basados en el uso de esta polimerasa. En una configuración simple, la capacidad de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  para usar ADN de cadena sencilla (ADNmc) circular permite una amplificación de ADN por el método del círculo rodante (o, RCA de las siglas en inglés de *rolling-circle amplification*), originando moléculas de ADNmc de gran longitud y que contienen más de 10 copias del molde circular (Blanco *et al.* *J Biol Chem.* 1989; 264: 8935-8940; US5001050, US5198543 y US5576204). En el procedimiento de amplificación de ADNbc desarrollado por Amersham Biosciences/Molecular Staging (Dean *et al.* *Genome Res.* 2001; 11: 1095-1099; Dean *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 5261-5266), la combinación del uso de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  con el de hexámeros (hexa-nucleótidos) cebadores de secuencias al azar, permiten obtener factores de amplificación de  $10^4$ - $10^6$  partiendo de picogramos de ADN plasmídico circular [Templiphi™ de GE Healthcare] o de 10 nanogramos de ADN genómico [Genomiphi™ de GE Healthcare y Repli-G® de Qiagen]. Los productos originados son de alta calidad y pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa, habiéndose demostrado que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  es la enzima más robusta para este fin. El tampón habitual para llevar a cabo las reacciones de amplificación con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  contiene Tris-HCl (pH 7,5) más distintas concentraciones (en el orden milimolar) de NaCl o KCl y MgCl<sub>2</sub> (US20030207267). Sin embargo, a pesar de la bondad de estos protocolos en situaciones muy diversas, es una necesidad creciente el desarrollar otros que permitan partir de cantidades menores de ADN.

30 Los motivos HhH ("hélice-gancho-hélice") unen el ADN independientemente de su secuencia y se encuentran en diversas ADN polimerasas, ligasas y glicosilasas (Shao y Grishin. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 2643-2650; Doherty *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1996; 24:2488-2497). Estos motivos contienen un par de  $\alpha$ -hélices antiparalelas conectadas por un lazo tipo "horquilla". La segunda  $\alpha$ -hélice no sobresale de la estructura y por lo tanto, a diferencia de otros motivos de unión al ADN, no puede intercalarse en el surco mayor del ADN. Los estudios cristalográficos sugieren que las interacciones proteína-ADN se establecen a través del "lazo" entre las dos  $\alpha$ -hélices. Este lazo está implicado en el establecimiento de interacciones inespecíficas con el ADN, y normalmente contiene la secuencia consenso GhG, donde *h* es un residuo hidrofóbico, normalmente I, V, o L. La resolución de estructuras cristalográficas sugieren que las interacciones se establecen entre los nitrógenos de la cadena polipeptídica y los oxígenos de los fosfatos del ADN. Además, en las posiciones 2 y 3 respecto a la segunda G suelen existir aminoácidos polares que establecerían interacciones adicionales con los grupos fosfato. La última G de la secuencia consenso constituye la parte N-terminal de la segunda  $\alpha$ -hélice, y el residuo hidrofóbico *h* contribuye a las interacciones entre las dos  $\alpha$ -hélices del motivo. Las dos  $\alpha$ -hélices se encuentran empaquetadas formando entre sí un ángulo de 25-50° que dicta el patrón característico de

hidrofobicidad en las secuencias. Los motivos HhH generalmente forman parte de estructuras mayores denominadas (HhH)<sub>2</sub>, compuestas por dos motivos HhH unidos por una hélice  $\alpha$ , formando una simetría especular respecto a la del ADN que facilita su unión estable al mismo (Shao y Grishin. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 2643-2650; Doherty *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1996; 24:2488-2497; Thayer *et al.* *EMBO J.* 1995; 14: 4108-4120).

La formación de quimeras entre ADN polimerasas termoestables como Taq y Pfu y motivos que unen ADN de manera no específica se ha utilizado anteriormente para aumentar la capacidad de unión al ADN por dichas polimerasas. (Pavlov *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 13510-13515; WO2004013279; Wang *et al.* *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1197-1207).

La resolución cristalográfica de la estructura de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  ha proporcionado las bases moleculares responsables de la polimerización procesiva acoplada al desplazamiento de cadena, una característica específica de esta enzima (Kamtekar *et al.* 2006; *EMBO J* 25: 1335-1343).

El análisis comparativo con otras ADN polimerasas del tipo eucariótico (familia B) muestra un plegamiento general similar: un dominio de polimerización C-terminal constituido por los subdominios universales *fingers*, *palm* y *thumb*, y que forman un canal a través del cual se une el ADN; y un dominio exonucleasa 3'-5' N-terminal responsable de eliminar los nucleótidos incorporados erróneamente durante la polimerización. La principal diferencia estructural entre las ADN polimerasas de estructura conocida y la de  $\phi 29$  es la presencia en esta última de dos subdominios adicionales en su dominio de polimerización, ambos correspondientes a inserciones de secuencia conservadas en el subgrupo de las ADN polimerasas que utilizan una proteína como iniciador, llamados TPR1 y TPR2. El subdominio TPR1 se encuentra situado junto a *palm* y contacta con el dúplex DNA. El subdominio TPR2, con una estructura de  $\beta$ -*hairpin*, forma, junto a los subdominios *thumb*, *palm* y *fingers* una estructura anular que rodearía por completo al ADN de nueva síntesis, estabilizando la unión de la ADN polimerasa al ADN, requerida para replicar de manera procesiva. Asimismo, el subdominio TPR2 participa junto con los subdominios *fingers*, *palm* y el dominio exonucleasa en la formación de un canal estrecho por el que pasa la cadena molde para acceder al centro activo durante la replicación, forzando la separación de la doble cadena de ADN a medida que la polimerasa se va desplazando, actuando de manera análoga a como lo haría una helicasa y proporcionando a la polimerasa su capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de cadena (Kamtekar *et al.* 2006; *EMBO J* 25: 1335-1343; Rodríguez *et al.* 2005; *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6407-6412). Estas diferencias tan significativas en el dominio de polimerización de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  respecto del resto, hace impredecible el efecto que la fusión de un péptido en el extremo C-terminal de la misma tendría en sus propiedades de polimerización y de unión al ADN.

### Explicación de la invención

La presente invención se refiere a una quimera de ADN polimerasa que comprende una región N-terminal, que codifica para una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ , y una región C-terminal, que comprende, al menos, un dominio HhH, que se encuentran unidas mediante una secuencia aminoacídica conectora y a su uso para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde. Asimismo, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con dicha quimera de ADN polimerasa y un kit para llevar a cabo dicho método.

La ADN polimerasa del fago  $\phi 29$  presenta varias características de gran interés para la amplificación de ADN como son: una elevada procesividad sin necesidad del concurso de ninguna proteína accesoria y una alta capacidad de desplazamiento de cadena que le permiten replicar el genoma de dicho bacteriófago en un solo evento de unión al ADN, así como una alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena. Estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos para la amplificación isotérmica de ADN, basados en el uso de esta polimerasa que permiten la obtención de productos de alta calidad que pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa. Sin embargo, existe una necesidad de protocolos que permitan la amplificación de ADN a partir de cantidades menores del mismo. La presente invención responde a esta necesidad mediante dos enfoques: 1) el desarrollo de una composición que mejora significativamente la especificidad y el rendimiento de la reacción, y 2) la formación de quimeras entre la ADN polimerasa de  $\phi 29$  y motivos que unen ADN de manera no específica que aumentan la capacidad de unión al ADN de la enzima.

En los ejemplos de esta patente se muestra que la adición simultánea de monolaurato de sorbitán polioxi-etileno (Tween<sup>®</sup> 20) y una sal de amonio al tampón usado habitualmente para la amplificación con la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , por un lado, evita la amplificación inespecífica de ADN y, por otro, permite la amplificación detectable y específica a partir de cantidades límite de 0,1 femtogramos (fg) de ADN plasmídico y 10 fg de ADN genómico como molde.

Respecto al aumento de la capacidad de unión al ADN, en la presente invención se han fusionado motivos HhH de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri* al extremo carboxilo de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  a través de una secuencia conectora o *linker*, originando 4 quimeras diferentes. Estas quimeras son capaces de amplificar el ADN molde a partir de una cantidad menor que la requerida por la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural.

Un primer aspecto de la presente invención, se refiere a una quimera de ADN polimerasa (de aquí en adelante, quimera de ADN polimerasa de la invención) que comprende:

- a) una secuencia aminoacídica que codifica para una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ , unida por su extremo C-terminal a

## ES 2 359 058 A1

- b) una secuencia aminoacídica conectora, unida por su extremo C-terminal a
- c) una secuencia aminoacídica que comprende, al menos, un dominio hélice-gancho-hélice (HhH).

5

El término “ADN polimerasa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. Generalmente, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' de un cebador hibridado con una secuencia de ADN molde, y procede en dirección al extremo 5' de la hebra del ADN molde.

10

El término “quimera”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una proteína cuya secuencia aminoacídica es un producto de fusión de secuencias aminoacídicas de al menos dos proteínas distintas. Una proteína quimérica generalmente se produce mediante su expresión a partir de un ADN quimérico que codifica para la secuencia aminoacídica quimérica.

15

Los términos “quimera de ADN polimerasa” o “ADN polimerasa quimérica”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a una proteína cuya secuencia aminoacídica es un producto de fusión de secuencias aminoacídicas de al menos dos proteínas distintas, de las cuales una es una ADN polimerasa, y que es capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. La quimera de ADN polimerasa de la invención, comprende una región N-terminal, que codifica para una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  (a), y una región C-terminal, que comprende, al menos, un dominio HhH (c), que se encuentran unidas mediante una secuencia aminoacídica conectora (b).

20

El término “ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ ”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier ADN polimerasa que contiene subdominios TPR1 y TPR2 en su dominio de polimerización, que proporcionan a la polimerasa la capacidad de acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento de cadena. Ejemplos de ADN polimerasas del tipo  $\phi 29$  que pueden ser empleadas en la presente invención se seleccionan de la lista que comprende las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos:  $\phi 29$ , Cp-1, PRD-1,  $\phi 15$ ,  $\phi 21$ , PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

25

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica de (a) de la quimera de la ADN polimerasa de la invención codifica una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  que se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos:  $\phi 29$ , Cp-1, PRD-1,  $\phi 15$ ,  $\phi 21$ , PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

30

35

Preferiblemente, la secuencia aminoacídica de (a) de la quimera de la ADN polimerasa de la invención presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la secuencia aminoacídica de (a) de la quimera de la invención presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1. Aún más preferiblemente, la secuencia aminoacídica de (a) de la quimera de la invención es la SEQ ID NO: 1.

40

El dominio exonucleasa de las ADN polimerasas del tipo  $\phi 29$  es conocido y puede ser modificado para reducir la actividad exonucleasa reteniendo una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de cadena. Estas ADN polimerasas modificadas son especialmente útiles para secuenciar moléculas largas.

45

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica de (a) de la quimera de la ADN polimerasa de la invención codifica una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  que presenta modificación en el dominio exonucleasa, donde dicha ADN polimerasa modificada tiene preferiblemente, menos del 10% de actividad exonucleasa y, más preferiblemente, menos del 1% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural o “wild type”. En una realización aún más preferida, dicha ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

50

Los motivos HhH (“hélice-gancho-hélice”) son motivos de unión a ADN de manera independiente de la secuencia. Estructuralmente, los motivos HhH están constituidos por un par de  $\alpha$ -hélices antiparalelas conectadas por un bucle de tipo gancho. Este bucle se encuentra implicado en la interacción con el ADN y, generalmente, tiene una secuencia consenso consistente en glicina-aminoácido hidrofóbico-glicina (GhG), donde h es un residuo aminoacídico hidrofóbico, frecuentemente, leucina, isoleucina o valina. La última glicina de la secuencia consenso sirve como residuo N-terminal de la segunda  $\alpha$ -hélice y el residuo hidrofóbico h contribuye a las interacciones entre las dos  $\alpha$ -hélices del motivo.

55

60

Ejemplos de proteínas que presentan algún motivo HhH en su secuencia son, pero sin limitarse, la ADN topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*, las proteínas MutY, Nth, MutM/Fpg, Nei, UvrC, DinP, RecR, UmuC, DnaE o DnIJ de *Escherichia coli* o las proteínas RAD1, RAD2, RAD10, RAD27, RAD 55, RAD 57, REV1, OGG1, NTG1, NTG2, DIN-7 o EXO-1 de levaduras, así como los homólogos de estas proteínas en otros organismos como, por ejemplo, pero sin limitarse, *Bacillus subtilis*, *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus influenzae*, *Methanococcus jannaschii*, *Micrococcus luteus*, *Methanobacterium thermoformicum* o *Salmonella typhimurium*.

65

## ES 2 359 058 A1

Por tanto, en una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención, comprende, al menos, un dominio HhH de una proteína que se selecciona de la lista que comprende:

- 5 - topoisomerasa V de *M. kandleri*,
- MutY, Nth, MutM/Fpg, Nei, UvrC, DinP, RecR, UmuC, DnaE o DnlJ de *E. coli*,
- RAD1, RAD2, RAD10, RAD27, RAD 55, RAD 57, REV1, OGG1, NTG1, NTG2, DIN-7 o EXO-1 de  
10 levaduras, o
- una proteína homóloga de las anteriores en *B. subtilis*, *C. elegans*, *H. influenzae*, *M. jannaschii*, *M. luteus*,  
*M. thermoformicum* o *S. typhimurium*.

15 El extremo C-terminal de la topoisomerasa V de *M. kandleri*, se encuentra organizado en 12 repeticiones de unos 50 aminoácidos cada una, denominadas dominios A-L y que presentan cada uno dos motivos HhH.

20 En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención, comprende, al menos, un dominio HhH derivado de la topoisomerasa V de *M. kandleri*, cuya secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 2.

25 En una realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención es la SEQ ID NO: 3, que corresponde a la secuencia del dominio H de la topoisomerasa V de *M. kandleri*.

30 En otra realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención es la SEQ ID NO: 3 unida por su extremo C-terminal a la SEQ ID NO: 4, que corresponde a la secuencia del dominio H de la topoisomerasa V de *M. kandleri* unido por su extremo C-terminal al dominio I de la topoisomerasa V de *M. kandleri*.

35 El término "secuencia aminoacídica conectora", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia aminoacídica corta de, al menos, 2 aminoácidos de longitud que permite el mantenimiento de la funcionalidad de las secuencias aminoacídicas de (a) y (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención. Preferiblemente, la secuencia aminoacídica conectora de (b) es de 6 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia aminoacídica conectora de (b) es SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la quimera de ADN polimerasa de la invención para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:

- 45 a) la quimera de ADN polimerasa de la invención,
- b) un tampón,
- c) cloruro magnésico,
- 50 d) un cebador, y
- e) nucleósidos trifosfato.

55 Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende los elementos (a)-(e) mencionados anteriormente y que además comprende monolaurato de sorbitán polioxietileno, una sal de amonio, una sal de potasio o una combinación de cualquiera de las anteriores.

60 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la quimera de ADN polimerasa de la invención está a una concentración de entre 5 nM y 75 nM. En una realización más preferida, la quimera de ADN polimerasa de la invención está a una concentración de entre 25 nM y 60 nM. En una realización aún más preferida, la quimera de ADN polimerasa de la invención está a una concentración de aproximadamente 50 nM.

65 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tween® 20) está a una concentración de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción. En una realización más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietileno está en una proporción

## ES 2 359 058 A1

de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de aproximadamente 0,025% del volumen total de la reacción. Por “volumen total de la reacción”, se entiende el volumen resultante tras la adición del ADN molde a la mezcla de reacción.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es sulfato de amonio. En una realización más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de aproximadamente 45 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es cloruro de amonio. En una realización más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es acetato de amonio. En una realización más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización más preferida, el tampón está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón está a un pH de aproximadamente 7,5.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES. En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de aproximadamente 7,5.

En una realización preferida de este aspecto del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 25 mM y 50 mM. En una realización más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 30 mM y 45 mM. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de aproximadamente 40 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico. En una realización más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de aproximadamente 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM. En una realización más preferida, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro magnésico está aproximadamente a 10 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de entre 40 mM y 50 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de 45 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

## ES 2 359 058 A1

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxi-etileno se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una más realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxi-etileno se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxi-etileno se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una más realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxi-etileno se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

El término “replicación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a partir de un ADN molde.

El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ADN molde.

El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ADN molde.

Por “poner en contacto” se entiende que el ADN molde y la mezcla de reacción se incuban en condiciones de extensión del cebador.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse, a la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de deoxinucleótidos en el ADN molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término “cebador específico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de deoxinucleótidos en el ADN molde que se quiere amplificar.

Por “complementaria” se entiende que el cebador puede hibridar con una región del ADN molde de forma que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferentemente, esa región tiene una complementariedad del 100% con una región del ADN molde. Esto es, cada nucleótido en la región de complementariedad con el cebador puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en el molde de hebra sencilla. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que cebadores que posean una región con complementariedad menor al 100% respecto al ADN molde funcionarán para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

El término “cebador arbitrario” se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde. Por lo general, en el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención se emplea una población de cebadores arbitrarios. El término “cebadores arbitrarios” se refiere a un conjunto de cebadores con una secuencia aleatoria y que se usan para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es específico.

## ES 2 359 058 A1

En otra realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es arbitrario. Preferiblemente, el cebador arbitrario está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'. Y más preferiblemente, el cebador arbitrario es un oligonucleótido de 6 nucleótidos, "hexanucleótido" o "hexámero" protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

5

La expresión "protegido frente a la acción de exonucleasas", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador modificado de forma que es resistente a la degradación nucleolítica por cualquier actividad exonucleasa 3'-5' presente en la quimera de ADN polimerasa de la invención.

10 En el método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, puede emplearse más de un cebador, pudiendo emplearse cebadores específicos y/o arbitrarios.

15 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador está a una concentración de entre 2  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . En una realización más preferida, el cebador está a una concentración de entre 20  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$ . En una realización aún más preferida, el cebador está a una concentración de entre 40 y 60  $\mu\text{M}$ . En una realización aún más preferida, el cebador está a una concentración de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ .

20 El término "nucleósidos trifosfato", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y tres grupos fosfato.

25 El término nucleósidos trifosfato incluye desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. Preferiblemente, los desoxinucleósidos trifosfato son dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Aún más preferiblemente, estos cuatro dNTPs están en condiciones equimolares. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 100  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$ . En una realización más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 200  $\mu\text{M}$  y 600  $\mu\text{M}$ . En una realización aún más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ .

30 El término nucleósidos trifosfato también incluye didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, ddATP, ddCTP, ddITP, ddUTP, ddGTP, ddTTP, o derivados de los mismos.

35 En algunas realizaciones preferidas del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. El nucleótido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

40 El término "ADN molde", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN que puede servir como sustrato para la síntesis de una cadena de ADN complementaria; es decir, se refiere a una molécula de ADN que va a ser replicada, amplificada o secuenciada. En una realización preferida el ADN molde es ADN plasmídico. En otra realización preferida, el ADN molde es ADN genómico.

45 La replicación, la amplificación o la secuenciación del ADN molde se lleva a cabo en condiciones de extensión de cebador. La expresión "condiciones de extensión de cebador" hace referencia a las condiciones en que puede tener lugar la síntesis dependiente de ADN molde iniciada en un cebador.

La síntesis de un ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

50 Por "condiciones isotérmicas" se entiende temperatura esencialmente constante. Preferiblemente, la síntesis del ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención tiene lugar a una temperatura esencialmente constante. Más preferiblemente, a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 40°C, y aún más preferiblemente, de aproximadamente 30°C.

55 Son conocidos en el estado de la técnica un amplio número de métodos que permiten la amplificación de ADN. Algunos métodos requieren un proceso de ciclado térmico como, por ejemplo, pero sin limitarse, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros métodos no requieren un proceso de ciclado térmico, sino que se realizan a una temperatura esencialmente constante como, por ejemplo, pero sin limitarse, la amplificación por círculo rodante (RCA), la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación mediante lazo (LAMP). La amplificación de un ADN molde según el método de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

60 Preferiblemente, la amplificación del ADN molde según el método de amplificación de la presente invención tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), mediante amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende elementos apropiados para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

## ES 2 359 058 A1

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención que comprende:

- a) la quimera de ADN polimerasa de la invención,
- b) un tampón, y
- c) cloruro magnésico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además monolaurato de sorbitán polioxietileno, una sal de amonio, una sal de potasio o una combinación de cualquiera de las anteriores.

Preferiblemente, dicha sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además un cebador. En una realización más preferida, el cebador es un cebador arbitrario que está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además nucleósidos trifosfato. Por ejemplo, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además desoxinucleósidos trifosfato y/o un didesoxinucleósido trifosfato.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador marcado. El nucleósido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el efecto del Tween<sup>®</sup> 20 y del (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi$ 29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb). Después de incubar a 30°C durante 5 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. A la izquierda, los fragmentos de ADN lineales obtenidos después de digestión del ADN de  $\phi$ 29 con *Hind*III, usados como marcadores de longitud del ADN.

Figura 2. Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN plasmídico (en el orden de femtogramos) por la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 3. Muestra el efecto del ión NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi$ 29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada así como de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb). Después de incubar a 30°C durante 6 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 4. Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN genómico de *Bacillus subtilis* por la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 5. Muestra la notable mejora que representa el añadir Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM al actual tampón de reacción de un kit comercial para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 (Ilustra kit de General Electrics HealthCare). El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 6. Muestra un esquema de las diferentes etapas seguidas para construir las quimeras HAY, HGT, HIAIY y HIGT.

Figura 7. Muestra el retraso en gel de las moléculas de ADN cebador/molde por las ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural y quimérica. La molécula híbrida de 15 bases/21 bases marcada en 5' (ADNbc) se incubó con ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural o con la ADN polimerasa quimérica indicada, en las condiciones descritas en el texto. Las movilizaciones del ADNbc libre y del complejo de polimerasa-ADN se detectaron por autorradiografía tras su separación por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 4% (w/v) (80:1 monómero: bisacrilamida).

Figura 8. Muestra la replicación procesiva de ADN por las ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural y quimérica. (A) Replicación de ADN de M13 acoplado a desplazamiento de cadena por las ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural y quimérica. La replicación de 250 ng de ADN de M13 con un solo cebador se llevó a cabo como se ha descrito en el texto, usando ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural o quimérica (30 nM). La posición del ADN de M13 de unidad de longitud se muestra a la derecha. (B) Síntesis procesiva por las ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural y quimérica. El ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones que en (A), usando concentraciones decrecientes de la ADN polimerasa indicada. Después de incubación a 30°C durante 20 min, las muestras se procesaron como se ha descrito en (A).

Figura 9. Amplificación por círculo rodante con cebado múltiple de 10 fg de ADN plasmídico por las ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural y quimérica. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de tampón B y 50 nM de la ADN polimerasa indicada. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 10. Amplificación del genoma entero con cebado múltiple de 100 fg de ADN genómico de *B. subtilis* con ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural y quimérica. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto en presencia de tampón B y 50 nM de la ADN polimerasa indicada. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### Ejemplo 1

*Optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación de ADN con cebado múltiple por la ADN polimerasa de  $\phi 29$*

Se ha mostrado que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  realiza una amplificación de  $10^4$ - $10^6$  veces partiendo de varios picogramos de ADN circular. Para este fin se empleó un tampón de reacción que contiene Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM (en lo sucesivo Tampón A). Después de probar la influencia de diferentes condiciones de detergentes y sales en la capacidad de amplificación de ADN de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , encontramos que la adición simultánea de Tween<sup>®</sup>20 al 0,025% y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM al Tampón A mejora mucho la amplificación de cantidades limitadas de ADN aportado.

*Condiciones de la reacción de amplificación de ADN plasmídico.*- La mezcla de incubación contenía en 12,5  $\mu$ l de tampón A, 50  $\mu$ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500  $\mu$ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP), las cantidades indicadas de un ADN plasmídico (con un tamaño de 4,2 kbp) y, donde se indica, se adicionó (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM o Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% o una combinación de ambos. La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95°C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de  $\phi 29$  50 nM y se detuvo después de la incubación a 30°C mediante calentamiento a 65°C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1  $\mu$ l de las reacciones, se digirió el ADN amplificado con la endonucleasa de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.

*Condiciones de la reacción de amplificación de ADN genómico.*- La mezcla de incubación contenía en 12,5  $\mu$ l de tampón A, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM, Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025%, 50  $\mu$ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500  $\mu$ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP) y las cantidades indicadas de ADN genómico de *Bacillus subtilis* (con un tamaño de 4 Mpb). La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95°C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de  $\phi 29$  50 nM y se detuvo después de la incubación a 30°C mediante calentamiento a 65°C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1  $\mu$ l de las reacciones y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.

La Figura 1 muestra el efecto de añadir  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM y Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico aportado. Como se muestra, la ADN polimerasa de  $\phi 29$  no dio ningún producto de amplificación detectable con el Tampón A estándar cuando se usaron 100 fg de ADN aportado. En estas condiciones de reacción, la adición de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% en ausencia de ADN causó la aparición de productos de ADN en forma de rastro, lo más probable como una consecuencia de la amplificación inespecífica de ADN causada por la hibridación y elongación de los cebadores hexámeros aleatorios. Se observó el mismo rastro con 10 fg de ADN aportado. Sin embargo, en presencia de 100 fg de ADN aportado, la adición de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% permitió que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  produjera una cantidad detectable de plásmido amplificado. La producción total de ADN amplificado, específico o inespecífico, indica que la adición de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% al Tampón A potencia la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ . Se observó un efecto similar con el detergente NP40. Por el contrario, otros detergentes analizados como Tritón X100 y Tritón X114 no potenciaban la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  (no se muestra). La adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al tampón A tenía dos consecuencias en el rendimiento y la especificidad de los productos amplificados: 1) no se detectó amplificación de ADN en ausencia de ADN aportado; 2) se obtuvieron por amplificación varios  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico de unidad longitud, incluso cuando la cantidad de ADN aportado era tan baja como 10 fg. Como control, la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al Tampón A no produjo ninguna mejora en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ .

Por lo tanto, podemos concluir que la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al Tampón A (en lo sucesivo Tampón B) produce una clara optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación con cebado múltiple de ADN circular por la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , siendo ambos reactivos absolutamente necesarios para amplificar cantidades limitadas (10 fg) de ADN aportado. De hecho, como puede verse en la Figura 2, el uso de Tampón B permitió a la ADN polimerasa de  $\phi 29$  sintetizar microgramos de ADN usando una cantidad de plásmido aportado tan baja como 0,1 fg (~24 moléculas) después de 6 horas de reacción. Como control de calidad, la digestión de los productos de amplificación con *EcoRI* generó fragmentos de ADNbc lineales de 4,2 kb, que indicaban que el producto de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original. Otra vez, el Tampón B también evitó la amplificación de ADN inespecífico (véase en la Figura 2 las calles correspondientes a las reacciones llevadas a cabo sin ADN aportado).

La Figura 3 muestra el efecto de los iones amonio y Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% en la mejora en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones anteriormente comentadas en presencia Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada. Como se puede observar en la figura tanto el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como el  $\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COO}$  tuvieron un efecto similar al  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tanto en el rendimiento como en la especificidad de los productos amplificados. Este resultado indica que el efecto anteriormente descrito del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la amplificación de cantidades limitantes de ADN plasmídico es debido a los iones  $\text{NH}_4^+$ .

Para determinar si las condiciones optimizadas descritas antes también se aplicaban a la amplificación de ADN genómico, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos realizados en presencia de concentraciones limitadas de ADN genómico de *B. subtilis* (4 Mpb de longitud). Como se muestra en la Figura 4, la presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM en el tampón B, por una parte evitaba la amplificación inespecífica de ADN (calles sin ADN aportado), y por otra parte, permitía a la ADN polimerasa de  $\phi 29$  dar amplificación detectable y específica del ADN genómico incluso cuando se usaban 10 fg de ADN aportado, es decir, una cantidad  $10^6$  veces inferior a la recomendada en los actuales kits de amplificación genómica comerciales.

Para determinar si la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM incrementa la eficiencia de amplificación de los actuales kits comerciales para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos de amplificación de ADN plasmídico descrito en las Figuras 1, 2 y 3. En la Figura 5 se muestra la notable mejora que representa el añadir Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al actual tampón de reacción del kit Illustra (GE HealthCare). Como se puede observar, siguiendo las recomendaciones del proveedor, con el kit Illustra sólo se puede amplificar de manera detectable en gel de agarosa cantidades de plásmido aportado iguales o superiores a 10  $\mu\text{g}$ . Por el contrario la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al tampón de reacción del kit Illustra disminuye de manera notable la cantidad necesaria de ADN que puede amplificarse, observándose productos de amplificación desde 1 fg aportado de ADN plasmídico, suponiendo una mejora de cuatro órdenes de magnitud en la amplificación.

## Ejemplo 2

### *Mejora de la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$ por adición de dominios HhH*

Se fusionó la ADN polimerasa de  $\phi 29$  con uno o dos dominios HhH para construir nuevas ADN polimerasas con una capacidad de unión al ADN mejorada, la cual permita usar menores cantidades de ADN aportado. La inspección de la estructura de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  nos llevó a seleccionar la fusión de los dominios HhH con el extremo C-terminal de la enzima, puesto que este extremo (el final del subdominio *thumb*) se encuentra justo a la entrada del túnel del ADNbc secuencia arriba. La fusión de los dominios HhH con el extremo N-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  habría comprometido la capacidad intrínseca de desplazamiento de cadena, ya que los datos bioquímicos y estructurales demostraron que el desenrollamiento del ADN parental tiene lugar cerca del extremo amino. Además, la colocación de los dominios HhH en el extremo N-terminal no sería la adecuada para mejorar la unión de la parte del

ADNbc formada por hibridación del cebador hexámero con el ADN molde. En este sentido, la fusión de una secuencia (His)<sub>6</sub> en el extremo N-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 tiene un efecto perjudicial en la amplificación.

## 5 2.1 Construcción de ADN polimerasas quiméricas

Para hacer las quimeras HIAY y HIGT, se encargó a la GenScript Corporation la síntesis de un fragmento de ADN que contenía los nucleótidos que codifican los dominios HhH, H (56 aminoácidos) e I (51 aminoácidos) de la Topoisomerasa V de *M. kandleri* (código en GenBank AF311944 y (Pavlov *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 13510-13515), y éste se clonó entre los sitios *EcoRV* del vector comercial pUC57. El plásmido resultante pUC57-HhH se usó como molde para amplificar por PCR un fragmento de ADN que codifica los dominios H e I. Por lo tanto, el cebador 3 (SEQ ID NO: 7) junto con los cebadores 1 (SEQ ID NO: 8) o 2 (SEQ ID NO: 9) dieron los fragmentos de ADN I y II de 369 pb, respectivamente. Además de un sitio *KasI* introducido por ambos cebadores, el cebador 1 también introdujo la secuencia que codifica el conector SEQ ID NO: 5 (Pavlov *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 13510-13515), mientras que el cebador 2 introdujo la secuencia de nucleótidos que codifica el conector SEQ ID NO: 6 (un derivado del conector SEQ ID NO: 10 previamente descrito en Sun *et al.* Proteins. 2006; 65: 231-238). El cebador 3 contenía la secuencia que codifica los 6 residuos de histidina, seguido de un codón de parada y un sitio *BamHI* (véase en la Figura 6 un esquema simplificado de la construcción de las ADN polimerasas quiméricas).

En paralelo, se usó un derivado del plásmido pJLw2 (Lázaro *et al.* Methods Enzymol. 1995; 262: 42-49) que contiene el gen que codifica la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 (572 aminoácidos), como molde para una reacción de PCR llevada a cabo con el cebador 4 (SEQ ID NO: 11) que incluye un sitio 5' *HindIII*, y los cebadores 5 (SEQ ID NO: 12) o 6 (SEQ ID NO: 13), para obtener los fragmentos III y IV de 1757 pb, respectivamente. Los fragmentos III y IV contendrán, por lo tanto, el ADN que codifica la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 seguido de las secuencias SEQ ID NO: 5 (Fragmento III) y SEQ ID NO: 6 (fragmento IV), que también incluyen un sitio *KasI*. Los fragmentos I-IV se purificaron en geles de agarosa al 0,7% y después se digirieron con *KasI*. Los fragmentos de ADN digeridos I y III, y II y IV se ligaron con la ADN ligasa de T4 para obtener un ADN lineal de 2108 pb que codifica la quimera HIAY (Fragmento V) y HIGT (Fragmento VI), respectivamente. Los productos ligados se purificaron en geles de agarosa al 0,7% y después se digirieron con las endonucleasas *BamHI* y *HindIII*. Los productos digeridos se purificaron por electroforesis en geles de agarosa. Los fragmentos V y VI finalmente se clonaron en el vector pT7-4 (Tabor *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 1074-1078). Las quimeras HIAY (ADN polimerasa de  $\phi$ 29 + conector SEQ ID NO: 5 + dominios H e I de topoV) y HIGT (ADN polimerasa de  $\phi$ 29 + conector SEQ ID NO: 6 + dominios H e I de topoV) se usaron como molde para construir las quimeras HGT y HAY, respectivamente, insertando un codón de parada después del fragmento H de TopoV mediante el kit de mutagénesis dirigida QuikChange<sup>®</sup> (Stratagene). La confirmación de la secuencia de ADN y la ausencia de mutaciones adicionales, se llevó a cabo mediante secuenciación del gen entero. Las ADN polimerasas quiméricas se expresaron en células BL21(DE3) de *E. coli* que albergaban el gen quimérico clonado en un derivado de pJLw2 plasmídico, y después se purificaron esencialmente como se describe en (Lázaro *et al.* Methods Enzymol. 1995; 262: 42-49).

En resumen, las ADN polimerasas quiméricas obtenidas fueron las siguientes:

**HAY:** ADN polimerasa de  $\phi$ 29 -SEQ ID NO: 5- HhH H (635 aa; ~73 kDa)

**HGT:** ADN polimerasa de  $\phi$ 29 -SEQ ID NO: 6- HhH H (635 aa; ~73 kDa))

**HIAY:** ADN polimerasa de  $\phi$ 29 -SEQ ID NO: 5- HhH H-I (692 aa; ~80 kDa)

**HIGT:** ADN polimerasa de  $\phi$ 29 -SEQ ID NO: 6- HhH H-I (692 aa; ~80 kDa)

## 50 2.2. Capacidad de unión al ADN de las ADN polimerasas quiméricas

Para determinar si la fusión de los motivos HhH al extremo de la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 confería una mejor capacidad de unión de las quimeras al ADN, se llevó a cabo el análisis en gel de retraso de la movilidad electroforética del ADN.

*Condiciones del ensayo.*- Los oligonucleótidos de 15 bases (SEQ ID NO: 14J y 21 bases (SEQ ID NO: 15J, que tienen una extensión 5' de seis nucleótidos además de la secuencia complementaria al oligonucleótido de 15 bases, fueron suministrados por Isogen. El oligonucleótido de 15 bases se marcó en 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP y la polinucleótido quinasa de T4. El oligonucleótido de 15 bases marcado en 5' se hibridó con el de 21 bases en presencia de NaCl 0,2 M y Tris-HCl 60 mM (pH 7,5). La molécula híbrida de oligonucleótido de 15 bases marcado en 5'/oligonucleótido de 21 bases se usó para analizar la interacción con las ADN polimerasas de  $\phi$ 29 natural o quimérica. La mezcla de incubación, en un volumen final de 20  $\mu$ l, contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), ditiotreitól 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sulfato amónico 20 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0,1 mg/ml, glicerol al 4%, molécula de oligonucleótidos de 15 bases/21 bases 1 nM, y la concentración indicada de la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 natural o quimérica. Después de incubación durante 5 min a 4°C, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% (p/v) (monómeroibis 80:1), que contenían Tris-acetato 12 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM y se desarrollaron a 4°C en el mismo tampón a 8 V/cm, esencialmente como describen (Carthew *et al.* Cell. 1985; 43: 439-448). Después

de autorradiografía, la polimerasa en complejo con el ADNbc se detectó como un desplazamiento de la movilidad (retraso) en la posición de migración del ADN marcado.

En estas condiciones, la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural produce una sola banda de retraso usando la molécula híbrida de oligonucleótidos de 15 bases/21 bases marcada (véase la Figura 7) que se ha interpretado como un complejo estable de enzima-ADN competente para la polimerización (Méndez *et al.* J Biol Chem. 1994; 269: 30030-30038). Las quimeras HAY, HGT y HIGT mostraron una capacidad de unión al ADN mayor que la enzima natural, ya que la mayor parte del sustrato se desplazó con una concentración 9,5 nM, a diferencia de la ADN polimerasa natural que necesitaba una concentración aproximadamente 2 veces mayor. La quimera HIAY presentaba una capacidad de unión al ADN similar o incluso menor que la de la polimerasa natural. A partir de estos resultados, se puede concluir que, en general, la adición al extremo C-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  de los dominios HhH y H-I de Topo V confiere una mejor capacidad de unión al ADN, aunque hay excepciones como es el caso de la quimera HIAY.

### 2.3. Replicación por círculo rodante por las ADN polimerasas quiméricas

Para determinar si la mejora en la unión del ADN obtenida por adición de los dominios HhH de la TopoV al extremo C-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  afectaba por un lado a la actividad de polimerización, y por otro a la síntesis procesiva de ADN acoplada al desplazamiento de cadena, se llevaron a cabo ensayos de replicación con cebador de M13 en los que la ADN polimerasa empieza la polimerización a partir del grupo 3'-OH de un oligonucleótido de ADN. En este ensayo, el primer ciclo de replicación no requiere desplazamiento de cadena, pero una vez completado, la polimerasa encuentra el extremo 5' del cebador, requiriendo así un desplazamiento activo para continuar los siguientes ciclos de replicación (tipo círculo rodante).

*Condiciones del ensayo.*- El ADNmc de M13mp18 se hibridó con el cebador universal en presencia de NaCl 0,2 M y Tris-HCl 60 mM (pH 7,5), y la molécula resultante se usó como un cebador/molde para analizar la polimerización de ADN procesiva acoplada al desplazamiento de cadena por las ADN polimerasas quiméricas. La mezcla de incubación contenía, en 25  $\mu$ l, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotreitól 1 mM, glicerol al 4%, BSA 0,1 mg/ml, 40  $\mu$ M de dCTP, dGTP, dTTP, y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (1  $\mu$ Ci), 250 ng de ADNmc de M13mp18 cebado con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 16, y ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural o quimérica 30 nM. Después de incubar durante los tiempos indicados a 30°C, las reacciones se detuvieron por adición de EDTA 10 mM-SDS al 0,1%, y las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido. Para el análisis de tamaños, el ADN marcado se desnaturalizó por tratamiento con NaOH 0,7 M se sometió a electroforesis en geles alcalinos de agarosa al 0,7% como se describe en (McDonell *et al.* J Mol Biol. 1977; 110: 119-146). Después de la electroforesis, se detectó el ADNmc de M13mp8 de unidad de longitud por tinción con bromuro de etidio, y después los geles se secaron y se autorradiografiaron.

Como se muestra en la Figura 8A, un descubrimiento importante es que la presencia de los dominios HhH no interfiere con la capacidad de desplazamiento de cadena de las ADN polimerasas quiméricas. La cantidad de ADN sintetizado por las quimeras HAY, HGT, HIAY y HIGT era mayor que la sintetizada por la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural (4, 5, 5 y 7 veces, respectivamente). La velocidad de replicación era similar (en el caso de las quimeras HAY y HGT) o incluso más rápida (quimeras HIGT y HIAY) que la obtenida con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural. Este resultado indica que la presencia de dominios HhH en el extremo C-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  en las quimeras mejora el uso del ADN molde durante la replicación por círculo rodante.

### 2.4. Polimerización procesiva por las ADN polimerasas quiméricas

La ADN polimerasa de  $\phi 29$  es un paradigma para la replicación procesiva de ADN, puesto que es capaz de incorporar más de 70 kb sin disociarse del ADN en ausencia de proteínas auxiliares. Por lo tanto, se analizó si la fusión de los dominios HhH en el extremo C-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  en las ADN polimerasas quiméricas afectaba a la procesividad de la polimerización.

*Condiciones del ensayo.*- La procesividad de las ADN polimerasas quiméricas se analizó con diferentes proporciones de enzima/ADN. La mezcla de incubación contenía, en 25  $\mu$ l, Tris-HCl 50 mM, (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, dithiothreitól 1 mM, glicerol al 4%, BSA 0,1 mg/ml, 40  $\mu$ M de dCTP, dGTP, dTTP, y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (1  $\mu$ Ci), 250 ng de ADNmc de M13mp18 cebado, y las cantidades decrecientes indicadas de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural o ADN polimerasas quiméricas. Después de incubar durante 20 min a 30°C, las reacciones se pararon por adición de EDTA 10 mM-SDS al 0,1%, y las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50. Para el análisis de tamaños, el ADN marcado se desnaturalizó por tratamiento con NaOH 0,7 M y se sometió a electroforesis en geles de agarosa alcalina al 0,7%. Se evaluó la procesividad de la polimerización por análisis de la longitud de los productos de replicación con proporciones decrecientes de ADN polimerasa/ADN.

Como se muestra en la Figura 8B, proporciones decrecientes de enzima/ADN no alteraban la longitud de los productos de elongación sintetizados por las ADN polimerasas de  $\phi 29$  natural o quiméricas, de acuerdo con un modelo de polimerización procesiva de ADN.

### 2.5. Amplificación por círculo rodante (RCA) con cebado múltiple de ADN plasmídico por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quiméricas

Como se ha descrito antes, tanto la alta procesividad como la capacidad de desplazamiento de cadena que posee la ADN polimerasa de  $\phi 29$  fueron la base para el desarrollo por Amersham Biosciences/Molecular Staging de uno de los procedimientos más eficaces para la amplificación de ADNmc isotérmica, en el que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  combinada con cebadores hexámeros aleatorios logra la amplificación isotérmica y fiel de  $10^4$  a  $10^6$  veces por desplazamiento de cadena de picogramos de plásmidos circulares [Templiphi™ (www.gehealthcare.com)]. Nuestros resultados con una ADN polimerasa de  $\phi 29$  que contenía una secuencia (His)<sub>6</sub> fusionada en su extremo C-terminal mostraban que a pesar de su eficacia durante la replicación por círculo rodante con un solo cebador, era incapaz de dar productos de amplificación detectables durante la RCA con cebado múltiple. Lo mismo era cierto para otros derivados mutantes de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  que mostraban mayor afinidad por los dNTP, replicando el ADN de M13 al nivel de la ADN polimerasa natural, pero no podían dar productos de amplificación. Por lo tanto, aunque la fusión de dominios HhH al extremo C-terminal de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  mejoraba la capacidad intrínseca de la enzima natural para realizar la replicación por círculo rodante con un solo cebador, no se podía anticipar un aumento similar de eficacia durante la RCA con cebado múltiple.

*Condiciones del ensayo.*- La mezcla de incubación contenía, en 12,5  $\mu$ l de tampón B, 10 fg de ADN plasmídico (4,2 kpb) como aporte. Para desnaturalizar el ADN aportado, las muestras se incubaron durante 3 min a 95°C y después se enfriaron en hielo durante 5 min. Las reacciones se iniciaron por adición de ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural o quimérica 50 nM. Después de incubación a 30°C durante los tiempos indicados, las reacciones se pararon por incubación de las muestras durante 10 min a 65°C. Se digirió 1  $\mu$ l de cada reacción con EcoRI y después se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Después de electroforesis, el ADN amplificado se detectó por tinción con bromuro de etidio.

Como se muestra en la Figura 9, la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural dio un producto de amplificación detectable a partir de 4 h de reacción. La quimera HAY dio un producto de amplificación detectable a partir de 4 h, siendo la cantidad total de producción de amplificación después de 5 h el doble de la obtenida con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural. La quimera HGT produjo una cantidad de ADN amplificado comparable a la obtenida con la quimera HAY; es interesante que el rendimiento de amplificación máximo se obtuvo en el tiempo de reacción más corto (3 h). La cantidad máxima de ADN amplificado con las quimeras HIAY y HIGT era similar a la obtenida con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural, aunque como en el caso de la quimera HGT, dicho rendimiento máximo se alcanzó a partir de 3 h de reacción. Después de digestión con EcoRI del ADN sintetizado con las cuatro quimeras, más del 80% del ADN amplificado dio un fragmento de ADNbc de 4,2 kb, que indicaba que la mayor parte del producto de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original.

Este resultado indica una mayor capacidad de las ADN polimerasas quiméricas que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural para amplificar cantidades limitadas (10 fg) del ADN plasmídico.

### 2.6 Amplificación del ADN con cebado múltiple de ADN genómico por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quiméricas

Además de la tecnología de RCA con cebado múltiple descrita antes, se desarrolló un procedimiento de amplificación de genoma entero, llamado Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA), basado en las propiedades de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  combinadas con el uso de cebadores hexámeros aleatorios (Dean *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 5261-5266). Los kits Genomiphi™ (GE Healthcare) y Repli-G® (Qiagen), basados en este procedimiento, requieren una cantidad mínima de 10 ng de ADN genómico. Para investigar si las ADN polimerasas quiméricas tienen mejor capacidad para amplificar cantidades limitadas de ADN genómico con respecto a la ADN polimerasa  $\phi 29$  natural, se realizó MDA del ADN genómico de *B. subtilis*.

*Condiciones del ensayo.*- La mezcla de incubación contenía, en 12,5  $\mu$ l de tampón B, 100 fg de ADN genómico de *B. subtilis*. Para desnaturalizar el ADN, las muestras se incubaron durante 3 min a 95°C y después se enfriaron con hielo durante 5 min. Las reacciones se iniciaron por adición de ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural o quimérica 50 nM. Después de incubación a 30°C durante los tiempos indicados, las reacciones se pararon incubando las muestras durante 10 min a 65°C. Se analizó 1  $\mu$ l de cada reacción por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Después de electroforesis, el ADN amplificado se detectó por tinción con bromuro de etidio.

Como se muestra en la Figura 10, en las condiciones experimentales descritas antes, la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural dio productos de amplificación detectables después de 5 h de incubación. La quimera HAY también produjo productos de amplificación en este tiempo, pero la cantidad total de ADN amplificado después de 6 h era mucho mayor que la obtenida con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural. Como puede observarse también, el resto de las quimeras, HGT, HIAY y HIGT dieron productos de amplificación claros en el tiempo más corto ensayado (3 h), siendo la cantidad total amplificada en este momento similar a (HIAY y HIGT) o mucho mayor (HGT) que la observada después de 6 h con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural. Estos resultados indican que la presencia de los dominios HhH dota a las ADN polimerasas quiméricas de una mejor capacidad para amplificar el ADN genómico con respecto a la ADN polimerasa de  $\phi 29$  natural.

## ES 2 359 058 A1

### 2.7 Medida de la fidelidad de las ADN polimerasas quiméricas

3  $\mu$ l de cada una de las muestras del experimento mostrado en la Figura 9, correspondiente a la amplificación múltiple por círculo rodante de 10 fg de ADN plasmídico fueron incubadas en presencia de 17  $\mu$ l de la mezcla de restricción (2  $\mu$ l New England Biolabs (NEB) 10X EcoRI Buffer, 0,5  $\mu$ l [10 unidades] de la endonucleasa EcoRI de NEB y 14,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) para obtener monómeros lineales del plásmido amplificado. Después de incubar durante 1 hora a 37°C, el DNA se purificó a través de Qiagen Gel-Extraction Kit Columns y se eluyó en 30  $\mu$ l de TE buffer (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM). 10  $\mu$ l de cada eluido se religaron incubándolos con 2  $\mu$ l de NEB 10X Ligase Buffer, 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O y 0,5  $\mu$ l (200 unidades) de T4 DNA ligasa de NEB. Las reacciones fueron incubadas una noche a 16°C, y con 2  $\mu$ l de cada una se transformaron células competentes XL-1 Blue de *E. coli*. Aproximadamente se obtuvieron 1000 transformantes con cada una de las muestras de la amplificación, mientras que no se obtuvo ninguno con muestras control que contenían 10 fg de un plásmido de 4,2 kpb, tratados de la misma manera que cada una de las muestras descritas anteriormente. Se seleccionaron dos clones de cada transformación y se purificaron y secuenciaron los plásmidos correspondientes de acuerdo a procedimientos estándar. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación fueron: pT7-N (SEQ ID NO: 17), sp4+10 (SEQ ID NO: 18) y sp10+7 (SEQ ID NO: 19). En total, 4918 nucleótidos no solapantes de cada uno de los plásmidos amplificados por las ADN polimerasas natural y quiméricas fueron secuenciados. Los resultados se muestran en la Tabla 1 e indican una fidelidad de síntesis de las ADN polimerasas quiméricas similar a la enzima natural.

TABLA 1

*Fidelidad de polimerización de las ADN polimerasas de  $\phi$ 29 natural y quiméricas*

Polimerasa	Mutaciones
Natural	0
HAY	0
HGT	0
HIAY	1 (transversión G to T)
HIGT	0

4918 nucleótidos no solapantes de cada uno de los plásmidos amplificados por las ADN polimerasas natural y quiméricas fueron secuenciados según se describe en el texto principal.

# ES 2 359 058 A1

## REIVINDICACIONES

1. Quimera de ADN polimerasa que comprende:

- 5
- a) una secuencia aminoacídica que codifica para una ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29, unida por su extremo C-terminal a
  - b) una secuencia aminoacídica conectora, unida por su extremo C-terminal a
  - 10 c) una secuencia aminoacídica que comprende, al menos, un dominio hélice-gancho-hélice (HhH).

2. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 1 donde la secuencia aminoacídica de (c) comprende, al menos, un dominio HhH de una proteína que se selecciona de la lista que comprende:

- 15
- topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*,
  - MutY, Nth, MutM/Fpg, Nei, UvrC, DinP, RecR, UmuC, DnaE o DnIJ de *Escherichia coli*,
  - 20 - RAD1, RAD2, RAD10, RAD27, RAD 55, RAD 57, REV1, OGG1, NTG1, NTG2, DIN-7 o EXO-1 de levaduras, o
  - una proteína homóloga de las anteriores en *Bacillus subtilis*, *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus influenzae*, *Methanococcus jannaschii*, *Micrococcus luteus*, *Methanobacterium thermoformicum* o *Salmonella typhimurium*.
- 25

3. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 2 donde la secuencia aminoacídica de (c) comprende, al menos, un dominio HhH derivado de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*.

4. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 3 donde la secuencia aminoacídica de (c) es la SEQ ID NO: 3.

5. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 3 donde la secuencia aminoacídica de (c) es la SEQ ID NO: 3 unida por su extremo C-terminal a la SEQ ID NO: 4.

6. Quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la secuencia aminoacídica conectora de (b) es SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

7. Quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 de (a) se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos:  $\phi$ 29, Cp-1, PRD-1,  $\phi$ 15,  $\phi$ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o ABV.

8. Quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 de (a) tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1.

9. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 8 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 de (a) tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1.

10. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 9 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 de (a) tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

11. Quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 de (a) presenta una modificación en el dominio exonucleasa y donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

12. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 11 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 modificada de (a) tiene menos del 1% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

13. Quimera de ADN polimerasa según la reivindicación 12 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 modificada de (a) carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

14. Uso de la quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.

## ES 2 359 058 A1

15. Método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:

- a) la quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12,
- b) un tampón,
- c) cloruro magnésico,
- d) un cebador, y
- e) nucleósidos trifosfato.

16. Método según la reivindicación 15 donde la mezcla de reacción además comprende monolaurato de sorbitán polioxietilenado.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 donde la mezcla de reacción además comprende una sal de amonio.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 donde la mezcla de reacción además comprende una sal de potasio.

19. Método según la reivindicación 18 donde la sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción.

21. Método según la reivindicación 20 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción.

22. Método según la reivindicación 21 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22 donde la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

24. Método según la reivindicación 23 donde la sal de amonio es sulfato de amonio.

25. Método según la reivindicación 24 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM.

26. Método según la reivindicación 25 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM.

27. Método según la reivindicación 23 donde la sal de amonio es cloruro de amonio o acetato de amonio.

28. Método según la reivindicación 27 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM.

29. Método según la reivindicación 28 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 donde el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES.

31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 30 donde el tampón está a un pH de entre 7,0 y 8,5.

32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 31 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM.

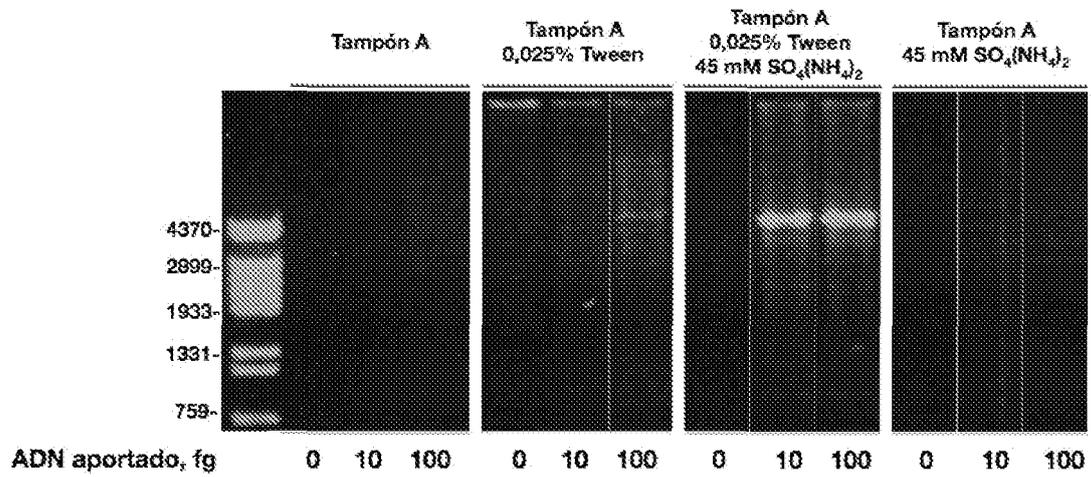
33. Método según la reivindicación 32 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM.

34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 33 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM.

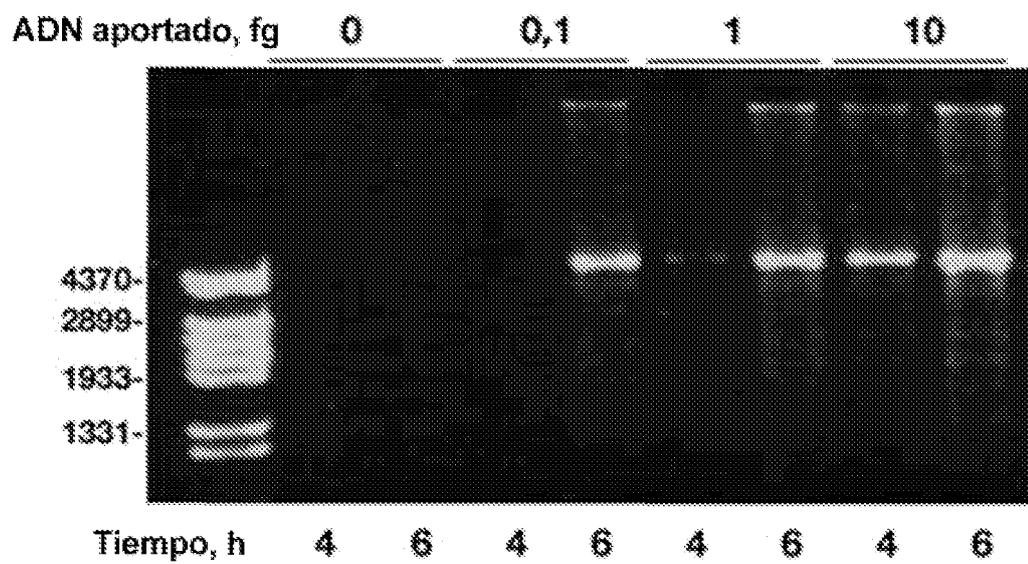
## ES 2 359 058 A1

35. Método según la reivindicación 34 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM.
36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 35 donde los nucleósidos trifosfato son dCTP, dGTP, dTTP y dATP.
37. Método según la reivindicación 36 donde los nucleósidos trifosfato dCTP, dGTP, dTTP y dATP se encuentran en cantidades equimolares.
38. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 37 donde el cebador es arbitrario y está protegido contra la acción de exonucleasas.
39. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 38 donde el ADN molde es ADN plasmídico.
40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 38 donde el ADN molde es ADN genómico.
41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 40 donde la amplificación se realiza a una temperatura esencialmente constante entre 25 y 40°C.
42. Método de amplificación de un ADN molde según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 41 donde la amplificación tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).
43. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 42 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.
44. Kit para llevar a cabo un método según las reivindicaciones 15 a 43 que comprende:
- la quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,
  - un tampón, y
  - cloruro magnésico.
45. Kit según la reivindicación 44 que además comprende monolaurato de sorbitán polioxietileno.
46. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 44 ó 45 que además comprende una sal de amonio.
47. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46 que además comprende una sal de potasio.
48. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 44 ó 47 que además comprende un cebador.
49. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48 que además comprende el cebador según la reivindicación 38.
50. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 49 que además comprende nucleósidos trifosfato.
51. Kit según las reivindicaciones 48 a 50 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

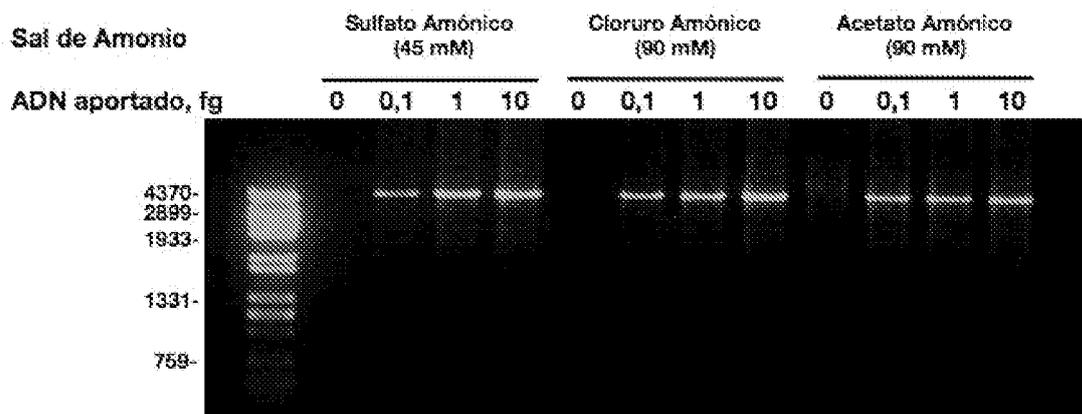
**FIG. 1**



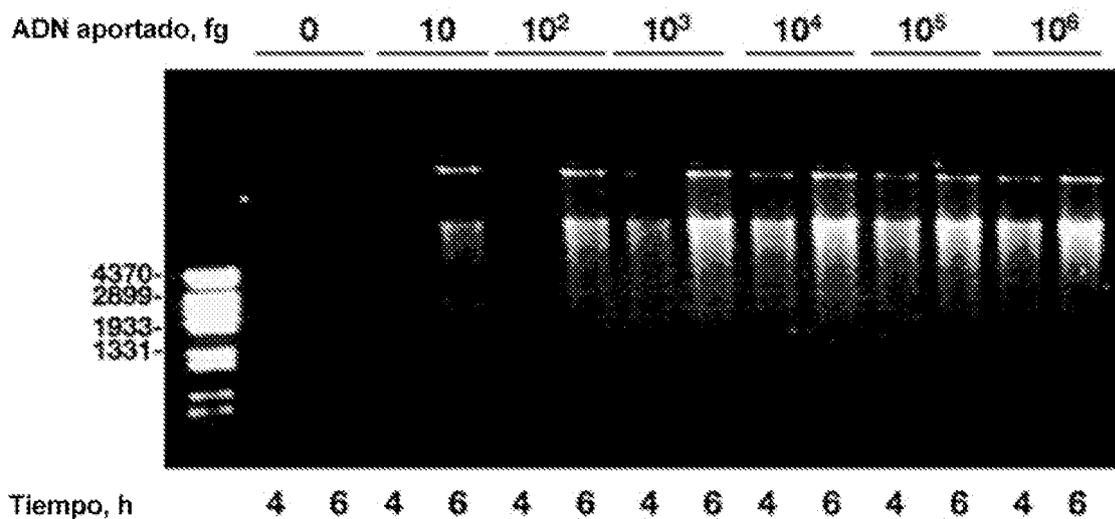
**FIG. 2**



**FIG. 3**

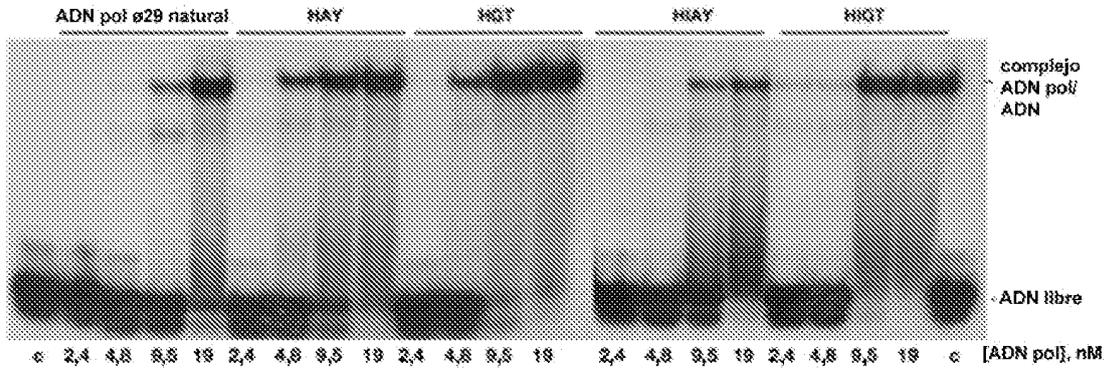


**FIG. 4**

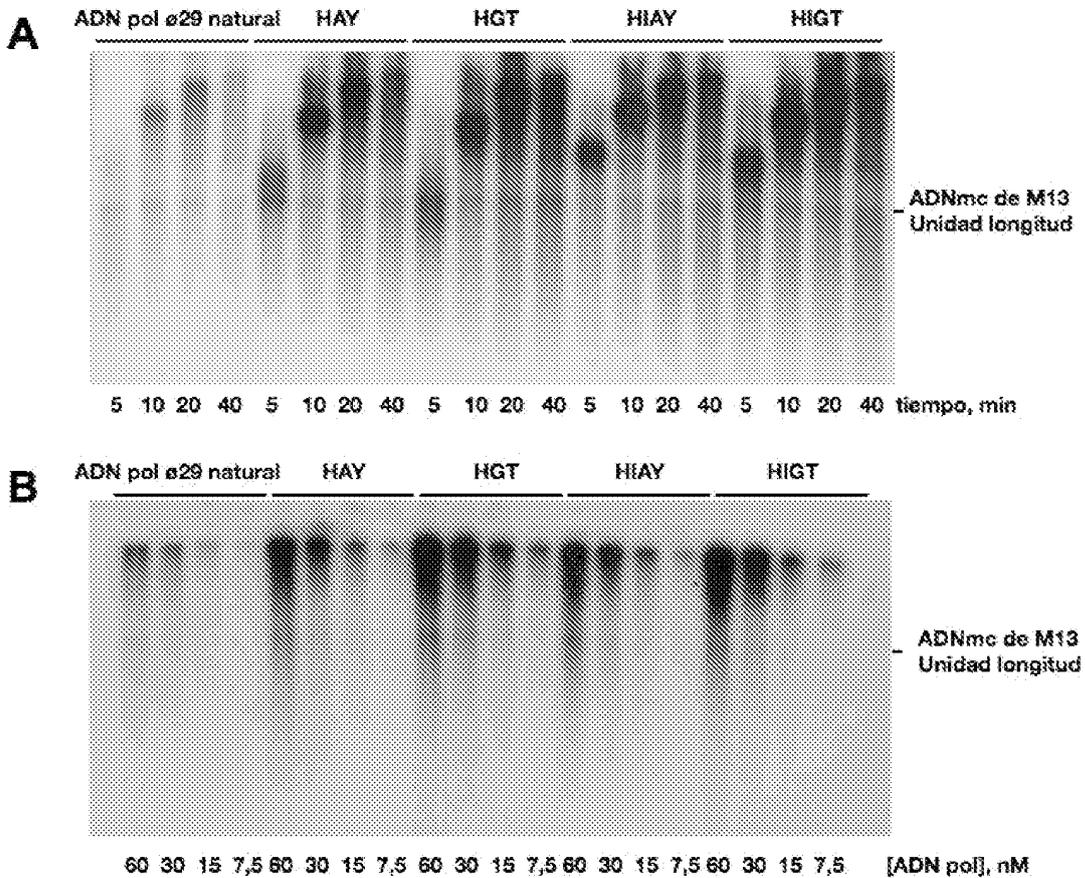




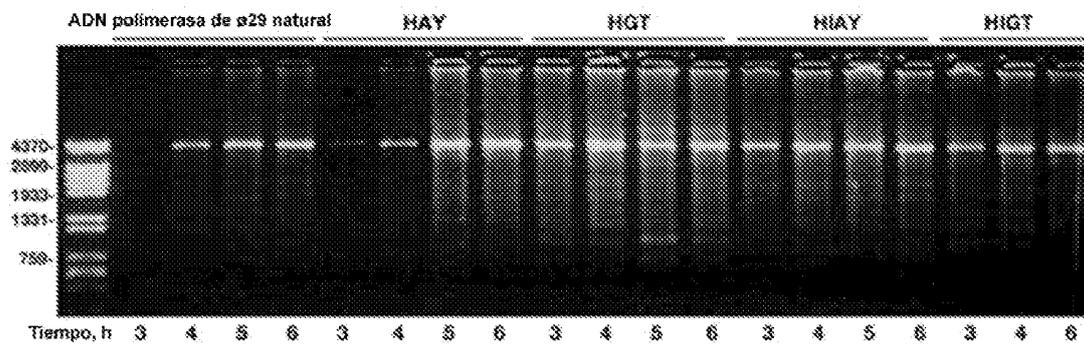
**FIG. 7**



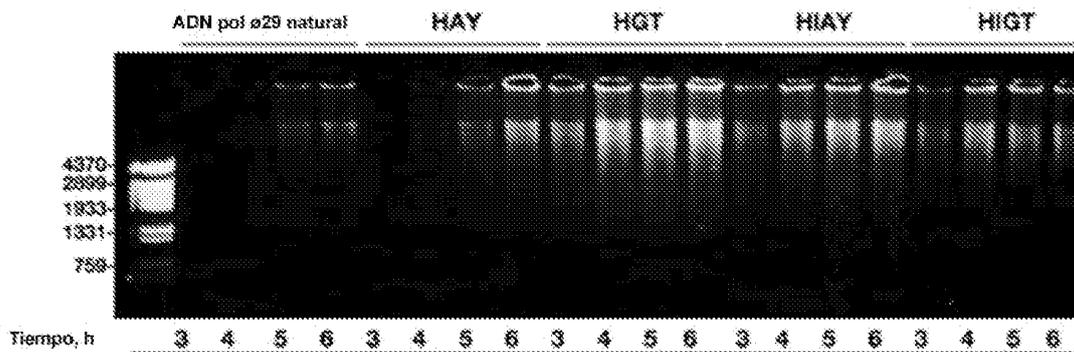
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



# ES 2 359 058 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Quimera de ADN polimerasa del fago phi29

<130> ES1641.386.1

10 <160> 19

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 572

<212> PRT

20 <213> Bacteriophage phi-29

<400> 1

25 Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr Lys Val  
1 5 10 15

Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu Asp His  
20 25 30

30 Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala Trp Val  
35 40 45

Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys Phe Asp Gly  
50 55 60

Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala  
65 70 75 80

40 Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met Gly Gln  
85 90 95

45 Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg Lys Ile  
100 105 110

His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro Val Lys  
115 120 125

50 Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp Ile Asp  
130 135 140

Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu Glu Tyr  
145 150 155 160

55 Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Arg Leu Leu Ile  
165 170 175

60 Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp Ser Leu  
180 185 190

Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys Val Phe  
195 200 205

65

## ES 2 359 058 A1

Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala Tyr Arg  
           210                                  215                                  220

5  
 Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu Ile Gly  
   225                                  230                                  235                                  240

10  
 Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln Met Tyr  
                                   245                                  250                                  255

15  
 Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly Lys Tyr  
                                   260                                  265                                  270

20  
 Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg Cys Glu  
                                   275                                  280                                  285

25  
 Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys Arg Ser  
   290                                  295                                  300

30  
 Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly Glu Ile  
   305                                  310                                  315                                  320

35  
 Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys Glu His  
                                   325                                  330                                  335

40  
 Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe Lys Ala  
                                   340                                  345                                  350

45  
 Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr Ile Lys  
                                   355                                  360                                  365

50  
 Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met Leu Asn  
   370                                  375                                  380

55  
 Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly Lys Val  
   385                                  390                                  395                                  400

60  
 Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly Glu Glu  
                                   405                                  410                                  415

65  
 Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile Thr Ala  
                                   420                                  425                                  430

70  
 Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Arg  
                                   435                                  440                                  445

75  
 Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr Glu Ile  
   450                                  455                                  460

80  
 Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Trp  
   465                                  470                                  475                                  480



# ES 2 359 058 A1

	145	150	155	160
5	Glu Val Pro Pro	Glu <sub>165</sub> Met Ala Gly	Glu Phe <sub>170</sub> Glu Arg Leu	Ile Glu <sub>175</sub> Arg
10	Tyr Asp Val Pro	Ile Asp Glu Lys	Glu <sub>185</sub> Glu Arg Ile	Leu Glu <sub>190</sub> Ile Leu
15	Arg Glu Asn <sub>195</sub> Pro	Trp Thr Pro His <sub>200</sub>	Asp Glu Ile Ala	Arg <sub>205</sub> Arg Leu Gly
20	Leu Ser <sub>210</sub> Val Ser	Glu Val Glu Gly	Glu Lys Asp Pro <sub>220</sub>	Glu Ser Ser Gly
25	Ile Tyr Ser Leu	Trp Ser <sub>230</sub> Arg Val	Val Val Val Asn <sub>235</sub>	Ile Glu Tyr Asp
30	Arg Thr Ala Lys	Arg <sub>245</sub> His Val Lys	Arg Arg <sub>250</sub> Asp Arg	Leu Leu Glu <sub>255</sub> Glu
35	Leu Tyr Glu His <sub>260</sub>	Leu Glu Glu Leu	Ser <sub>265</sub> Glu Arg Tyr	Leu Arg <sub>270</sub> His Pro
40	Leu Thr Arg <sub>275</sub> Arg	Trp Ile Val Glu	His Lys Arg Asp	Ile <sub>285</sub> Met Arg Arg
45	Tyr Leu <sub>290</sub> Glu Gln	Arg Ile Val Glu	Cys Ala Leu Lys <sub>300</sub>	Leu Gln Asp Arg
50	Tyr Gly Ile Arg	Glu Asp <sub>310</sub> Val Ala	Leu Cys Leu <sub>315</sub> Ala	Arg Ala Phe Asp <sub>320</sub>
55	Gly Ser Ile Ser	Met <sub>325</sub> Ile Ala Thr	Thr Pro <sub>330</sub> Tyr Arg	Thr Leu Lys <sub>335</sub> Asp
60	Val Cys Pro Asp <sub>340</sub>	Leu Thr Leu Glu	Glu <sub>345</sub> Ala Lys Ser	Val Asn <sub>350</sub> Arg Thr
65	Leu Ala Thr <sub>355</sub> Leu	Ile Asp Glu His <sub>360</sub>	Gly Leu Ser Pro	Asp <sub>365</sub> Ala Ala Asp
70	Glu Leu <sub>370</sub> Ile Glu	His Phe Glu <sub>375</sub> Ser	Ile Ala Gly Ile <sub>380</sub>	Leu Ala Thr Asp
75	Leu Glu Glu Ile	Glu Arg <sub>390</sub> Met Tyr	Glu Glu Gly <sub>395</sub> Arg	Leu Ser Glu Glu <sub>400</sub>
80	Ala Tyr Arg Ala	Ala <sub>405</sub> Val Glu Ile	Gln Leu Ala Glu	Leu Thr Lys <sub>415</sub> Lys
85	Glu Gly Val Gly <sub>420</sub>	Arg Lys Thr Ala	Glu <sub>425</sub> Arg Leu	Leu Arg Ala <sub>430</sub> Phe Gly

## ES 2 359 058 A1

	Asn	Pro	Glu 435	Arg	Val	Lys	Gln	Leu 440	Ala	Arg	Glu	Phe	Glu 445	Ile	Glu	Lys
5	Leu	Ala 450	Ser	Val	Glu	Gly	Val 455	Gly	Glu	Arg	Val	Leu 460	Arg	Ser	Leu	Val
10	Pro 465	Gly	Tyr	Ala	Ser	Leu 470	Ile	Ser	Ile	Arg	Gly 475	Ile	Asp	Arg	Glu	Arg 480
15	Ala	Glu	Arg	Leu	Leu 485	Lys	Lys	Tyr	Gly	Gly 490	Tyr	Ser	Lys	Val	Arg 495	Glu
20	Ala	Gly	Val	Glu 500	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp 505	Gly	Leu	Thr	Asp	Ala	Gln	Ile
25	Arg	Glu	Leu 515	Lys	Gly	Leu	Lys	Thr 520	Leu	Glu	Ser	Ile	Val 525	Gly	Asp	Leu
30	Glu	Lys 530	Ala	Asp	Glu	Leu	Lys 535	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ser 540	Ala	Ser	Ala	Val
35	Arg 545	Arg	Leu	Pro	Val	Glu 550	Glu	Leu	Arg	Glu	Leu 555	Gly	Phe	Ser	Asp	Asp 560
40	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile 565	Lys	Gly	Ile	Pro	Lys 570	Lys	Leu	Arg	Glu	Ala	Phe 575
45	Asp	Leu	Glu	Thr 580	Ala	Ala	Glu	Leu	Tyr 585	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ser 590	Leu	Lys
50	Glu	Ile	Gly 595	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr 600	Asp	Asp	Leu	Leu	Glu 605	Leu	Gly	Ala
55	Thr	Pro 610	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu 615	Ile	Lys	Gly	Pro	Glu 620	Phe	Lys	Phe	Leu
60	Leu 625	Asn	Ile	Glu	Gly	Val 630	Gly	Pro	Lys	Leu	Ala 635	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu 640
65	Ala	Val	Asp	Tyr	Asp 645	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala 650	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu 655	Glu
70	Leu	Ala	Glu	Lys 660	Val	Glu	Gly	Leu	Gly 665	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu 670	Arg	Val
75	Val	Tyr	Ala 675	Ala	Arg	Glu	Arg	Val 680	Glu	Ser	Arg	Arg	Lys 685	Ser	Gly	Arg
80	Gln	Glu 690	Arg	Ser	Glu	Glu	Glu 695	Trp	Lys	Glu	Trp	Leu 700	Glu	Arg	Lys	Val

ES 2 359 058 A1

Gly Glu Gly Arg Ala Arg Arg Leu Ile Glu Tyr Phe Gly Ser Ala Gly  
 705 710 715 720  
 5 Glu Val Gly Lys Leu Val Glu Asn Ala Glu Val Ser Lys Leu Leu Glu  
 725 730 735  
 10 Val Pro Gly Ile Gly Asp Glu Ala Val Ala Arg Leu Val Pro Gly Tyr  
 740 745 750  
 15 Lys Thr Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr Pro Ala Glu Ala Glu Arg Val  
 755 760 765  
 20 Leu Lys Arg Tyr Gly Ser Val Ser Lys Val Gln Glu Gly Ala Thr Pro  
 770 775 780  
 25 Asp Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Ile Ala Arg Ile  
 785 790 795 800  
 30 Leu Gly Leu Arg Ser Leu Val Asn Lys Arg Leu Asp Val Asp Thr Ala  
 805 810 815  
 35 Tyr Glu Leu Lys Arg Arg Tyr Gly Ser Val Ser Ala Val Arg Lys Ala  
 820 825 830  
 40 Pro Val Lys Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Ser Asp Arg Lys Ile Ala  
 835 840 845  
 45 Arg Ile Lys Gly Ile Pro Glu Thr Met Leu Gln Val Arg Gly Met Ser  
 850 855 860  
 50 Val Glu Lys Ala Glu Arg Leu Leu Glu Arg Phe Asp Thr Trp Thr Lys  
 865 870 875 880  
 55 Val Lys Glu Ala Pro Val Ser Glu Leu Val Arg Val Pro Gly Val Gly  
 885 890 895  
 60 Leu Ser Leu Val Lys Glu Ile Lys Ala Gln Val Asp Pro Ala Trp Lys  
 900 905 910  
 65 Ala Leu Leu Asp Val Lys Gly Val Ser Pro Glu Leu Ala Asp Arg Leu  
 915 920 925  
 70 Val Glu Glu Leu Gly Ser Pro Tyr Arg Val Leu Thr Ala Lys Lys Ser  
 930 935 940  
 75 Asp Leu Met Arg Val Glu Arg Val Gly Pro Lys Leu Ala Glu Arg Ile  
 945 950 955 960  
 80 Arg Ala Ala Gly Lys Arg Tyr Val Glu Glu Arg Arg Ser Arg Arg Glu  
 965 970 975  
 85 Arg Ile Arg Arg Lys Leu Arg Gly  
 980

## ES 2 359 058 A1

<210> 3  
<211> 56  
<212> PRT  
5 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> dominio H de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*

10  
<400> 3

15 Trp Lys Glu Trp Leu Glu Arg Lys Val Gly Glu Gly Arg Ala Arg Arg  
1 5 10 15

20 Leu Ile Glu Tyr Phe Gly Ser Ala Gly Glu Val Gly Lys Leu Val Glu  
20 25 30

25 Asn Ala Glu Val Ser Lys Leu Leu Glu Val Pro Gly Ile Gly Asp Glu  
35 40 45

30 Ala Val Ala Arg Leu Val Pro Gly  
50 55

30 <210> 4  
<211> 51  
<212> PRT  
35 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> dominio I de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*

40  
<400> 4

45 Tyr Lys Thr Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr Pro Ala Glu Ala Glu Arg  
1 5 10 15

50 Val Leu Lys Arg Tyr Gly Ser Val Ser Lys Val Gln Glu Gly Ala Thr  
20 25 30

55 Pro Asp Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Ile Ala Arg  
35 40 45

60 Ile Leu Gly  
50

60 <210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

65 <220>  
<223> secuencia aminoacídica conectora

# ES 2 359 058 A1

<400> 5

5 Ala Tyr Val Asp Gly Ala  
1 5

<210> 6

<211> 6

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

15

<223> secuencia aminoacídica conectora

<400> 6

20

Gly Thr Gly Ser Gly Ala  
1 5

25 <210> 7

<211> 34

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador 3

35

<400> 7

ggcgggatcc ttaatgatga tgatgatgat ggcc

34

40

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

45

<213> Artificial Sequence

<220>

50

<223> cebador 1

<400> 8

55

gcgtatgatg tgggcgccgg

20

<210> 9

60

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

65

<220>

<223> cebador 2

## ES 2 359 058 A1

<400> 9

ggcaccggct ctggcgctg gaaagaatgg ctggaacg 38

5

<210> 10  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
15 <223> secuencia aminoacídica conectora

<400> 10

20 Gly Thr Gly Ser Gly Ala  
1 5

<210> 11  
25 <211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
30 <223> cebador 4

<400> 11

35 ccgtctccgg gagctgcatg tg 22

40 <210> 12  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

45 <220>  
<223> cebador 5

50 <400> 12

ggcgcccaca tcatagctt tgattgtgaa tgtgcatca acc 43

55

<210> 13  
<211> 43  
<212> DNA  
60 <213> Artificial Sequence

<220>  
65 <223> cebador 6

## ES 2 359 058 A1

<400> 13

ggcgccagag ccggtgcctt tgattgtgaa tgtgtcatca acc

43

5

<210> 14

<211> 15

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> oligonucleótido de 15 pares de bases

<400> 14

gatcacagtg agtac

15

20

<210> 15

<211> 21

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30 <223> oligonucleótido de 21 pares de bases

<400> 15

tctattgtac tcactgtgat c

21

35

<210> 16

40 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45

<220>

<223> cebador

<400> 16

50

gttttcccag tcacgac

17

55 <210> 17

<211> 22

<212> DNA

60 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador pT7-N

65

# ES 2 359 058 A1

<400> 17	
5	ccgtctccgg gagctgcatg tg 22
<210> 18	
<211> 26	
10	<212> DNA
	<213> Artificial Sequence
<220>	
15	<223> cebador sp4+10
<400> 18	
20	ccggatgaca gcaggcagtg acagtc 26
<210> 19	
<211> 25	
25	<212> DNA
	<213> Artificial Sequence
<220>	
30	<223> cebador sp10+7
<400> 19	
35	ggtaagttag tagaaggtag tccag 25
40	
45	
50	
55	
60	
65	



② N.º solicitud: 200930413

② Fecha de presentación de la solicitud: 02.07.2009

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N9/12** (2006.01)  
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004013279 A2 (FIDELITY SYSTEMS, INC.) 12.02.2004, todo el documento.	1-5,11-16,18, 20-22,30-33,36,37, 39,40,44,45,47,48,50
A	PAVLOV, A. R., BELOVA, G. I., KONZYAVKIN, S. A., SLESAREV, A. I. Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Octubre 2002, Vol. 99, Nº 21, páginas 13510-13515. ISSN 0027-8424. <Doi:10.1073/pnas.202127199>	1-5,11-15,30-33,36, 37,39,40,44,48,50
A	RODRÍGUEZ, I., LÁZARO, J. M., BLANCO, L. et al. A specific subdomain in $\phi$ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Mayo 2005, Vol. 102, Nº 18, páginas 6407-6412. ISSN 0027-8424. <Doi:10.1073/pnas.0500597102>	1,7-10,14,15,30-33, 36,37,39-42,44,48, 50
A	KAMTEKAR, S., BERMAN, A. J., WANG, J. et al. Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage $\phi$ 29. Molecular Cell. Noviembre 2004, Vol. 16, Nº 4, páginas 609-618. ISSN 1097-2765. <Doi:10.1016/j.molcel.2004.10.019>	1,7-10,14,15,30-33, 36,37,39-42,44,48, 50
A	BLASCO, M. A., BLANCO, L., PARÉS, E., et al. Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage $\phi$ 29 DNA polymerase. Nucleic Acids Research. Agosto 1990, Vol. 18, Nº 16, páginas 4763-4770. ISSN 0305-1048. & Base de datos UniProt. Número de acceso Q38545, Versión 44. [en línea] 16.12.2008 [recuperado el 19.10.2010] Recuperado de Internet: <URL:http://www.ebi.ac.uk/uniprot/unisave/?help=0&session=/ebi/extserv/old-work/SESSION23172-1287478337-1&index=8&view=623246632&issue_date=16-DEC-2008>	1,7-13
A	BLANCO, L., PRIETO, I., GUTIÉRREZ, J. et al. Effect of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ions on $\phi$ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. Journal of Virology. Diciembre 1987, Vol. 1987, Vol. 61, Nº 12, páginas 3983-3991. ISSN 0022-538X.	15,17-19,23-29, 35,44,46

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.04.2011

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDILINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, aaGeneSeq

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.04.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-51	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-51	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2004013279 A2	12.02.2004
D02	PAVLOV, A. R. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Octubre 2002, Vol. 99, Nº 21, páginas 13510-13515.	15.10.2002
D03	RODRÍGUEZ, I. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Mayo 2005, Vol. 102, Nº 18, páginas 6407-6412.	03.05.2005
D04	KAMTEKAR, S. et al. Molecular Cell. Noviembre 2004, Vol. 16, Nº 4, páginas 609-618.	19.11.2004
D05	BLASCO, M. A. et al. Nucleic Acids Research. Agosto 1990, Vol. 18, Nº 16, páginas 4763-4770.	08.1990
D06	BLANCO, L. et al. Journal of Virology. Diciembre 1987, Vol. 61, Nº 12, páginas 3983-3991.	12.1987

En D01 y D02, se anticipan ADN polimerasas quimeras formadas por las siguientes enzimas: el fragmento Stoffel de la *Taq* polimerasa, carente de la actividad exonucleasa 5'→3', al que se le unieron varios motivos HhH de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri* en el extremo amino o carboxilo terminal; o la *Pfu* unida por su extremo carboxilo terminal a las secuencias E-L de dicha Topo V. La *Taq* pertenece a la familia de las polimerasas A, mientras que la *Pfu* a la familia B. La unión de los dominios HhH a las polimerasas, les confirió una mayor procesividad y tolerancia a las sales. En ambos documentos, se afirma que estos resultados se pueden extrapolar a otras ADN polimerasas B. Por último, resaltar que en los ensayos de amplificación de ADN mostrados en D01, se incubaron estas enzimas en un tampón Tris-HCl con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  3mM, glutamato potásico 50mM y Tween 20 0,06%, entre otros componentes.

D03 divulga un trabajo de investigación sobre la función del subdominio TPR2 de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ . Esta enzima se utiliza en las amplificaciones por círculo rodante a temperatura constante. Aunque pertenece a la familia de las ADN polimerasas B, se diferencia de otras enzimas de la familia, en que presenta dos subdominios adicionales llamados TPR1 y TPR2, en el dominio de polimerización. TPR1 está involucrado en la interacción con el ADN y la TP, y TPR2 confiere alta procesividad y capacidad de desplazamiento por la hebra de ADN a la enzima. El subdominio TPR2 hace que la polimerasa tenga una estructura toroidal, donde las otras enzimas de la familia presentan una estructura de surco abierto. Esta estructura parece dar una mayor estabilidad al complejo polimerasa/ADN.

En D04 se presenta la estructura cristalina de la polimerasa  $\phi 29$ . Dicha polimerasa se ha utilizado en amplificación del ADN por círculo rodante a temperatura constante. El dominio de polimerización se encuentra en la región carboxilo terminal. Esta región, presenta diferencias estructurales con respecto a otras polimerasas de la familia B, a la que pertenece. Así, el subdominio de dedo, que es justo el extremo carboxilo terminal, es más pequeño y con menor carácter helicoidal. Otras estructuras propias de la polimerasa son las inserciones TPR1 y TPR2, también situadas en el dominio de polimerización. En el dominio de polimerización, se forma una estructura de túnel que parece implicada en el aumento de la procesividad.

D05 estudia cuatro mutantes sensibles a temperatura de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ . La secuencia Q38545 presenta un 100% de identidad con la SEQ. ID. NO. 1 de la solicitud.

En D06 se muestra un estudio sobre el efecto de los iones  $\text{NH}_4^+$  en la replicación de  $\phi 29$ . La adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20 mM, aumenta la replicación del virus, probablemente por la estabilización del complejo ADN polimerasa-proteína terminal. Los iones  $\text{K}^+$ , también producen un incremento en la replicación de  $\phi 29$ , aunque en menor medida.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la presente solicitud, es una ADN polimerasa quimera que comprende: la secuencia aminoacídica SEQ. ID. NO 1, correspondiente a la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , unida en su extremo carboxilo terminal a una secuencia aminoacídica conectora de SEQ. ID. NO. 5 ó 6, que a su vez se encuentra unida por su extremo carboxilo terminal o al dominio HhH H de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri* (SEQ. ID. NO. 3) o a los dominios HhH H-I, de dicha topoisomerasa (SEQ. ID. NO 3 y 4) (reivindicaciones de la 1 a la 10). Cabe señalar que la enzima puede carecer de la actividad exonucleasa (reivindicaciones de la 11 a la 13). La presencia de los dominios HhH mejora la capacidad de amplificación de la polimerasa. Por lo tanto, también es objeto de la invención, el uso de la ADN polimerasa quimera en reacciones de replicación, amplificación o secuenciación (reivindicación 14). Así mismo, se muestra un método de replicación, amplificación o secuenciación, que comprende: poner en contacto el ADN con una mezcla del reacción que comprenda la polimerasa de la invención, un tampón, cloruro magnésico, nucleósidos trifosfato y un cebador (reivindicaciones 15, de la 30 a la 33, y de la 36 a la 43), junto con monolaurato de sorbitán polioxi-etileno (reivindicaciones 16 y de la 20 a la 22), una sal de amonio (reivindicaciones 17 y de la 23 a la 29), o una sal de potasio (reivindicaciones 18, 19, 34 y 35). Por último, se incluye un kit para llevar a cabo el método anterior, que comprende la ADN polimerasa quimera (reivindicaciones de la 44 a la 51).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 Y 8.1 LP 11/1986)****1.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 13**

El objeto de la presente solicitud, según la reivindicación 1, es una quimera de ADN polimerasa que comprende: una secuencia aminoacídica que corresponde a una ADN polimerasa de tipo  $\phi 29$ , unida por su extremo carboxilo terminal, a una secuencia conectora, a su vez unida por su extremo carboxilo terminal a una secuencia hélice-gancho-hélice (HhH).

Tanto D01 como D02, anticipan ADN polimerasas de la familia B en las que se han unido los fragmentos HhH E-L de la topo V de *Methanopyrus kandleri* al extremo carboxilo terminal de *Pfu*, lo que confiere una mayor procesividad a la enzima. Además los autores de ambos documentos afirman que esta construcción quimérica podría aplicarse a otras polimerasas de la familia B.

Sin embargo, no parece obvio el que la incorporación de los dominios HhH tuviera el mismo efecto en la polimerasa de  $\phi 29$ . Esto es debido a que los documentos D03 y D04, divulgan que  $\phi 29$  difiere de otras polimerasas de la familia B precisamente en su dominio carboxilo terminal, presentando subdominios que no tienen otras polimerasas de esta familia, y que están implicados en la procesividad de la enzima (TPR2), y un extremo carboxilo terminal con un subdominio en forma de dedo más corto. Por lo tanto, al tener estructuras que las diferencian de las otras polimerasas de la familia y que están implicadas en la procesividad, y presentar el extremo carboxilo terminal, que es donde se une la secuencia HhH, una estructura distinta, se considera que el resultado de la formación de la quimera de la solicitud sería incierto.

En consecuencia, la reivindicación 1 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones de la 2 a la 13 son dependientes de la 1, y como ella presentan novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

**1.2. REIVINDICACIONES 14 A LA 51**

El objeto de la presente solicitud, es el uso de la ADN polimerasa quimera en la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde (reivindicación 14); un método de replicación, amplificación o secuenciación que comprende poner en contacto la muestra de ADN con la polimerasa de la invención (reivindicación 15); y un kit que comprende dicha polimerasa (reivindicación 44).

Dado que la ADN polimerasa quimera de la invención es nueva e inventiva, su uso, el método de replicación amplificación o secuenciación que comprenda la puesta en contacto del ADN problema con la enzima, o el kit que la comprenda, también presentan novedad y actividad inventiva.

Por lo tanto, las reivindicaciones 14, 15 y 44 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones de la 16 a la 43 son dependientes de la 15, y las reivindicaciones 45 a la 51 dependen de la 44, y como éstas, también tienen novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).