



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 364 010**

② Número de solicitud: 200901943

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **02.10.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.08.2011

⑦ Solicitante/s: **X-POL BIOTECH, S.L.**
Plaza de la Encina, nº 10-11
Edificio La Encina
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Blanco Dávila, Luis y**
Juárez Santos, Raquel

⑦ Agente: **González Díaz, Vicente**

⑤ Título: **Mutantes de la ADN polimerasa mu.**

⑤ Resumen:

Mutantes de la ADN polimerasa mu.

Se describen mutantes de la ADN polimerasa mu ($Pol\mu$) que presentan una mayor actividad deoxinucleotidil-transferasa terminal que la enzima silvestre (wt) y mejoran su potencialidad como herramienta molecular. Dichos mutantes pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en técnicas de marcaje de polinucleótidos o de reunión de extremos protuberantes y romos.

ES 2 364 010 A1

DESCRIPCIÓN

Mutantes de la ADN polimerasa mu.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la identificación de mutantes de la ADN polimerasa mu humana ($Pol\mu$) y a los usos de los mismos. Estos mutantes presentan características mejoradas respecto a la versión silvestre de dicha polimerasa que mejoran su potencialidad como herramienta molecular.

10

Antecedentes de la invención

La estabilidad de la información genética no sólo depende de la fiabilidad de los sistemas de replicación sino también de la existencia de múltiples sistemas de reparación, que corrigen la mayoría de los tipos de daños que se producen en el ADN. Además de estos sistemas de reparación, es evidente la existencia de reacciones enzimáticas alternativas que de algún modo contrarrestan los efectos de los primeros, generando variabilidad en el ADN. Una de las enzimas implicadas en este tipo de procesos es la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) involucrada en los procesos de generación de diversidad y que selectivamente actúa sobre aquellos genes codificantes de receptores de antígenos (*Komori et al. (1993). Science, 261, 1171-1175*).

15

20

La TdT es una enzima de 58 kDa que normalmente sólo se encuentra presente en linfocitos B y T inmaduros. Esta enzima cataliza la adición de desoxinucleótidos en el extremo 3'OH terminal de las cadenas de oligonucleótidos sin necesidad de una hebra de ADN molde (actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal), generando así diversidad en los receptores de antígenos de las referidas células de defensa del sistema inmune. Esta actividad de TdT ha permitido que esta polimerasa haya sido ampliamente utilizada como herramienta molecular, especialmente, en técnicas de mareaje de ADN.

25

Una de estas técnicas de mareaje es el ensayo TUNEL que se basa en el principio de que la TdT incorpora desoxiuridina marcada (e.g. dUTP-biotina) en los extremos 3'OH de roturas de cadenas dobles y simples del ADN. La incorporación de dUTP marcada actúa como una señal que puede ser detectada fácilmente, por ejemplo, a través de técnicas de fluorescencia. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. Esta técnica permite, entre otras aplicaciones, identificar muestras que están sufriendo procesos apoptóticos o medir la calidad de una muestra biológica.

30

Desde el descubrimiento de la TdT, han sido pocas las enzimas con actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal encontradas en la naturaleza y, actualmente, ésta es la única que se comercializa a gran escala (e.g. *Roche Applied Science, Promega, Invitrogen*).

35

En el año 2000, una nueva polimerasa con actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal y perteneciente a la familia X de las ADN polimerasas, la *polimerasa mu* ($Pol\mu$), fue identificada y secuenciada por primera vez (*Domínguez et al. (2000) Embo J, 19, 1731-1742*). Sin embargo, aunque se puede decir que existe una amplia similitud estructural entre $Pol\mu$ y TdT, la actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal de esta nueva enzima es comparativamente muy inferior a la de la TdT. Este hecho ha imposibilitado su incorporación al mercado como una alternativa viable a la TdT, siendo todavía necesario el descubrimiento o desarrollo de nuevas enzimas que presenten esta actividad mejorada o incrementada. Hasta la fecha, únicamente el mutante simple de $Pol\mu$ humana, R387K, presenta una actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal superior a la polimerasa silvestre y similar a la de la TdT (*María José Martín et al. Gordon Research Conference on Mutagenesis 07/20/2008 - 07/25/2008 at Magdalen College in Oxford. "Rate limited terminal transferase activity of human $Pol\mu$: contribution to imprecise end-joining of non-complementary ends"*).

40

45

50 **Breve descripción de la invención**

Los autores de la presente invención han desarrollado mutantes de $Pol\mu$ que presentan una mayor actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal que la enzima silvestre o *wildtype* ($Pol\mu$ wt: UniProtKB/Swiss-Prot Q9NP87: SEQ ID NO: 17) e incluso que la propia TdT. Concretamente, la invención proporciona varios mutantes de $Pol\mu$ con una elevada actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal, superior a la de la $Pol\mu$ wt, que pueden ser empleados, entre otras, en técnicas de mareaje de polinucleótidos o de reunión de extremos protuberantes y romos (*End joining*).

55

Así, en un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan mutantes de $Pol\mu$ (en adelante, mutantes de la invención) que tienen al menos alrededor de un 10% más de actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal que la $Pol\mu$ wt, preferentemente la $Pol\mu$ humana. Preferentemente, dicha actividad es al menos alrededor de un 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% superior a la de la $Pol\mu$ wt. Del mismo modo, los mutantes de la invención también tienen una actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal igual o superior a la del mutante R387K (en adelante, también referido como mutante *R*), preferentemente dicha actividad es al menos alrededor de un 10% superior y, más preferentemente, al menos alrededor de un 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300% superior. Estos mutantes en combinación o individualmente son susceptibles de ser empleados como herramientas moleculares, preferentemente, en cualquiera de las técnicas en que se utiliza la TdT, bien como sustitutivos de ésta o en combinación con la misma.

65

ES 2 364 010 A1

En un segundo aspecto de la invención se proporciona una secuencia polinucleotídica (en adelante, secuencia polinucleotídica o polinucleótido de la invención) que codifica- cualquiera de los mutantes de la invención. Del mismo modo, también forman de parte de la invención cualquier: i) vector que comprenda al polinucleótido de la invención o ii) célula huésped que comprenda la secuencia polinucleotídica de la invención o un vector de acuerdo con la invención.

5

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de los mutantes de la invención que preferentemente comprende: i) el cultivo de una célula huésped de acuerdo con la invención y ii) el aislamiento del mutante producido.

10

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al empleo de los mutantes de la invención como herramienta molecular, preferentemente, en todas aquellas técnicas donde participa la TdT, bien como sustitutivos de ésta o en combinación con la misma. Más concretamente, los mutantes de la invención en combinación o individualmente son susceptibles de ser empleados en ensayos de: i) mareaje de extremos de polinucleótidos de cadena simple (heteropolímeros u homopolímeros) y cadena doble (extremos protuberantes o romos), ii) reunión de extremos protuberantes y romos, iii) polimerización dependiente o independiente de molde, iv) rellenado de gaps o huecos (*gap-filling*), v) detección de roturas de ADN (*mismatch detection*; e.g. *TUNEL*), vi) mutagénesis o generación de variabilidad, etc.

15

Un quinto aspecto de la invención proporciona kits que comprenden cualquiera de los mutantes de la invención, preferentemente, para llevar a cabo cualquiera de los ensayos referidos en el párrafo anterior. Adicionalmente, además de los componentes necesarios para poner en marcha el correspondiente ensayo (e.g. tampones, cebadores, dNTPs, ddNTPs, marcadores, etc.), los kits pueden comprender TdT o mutantes de la misma. El empleo de dichos kits para las aplicaciones previamente mencionadas, por ejemplo, en ensayos de: i) mareaje de extremos de polinucleótidos de cadena simple (heteropolímeros u homopolímeros) y cadena doble (extremos protuberantes o romos), ii) reunión de extremos protuberantes y romos, iii) polimerización dependiente o independiente de molde, iv) rellenado de gaps o huecos (*gap-filling*), v) detección de roturas de ADN (*mismatch detection*; e.g. *TUNEL*), vi) mutagénesis o generación de variabilidad, etc., constituye un aspecto adicional de esta invención.

20

Definiciones

30

El término “actividad deoxinucleotidil-transferasa terminal” o “actividad transferasa terminal” se define como la capacidad de llevar a cabo reacciones de polimerización independiente de molde, añadiendo nucleótidos a un extremo 3'OH sin ser éstos seleccionados por ningún criterio de complementariedad de bases. Esta actividad puede ser medida mediante diferentes ensayos sobre diferentes tipos de sustratos, preferentemente, sobre ADN de cadena simple homopoliméricas (ver Ejemplos 1 y 3). A lo largo de la descripción, cuando se indica que esta actividad se encuentra incrementada o mejorada implica que ésta es al menos un 10% más elevada que la de la Pol μ wt, preferentemente que la de la Pol μ humana. Preferentemente, dicha actividad es al menos alrededor de un 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% superior a la de Pol μ wt, preferentemente que la de la Pol μ humana.

35

El término “identidad” o “tanto por ciento (%) de identidad” hace referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen en común un porcentaje específico de aminoácidos o nucleótidos, cuando éstas son comparadas y alineadas para encontrar la máxima correspondencia entre ambas. Este parámetro puede ser medido mediante técnicas de comparación de secuencia sobradamente conocidas en el estado de la técnica, preferentemente mediante los algoritmos BLAST o FASTA, empleando los parámetros cargados por defecto.

40

El término “vector” hace referencia a un polinucleótido lineal o circular (e.g. plásmidos, cromosoma bacteriano) que comprende una secuencia polinucleotídica, donde preferentemente dicho vector está adaptado para la amplificación, replicación y/o expresión de dicho polinucleótido. Además, estos vectores pueden contener regiones que permitan controlar o potencien la amplificación, expresión y/o replicación del polinucleótido, así como otras que faciliten o promuevan la excreción o captura de los polipéptidos resultantes de la expresión del polinucleótido.

45

El término “célula huésped” hace referencia a una célula o grupo de células (eucariota o procariota) que contiene un vector o polinucleótido según la presente invención.

50

El término “polinucleótidos” hace referencia tanto a polímeros de ADN como de ARN de cadena doble o simple. Ambos polímeros cuando están en forma de cadena doble pueden tener extremos romos o protuberantes.

55

El término “nucleótidos” hace referencia a ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos (dNTPs) o didesoxinucleótidos (ddNTPs) que, preferentemente, se encuentran marcados o modificados para permitir su identificación y/o seguimiento. Preferentemente, el mareaje de los nucleótidos es realizado con fluoróforos (e.g. Cy3, Cy5, fluoresceína) o biotina. A lo largo de la descripción cuando los nucleótidos están marcados con fluoróforos, éstos son referidos como nucleótidos fluorescentes.

60

El término “análogos de nucleótido” hace referencia a compuestos o moléculas que, para una aplicación concreta, se comportan de una manera similar o análoga a un nucleótido y que no tienen una estructura particular o específica, aunque preferentemente su estructura permite la detección de su incorporación a polinucleótidos y/o la parada de la reacción de polimerización. Ejemplos de estos compuestos pueden ser encontrados en otras solicitudes como WO95/07920, WO2005/051530, WO2008/016909.

65

ES 2 364 010 A1

El término “ortólogo” hace referencia a proteínas o genes que codifican para dichas proteínas, con actividad transferasa terminal, que comparten al menos alrededor de un 40% de identidad con la Pol μ wt, preferentemente con la Pol μ humana, y en realizaciones sucesivamente más preferidas al menos alrededor de un 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%.

El término “mutación” preferentemente hace referencia a sustituciones, inserciones o deleciones que se producen a nivel de polipéptidos o polinucleótidos que expresan dichos polipéptidos. Estas mutaciones cuando se producen a nivel de un único aminoácido o triplete que lo codifica son denominadas como puntuales. Dentro las mutaciones puntuales se puede diferenciar entre las conservativas y las no conservativas, entendiéndose a las primeras como aquéllas que se producen cuando un aminoácido es sustituido por otro de similares características, según la Tabla 1.

TABLA 1

Grupos de aminoácidos				
No polares y/o con cadenas alifáticas	Polares/no cargados	Con cadenas aromáticas	Cargados positivamente	Cargados negativamente
Glicina	Serina	Fenilalanina Tirosina Triptófano	Lisina	Aspartato Glutamato
Alanina	Treonina		Arginina	
Valina	Cisteína		Histidina	
Leucina	Metionina			
Isoleucina	Asparagina			
Prolina	Glutamina			

La expresión “alrededor de”, tal y como se usa a lo largo de la descripción, hace referencia a la variación de entre el $\pm 5\%$ que puede presentar un valor dado (e.g., identidad o actividad), preferentemente entre el $\pm 3\%$ y más preferentemente $\pm 1\%$.

El término “sustancialmente”, tal y como se usa a lo largo de la descripción, hace referencia a la variación de entre el $\pm 10\%$ que puede presentar un valor dado (e.g. actividad), preferentemente entre el $\pm 5\%$ y más preferentemente $\pm 1\%$.

Los términos “fragmentos” o “subsecuencias” hacen referencia porciones de polipéptidos o polinucleótidos que codifican para dichos polipéptidos, que mantienen la actividad transferasa terminal incrementada o sustancialmente incrementada.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la actividad transferasa terminal de cada uno de los mutantes [μ -R387K-F389G, μ Q275M, μ R387K-Q275M, μ R387K-Chloop1, μ -N457D, μ -S458N y μ -N457D-S458N (Ejemplo 1)], en comparación con la de la Pol μ wt y la de la TdT comercial.

La figura 2 muestra la actividad transferasa terminal de los mutantes dobles (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) a dosis decrecientes de polimerasa (400 nM, 200 nM y 100 nM).

La figura 3 muestra la actividad transferasa terminal de los mutantes dobles (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) y de los mutantes simples (μ -R387K, μ -Chloop1 y μ -Q275M) y en comparación con la de la Pol μ wt, con cada uno de los 4 dNTPs por separado.

La figura 4 muestra la actividad transferasa terminal de los mutantes dobles (μ -R387K/F389G, μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) y de los mutantes simples (μ -R387K y μ -Q275M), en comparación con la de la Pol μ wt, con cada uno los 4 dNTPS en presencia de Co^{2+} como metal activador.

La figura 5 muestra los resultados del ensayo realizado para comparar si los mutantes dobles (M3= μ -R387K/Q275M; M7= μ -R387K/Chloop1) y simples (R= μ -R387K; Ch= μ -Chloop1; M2= μ -Q275M) tienen afectada su capacidad de polimerización dependiente de molde respecto a la de Pol μ wt.

ES 2 364 010 A1

La figura 6 muestra la dependencia de molde de los mutantes dobles (M3 y M7) y de los mutantes simples (R, Ch y M2) en el contexto de un *gap* de ADN de 1 nucleótido con fosfato.

La figura 7 muestra los resultados del ensayo de mareaje con derivados fluorescentes del DNA o de ddNTPs, con los mutantes indicados de Pol μ (M1-M7), junto con Pol μ wt y TdT sobre polinucleótidos de cadena sencilla.

La figura 8 muestra los resultados del ensayo de mareaje con derivados fluorescentes del DNA o de ddNTPs, con los mutantes indicados de Pol μ (R, Ch, M2, M3 y M7), sobre polinucleótidos de cadena sencilla.

La figura 9 muestra los resultados del ensayo de mareaje con derivados fluorescentes del DNA o de ddNTPs, con los mutantes indicados de Pol μ (R, Ch, M2, M3 y M7), sobre polinucleótidos de cadena sencilla.

La figura 10 muestra los resultados del ensayo de mareaje con derivados fluorescentes del DNA o de ddNTPs, con los mutantes indicados de Pol μ (R, Ch, M2, M3 y M7), sobre polinucleótidos de cadena sencilla.

La figura 11 muestra cómo la reacción de mareaje con M3 y M7 es altamente eficaz con los 4 ddNTPs fluorescentes, tanto en presencia de Mn²⁺ como de Co²⁺.

La figura 12 muestra el alineamiento de las secuencias polipeptídicas de Pol μ wt de *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Bos taurus* con el mutante M3. En la parte superior, la flecha indica el aminoácido 275 de Pol μ wt humana. En la parte inferior, la flecha indica el aminoácido 387 de Pol μ wt humana.

La figura 13 muestra el alineamiento de las secuencias polipeptídicas de Pol μ wt humana y la TdT de origen humano, murino y bovino. Las flechas muestran la posición de los aminoácidos 275, 387, 457 y 458 en la Pol μ wt humana.

La figura 14 muestra la estructura tridimensional de la Pol μ wt humana. A) la flecha indica la posición del aminoácido R387, B) la flecha indica la posición del aminoácido Q275, C) la flecha indica la posición del aminoácido N457 y D) la flecha indica la posición del aminoácido S458.

Descripción detallada de la invención

La enzima TdT, también conocida como deoxinucleotidil-transferasa terminal o transferasa terminal, es una ADN polimerasa especializada que se expresa fundamentalmente en linfocitos B y T inmaduros, además de en determinados tipos de tumores. Hasta el descubrimiento de la Pol μ en el año 2000 por el laboratorio del Dr. Luis Blanco (*Domínguez et al, (2000)*), la TdT era la única polimerasa conocida con capacidad de adicionar o unir nucleótidos a un extremo 3'OH de polinucleótidos sin requerir una cadena molde. Sin embargo, tal y como se ha mencionado anteriormente, la baja actividad deoxinucleotidil transferasa terminal de Pol μ wt en comparación con la TdT ha imposibilitado que, hasta la fecha, esta enzima haya podido convertirse en una alternativa viable a la TdT.

En la presente invención se presentan una serie de mutantes de Pol μ wt que aumentan la actividad deoxinucleotidil transferasa terminal de la Pol μ silvestre e incluso de la TdT. Preferentemente, dichos mutantes proceden o se derivan de la Pol μ wt humana, aunque también pueden ser obtenidos a partir de la Pol μ de otros vertebrados (polimerasas ortólogas de Pol μ), preferentemente mamíferos, tales como *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, entre otros.

La obtención de mutantes, a partir de polimerasas ortólogas a la Pol μ wt humana (o del gen que las codifica) y la enseñanza de la presente invención, puede ser llevada a cabo de manera simple por un experto en la materia, tal y como se explica en el Ejemplo 12. Del mismo modo, nuevos mutantes con la actividad transferasa terminal incrementada, tal como sucede con los mutantes de la presente invención, pueden ser también obtenidos fácilmente, tal y como se muestra en el Ejemplo 13.

Mutantes de Pol μ y polinucleótidos de la invención

TdT y Pol μ wt son dos enzimas que pertenecen a la familia X de ADN polimerasa que se caracterizan por ser de pequeño tamaño (entre 39 y 66 KDa), siendo ambas en general bastante imprecisas durante la síntesis de ADN. Son enzimas distributivas con poca capacidad para sintetizar más que unas pocas bases antes de disociarse del ADN. Además de pertenecer a la misma familia y tener actividad deoxinucleotidil-transferasa terminal, estas polimerasas presentan un dominio BRCT (Dominio C-terminal de BRCA1), implicado en la interacción proteína-proteína, que no se encuentra presente en otros miembros de la familia X como la polimerasa beta (Pol β). Cuando este dominio es eliminado junto con el resto del extremo amino (NH₂- BRCT-) e incluso con parte del dominio 8 KDa (NH₂- BRCT-KDa-) la actividad TdT de estas enzimas no se ve afectada (ver tabla 2).

El dominio de 8 KDa es también característico de las enzimas de esta familia, encontrándose presente tanto en Pol μ wt como en TdT. Este dominio confiere a estas polimerasas la capacidad de anclaje a los gaps que se producen en el ADN, permitiéndoles realizar de manera efectiva su actividad biológica. Incluso, la distribución de aminoácidos entre los diferentes dominios de estas dos enzimas es bastante similar, tal y como se puede ver en la Tabla 2.

Tabla 2		
Dominio	Polμwt	TdT
BRCT	de 27 a 122	de 32 a 124
8 KDa	de 141 a 231	de 153 a 243
Dedos	de 232 a 288	de 244 a 301
Palma	de 289 a 422	de 302 a 437
<u>Subdominio (Loop-1)</u>	<u>de 367 a 385</u>	<u>de 381 a 400</u>
Pulgar	de 423 a 495	de 438 a 509

A pesar de las claras similitudes estructurales existentes entre ambas proteínas, el grado de identidad que comparten se encuentra en torno al 40% y, por tanto, presentan un gran número de aminoácidos diferentes o no conservados (aproximadamente 300). Mediante alineamiento y comparación de secuencias entre TdT y Pol μ wt, los autores de la presente invención identificaron y seleccionaron un grupo de aminoácidos conservados en Pol μ wt y TdT, pero diferentes entre ambas enzimas. Dichos aminoácidos se reversionaron en Pol μ wt hacia el aminoácido de TdT para así obtener una serie de mutantes simples y dobles con una potencial mejor actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal. Además de estos mutantes puntuales, se generó otro mutante que comprendía una mutación puntual y la sustitución del subdominio loop-1 por el mismo subdominio de TdT (ver Tabla 2). El ensayo de estos mutantes ha ofrecido resultados sorprendentes en cuanto a su actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal, de tal modo que la presente invención aporta una serie de mutantes de Pol μ que presentan una mayor actividad transferasa terminal que Pol μ wt e incluso que la propia TdT.

Así en un primer aspecto de la presente invención, los mutantes de la invención tienen al menos alrededor de un 10% más de actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal que la Pol μ wt, preferentemente que la Pol μ wt humana. Preferentemente, dicha actividad es al menos alrededor de un 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% superior a la de la Pol μ wt. Del mismo modo, los mutantes de la invención también tienen una actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal igual o superior a la del mutante R, preferentemente dicha actividad es al menos alrededor de un 10% superior y, más preferentemente, al menos alrededor de un 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300% superior. Estos mutantes, en combinación o individualmente, son susceptibles de ser empleados como herramientas moleculares, preferentemente, en cualquiera de las técnicas en las que se utiliza TdT, como sustitutivos de ésta o en combinación con la misma. En una realización preferida de este aspecto de la invención los mutantes comprenden al menos dos mutaciones.

En una realización preferida, los mutantes de Pol μ comprenden una secuencia polipeptídica con al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 17 (Pol μ wt: UniProtKB/Swiss-Prot Q9NP87), o con cualquiera de sus subsecuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o con fragmentos de las mismas, donde dichos mutantes comprenden al menos dos mutaciones y mantienen una actividad transferasa terminal incrementada. Preferentemente, dichas mutaciones son (i) una primera mutación puntual en la posición 387 y (ii) una segunda mutación que consiste en:

- a) una mutación puntual en un aminoácido conservado de Pol μ , donde preferentemente dicha mutación puntual consiste en una reversión hacia el aminoácido homólogo presente en TdT, o
- b) una mutación en el subdominio loop-1.

En realizaciones más preferidas el grado de identidad de los mutantes de Pol μ con la secuencia Q9NP87, cualquiera de sus subsecuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o fragmentos de las mismas es alrededor de al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%.

También, preferentemente, la primera mutación puntual (i) de los mutantes de Pol μ consiste en la sustitución del aminoácido que se encuentra en la posición 387 por cualquiera de los aminoácidos seleccionados del grupo que comprende: Glutamina, Asparragina, Cisteína, Treonina, Serina, Metionina, Lisina, Arginina, Histidina o análogos de los mismos, aunque todavía más preferentemente dicha mutación puntual consiste en la sustitución o reversión R387K (mutación no conservativa).

Preferentemente, la segunda mutación (ii) correspondiente a la mutación puntual (a) se localiza en la posición 275. Preferentemente, esta mutación consiste en la sustitución del aminoácido que se encuentra en dicha posición (275) por cualquiera de los aminoácidos seleccionados del grupo que comprende: Glutamina, Asparragina, Cisteína, Treonina, Serina, Metionina o análogos de los mismos, aunque todavía más preferentemente dicha mutación puntual consiste en la sustitución Q275M (mutación conservativa).

ES 2 364 010 A1

En otra realización también preferida, la segunda mutación (ii) consiste en (b) una mutación en el subdominio loop-1, tal como la sustitución o modificación del subdominio loop-1 o fragmentos del mismo por: i) una secuencia con al menos alrededor de un 10% de identidad con la SEQ ID NO: 3 (loop-1 de Pol μ), preferentemente, con al menos alrededor de un 15%, 20%, 25%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o ii) por una secuencia con al menos alrededor de un 10% de identidad con la SEQ ID NO: 4 (loop-1 de TdT), preferentemente, con al menos alrededor de un 15%, 20%, 25%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%. En una realización particular, dicha secuencia es la SEQ ID NO:4, la cual comparte alrededor de un 20% de identidad con la SEQ ID NO:3.

Más específicamente, los mutantes de la invención tienen las secuencias SEQ ID NO:5, que comprende las mutaciones puntuales R387K y Q275M (en adelante, mutante M3), o SEQ ID NO:6, que comprende la mutación puntual R387K y la inserción del loop-1 de TdT en el lugar del loop-1 de Pol μ (en adelante, mutante M7). Del mismo modo, la invención también comprende fragmentos o subsecuencias de las secuencias SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6 que comprendan las referidas mutaciones y, preferentemente, mantengan sustancialmente su actividad deoxinucleotidil-transferasa terminal incrementada. Preferentemente dichos fragmentos tienen las secuencias SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, o SEQ ID NO:10.

De acuerdo con la invención, ésta también proporciona un mutante que comprende una secuencia polipeptídica con al menos un 60% de identidad con la secuencia Q9NP87 (Pol μ wt humana: SEQ ID NO: 17) y al menos una mutación puntual en la posición 275, donde dicho mutante presenta una actividad deoxinucleotidil-transferasa terminal mejorada o incrementada. Esta actividad es al menos alrededor de un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300% superior a la de la Pol μ wt. Preferentemente, dicha mutación en la posición 275 consiste en la sustitución del aminoácido que se encuentra en dicha posición por Glutamina, Asparragina, Cisteína, Treonina, Serina, Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina, Prolina, Fenilalanina y Triptófano, aunque todavía más preferentemente dicha mutación puntual consiste en la sustitución Q275M. Más específicamente, este mutante tiene la secuencia SEQ ID NO:11 (en adelante, mutante M2) o fragmentos de la misma que comprendan la mutación en la posición 275 y, preferentemente, mantengan sustancialmente su actividad transferasa terminal incrementada. Ejemplos de estos fragmentos o subsecuencias son las secuencias SEQ ID NO:12 y la SEQ ID NO: 13.

Un segundo aspecto de la invención proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica cualquiera de los mutantes de la invención. Del mismo modo, también forman parte de la invención: (i) un vector, que comprende cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la invención, y (ii) una célula huésped que comprende cualquiera de las secuencias polinucleotídicas o vectores de la invención.

Más concretamente, la secuencia polinucleotídica de la invención comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, o SEQ ID NO:16, las cuales codifican respectivamente para los mutantes M3, M7 y M2. También forman parte de la invención las subsecuencias o fragmentos de la secuencia polinucleotídica de la invención que codifique para cualquiera de las subsecuencias o fragmentos de los mutantes de la invención. Todas estas secuencias y subsecuencias pueden ser modificadas mediante mutaciones silenciosas (e.g. mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o sustituciones) que no tengan efecto sobre la actividad del mutante en cuestión o no modifiquen su actividad sustancialmente o que, simplemente, debido a la degeneración del código genético, no modifiquen su secuencia y consecuentemente tampoco su actividad. De este modo, también forman parte de la presente invención cualquier secuencia con al menos alrededor de un 40% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO.16 que, preferentemente, no modifique su actividad o no la modifiquen sustancialmente. Preferentemente, dicha identidad es de al menos alrededor de un 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%.

Métodos de producción de los mutantes de Pol μ

Con el objeto de producir los mutantes de la invención, las secuencias polinucleotídicas de la invención son preferentemente incorporadas en un vector que comprende una secuencia promotora o reguladora operativamente relacionada con la secuencia que codifica para el mutante de la invención. De este modo, un tercer aspecto de la invención también se refiere a un método para la producción de los mutantes de la invención que comprende: i) el cultivo de una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos o vectores de la invención y ii) el aislamiento del mutante producido. Preferentemente, el cultivo de la célula es realizado bajo condiciones que promuevan el crecimiento de la célula huésped y/o la expresión del polinucleótido de la invención. Prácticamente cualquier célula huésped que permita la expresión del polinucleótido de la invención puede ser utilizada (e.g., bacterias, levaduras, etc.). Del mismo modo, la invención también comprende la expresión o producción de los mutantes de la invención mediante síntesis química u otros sistemas de expresión *in vitro* libres de células (“*Cell-Free Expression Systems*”) sobradamente conocidos en el estado de la técnica.

Usos de los mutantes Pol μ

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al empleo de los mutantes de la invención como herramienta molecular, preferentemente, en todas aquellas técnicas donde se emplea la TdT. Los mutantes pueden ser empleados en este tipo de técnicas, como sustitutivos de la TdT o en combinación con la misma. Más concretamente, los mutantes de la invención en combinación o individualmente son susceptibles de ser empleados preferentemente en: i) ensayos de mareaje de extremos de polinucleótidos de cadena simple (heteropolímeros u homopolímeros) y cadena doble (extremos protuberantes o romos), ii) reunión de extremos protuberantes y romos, iii) polimerización dependiente o

independiente de molde, iv) rellenado de gaps (*gap-filling*), v) detección de roturas de ADN (*mismatch detection*; e.g. *TUNEL*), vi) mutagénesis, etc.

De este modo, este aspecto proporciona un método para la elongación de un polinucleótido diana que comprende: i) poner en contacto a un polinucleótido diana con el mutante de la invención y nucleótidos o análogos de nucleótidos (mezcla de reacción) y ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de al menos un nucleótido o análogos en el extremo 3'OH del polinucleótido diana. En una realización preferida el número de nucleótidos o análogos de nucleótidos insertado es de al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos y en realizaciones sucesivamente más preferidas entre 1 y 20, 3 y 20, 5 y 20, 1 y 10, 3 y 10, 5 y 10.

La invención también proporciona métodos para el mareaje de polinucleótidos que comprende i) poner en contacto a un polinucleótido diana con el mutante de la invención y nucleótidos o análogos de nucleótidos marcados (mezcla de reacción), ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de al menos un nucleótido o análogo del mismo en el extremo 3'OH del polinucleótido diana, y iii) detectar la presencia o no de inserción. En una realización preferida el número de nucleótidos o análogos de nucleótidos marcados insertado es de al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos y en realizaciones sucesivamente más preferidas entre 1 y 20, 3 y 20, 5 y 20, 1 y 10, 3 y 10, 5 y 10.

Los mutantes de la invención también son susceptibles de ser empleados en métodos o técnicas de *gap filing* que comprenden: i) poner en contacto a un polinucleótido diana, que comprende al menos un *gap* o hueco de al menos un nucleótido, con el mutante de la invención y nucleótidos o análogos de nucleótidos (mezcla de reacción), y ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de al menos un nucleótido o análogo de nucleótido en el extremo 3'OH del *gap*. Adicionalmente, este método comprende iii) detectar si se ha producido o no el rellenado del *gap* y/o iv) la adición de enzimas (e.g. nucleasas, ligasas), que ligen a los nucleótidos o análogos de nucleótidos introducidos en el polinucleótido diana, o hidrolicen al polinucleótido diana. En una realización más preferida el tamaño del *gap* es de al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos y, más preferentemente, entre 1 y 10 nucleótidos. Estas reacciones pueden favorecerse además mediante la presencia de un grupo fosfato en las regiones 5'P del polinucleótido diana.

Debido a que los mutantes de la invención tienen la capacidad de incorporar nucleótidos independientemente de molde son excelentes candidatos para ser empleados en técnicas de reunión de extremos, tanto si estos son protuberantes como si son romos. Así, la invención también proporciona un método para la reunión de extremos de polinucleótidos de doble cadena que comprende: i) poner en contacto a un polinucleótido diana de doble cadena con el mutante de la invención y al menos dos nucleótidos o análogos de nucleótidos complementarios (mezcla de reacción), y ii) poner la mezcla de reacción bajo condiciones que favorezcan la introducción de un número suficiente de nucleótidos o análogos de nucleótido en cada uno de los extremos del polinucleótido diana para que se produzca la reunión. Adicionalmente, este método comprende iii) la adición de enzimas (e.g. ligasas) que ligen los extremos una vez están reunidos. En una realización preferida el número de nucleótidos o análogos de nucleótidos insertado es de al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos y en realizaciones sucesivamente más preferidas entre 1 y 20, 3 y 20, 5 y 20, 1 y 10, 3 y 10, 5 y 10.

Otra de las importantes aplicaciones de la actividad TdT es su uso en los ensayos TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) que permiten la detección de muestras biológicas que están sufriendo apoptosis (*Gavrieli, Y. et al. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell. Biol. 119, 493.501*). Cuando las señales de apoptosis se disparan en la célula se produce un proceso de rotura o fragmentación del ADN. Una polimerasa con actividad deoxinucleotidil transferasa terminal tiene la capacidad de introducir nucleótidos o análogos de nucleótidos en dichas roturas haciendo así visible el proceso apoptótico. Así, la presente invención proporciona un método para la detección de muestras apoptóticas, preferentemente en sus estadios tempranos. Dicho método comprende i) poner en contacto una muestra, que contiene material genético de células potencialmente apoptóticas, con el mutante de la invención y al menos un nucleótido o análogo de nucleótido (mezcla de reacción), ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de nucleótidos o análogos de los mismos, y iii) detectar la presencia o no de inserción, preferentemente mediante fluorescencia, donde la detección de inserción es indicativa de la presencia de material genético fragmentado y, consecuentemente, del comienzo del proceso apoptótico en la muestra. Este mismo método puede emplearse también en técnicas destinadas a comprobar la viabilidad de una muestra biológica, como es el caso de los análisis de esperma en técnicas de reproducción asistida, donde en los espermatozoides con ADN normal sólo se detecta fluorescencia de fondo, mientras que los espermatozoides con ADN fragmentado (múltiples 3'OH terminales) se tiñen con una fluorescencia intensa. La fluorescencia puede detectarse, preferentemente, tanto por citometría de flujo como a través de microscopía fluorescente.

En cualquiera de los métodos mencionados en los que es necesario detectar la presencia o ausencia de inserción de nucleótidos o análogos de los mismos, esta detección se puede hacer por múltiples metodologías sobradamente conocidas en el estado de la técnica, como puede ser la fluorescencia. Preferentemente, las muestras a marcar o detectar son comparadas con muestras control, de tal forma que la muestra problema es considerada positiva cuando presenta al menos alrededor de un 5% más de inserción que la muestra control y en realizaciones sucesivamente más preferidas al menos alrededor de un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en cualquiera de los métodos descritos los mutantes de la invención pueden encontrarse en combinación con TdT o mutantes de la misma, como una forma de mejorar la eficiencia de las técnicas. Incluso varios mutantes de la invención pueden ser combinados con TdT con la misma finalidad. Otra forma

de aumentar la eficiencia de los métodos mencionados comprende la adición de iones, preferentemente Mn^{2+} o Co^{2+} , a las mezclas de reacción, ya que éstos son capaces de aumentar la eficiencia catalítica de los mutantes de la invención.

Kits

5

Un quinto aspecto de la invención se relaciona con kits que incorporan cualquiera de los mutantes de la invención, preferentemente, para llevar a cabo cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. Adicionalmente, además de los componentes necesarios para poner en marcha el correspondiente ensayo (e.g. tampones, cebadores, dNTPs, ddNTPs, hNTPs, análogos de nucleótidos, iones, etc.), los kits pueden también comprender la TdT o mutantes de la misma como una forma de mejorar así la eficiencia de dichos ensayos.

10

El empleo de dichos kits para las aplicaciones previamente mencionadas, por ejemplo, en ensayos de: i) mareaje de extremos de polinucleótidos de cadena simple (heteropolímeros u homopolímeros) y cadena doble (extremos protuberantes o romos), ii) reunión de extremos protuberantes y romos, iii) polimerización dependiente o independiente de molde, iv) rellenado de gaps o huecos (*gap-filling*), v) detección de roturas de ADN (*mismatch detection*; e.g. *TUNEL*), vi) mutagénesis o generación de variabilidad, etc., constituye un aspecto adicional de esta invención.

15

Ejemplo 1

20 *Reacción de transferasa terminal*

Este ensayo muestra la actividad transferasa terminal de cada uno de los mutantes, en comparación con la Pol μ humana wt [SEQ ID NO: 17] y la TdT comercial de Promega (Fig. 1). Se analiza la extensión máxima con cada uno de los 4 dNTPs por separado, sobre un extremo 3'OH de ADN homopolimérico de cadena sencilla (PoliT). En un primer momento, se seleccionaron aquéllos mutantes que produjeron una estimulación llamativa de la actividad transferasa terminal respecto a Pol μ wt, para la realización de ensayos de mareaje del extremo 3'OH del ADN.

25

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado para evaluar la actividad transferasa terminal fue PoliT-Cy5 (PoliT15-CY5), que fue comprado a Sigma. Los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) fueron comprados a GE Healthcare. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM ditioneitol (DTT), 4% glicerol, 0.1 mg/ml seroalbúmina bovina (BSA), 20 nM del oligonucleótido fluorescente indicado en cada caso, 100 μ M del dNTP indicado en cada caso, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso, a excepción de la TdT comercial de Promega (1 unidad). Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

30

40 *Resultados* (ver Figura 1)

- El mutante combinado R387K-F389G (*M1*) tiene muy reducida la actividad transferasa terminal intrínseca de Pol μ wt.
- La mutación Q275M (*M2*) por sí sola parece estimular ligeramente la transferasa terminal respecto a Pol μ wt.
- Los cambios R387K-Q275M (*M3*) y R387K-Chloop1 (*M7*) son los verdaderamente espectaculares, ya que consumen todo el sustrato de partida (lo cual es muy aplicable a mareaje del extremo 3'OH ya que puede suponer una eficiencia de mareaje cercana al 100%) y elongan hasta grandes tamaños (lo cual puede tener aplicación en reacciones de "tailing").
- Los cambios N457D (*M4*), S458N (*M5*) y su combinación también logra estimular la actividad transferasa terminal.

45

50

Las mutaciones puntuales Q275M, N457D, S458N y R387K se corresponden a reversiones (sustituciones) hacia el aminoácido que se encuentra conservado en TdT tal como se puede apreciar en la Figura 13. Las tres primeras mutaciones son mutaciones conservativas, puesto que el aminoácido al que se revierte pertenece al mismo grupo (ver Tabla 1), y en cambio la mutación R387K es no conservativa.

55

60 Ejemplo 2

Prueba comparativa de transferasa terminal entre los dos mutantes dobles de la serie: μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1

Se llevó a cabo una reacción similar a la del Ejemplo 1, pero a dosis decrecientes de polimerasa (400 nM, 200 nM y 100 nM). A 400 nM de proteína se mantuvo la extensión de cerca del 100% del sustrato original de partida. A dosis inferiores de proteína, si bien la actividad transferasa terminal siguió estando fuertemente estimulada, la extensión del sustrato original de partida no fue tan eficaz (Figura 2).

65

ES 2 364 010 A1

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado para evaluar la actividad transferasa terminal fue PoliT-Cy5 (PoliT15-CY5), que fue comprado a Sigma. Los dNTPs fueron comprados a GE Healthcare. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 20 nM del oligonucleótido fluorescente indicado en cada caso, 100 μ M del dNTP indicado en cada caso, y la dosis de proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Ejemplo 3

Ensayo de actividad transferasa terminal de los mutantes dobles (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) en comparación con los mutantes simples de cada uno de ellos

Se analiza la extensión máxima con cada uno de los 4 dNTPs por separado sobre un extremo 3'OH de ADN homopolimérico de cadena sencilla (Poli T). Se determina si las mutaciones sencillas son suficientes por sí solas para estimular la actividad transferasa terminal en la medida en que se ha comprobado, o bien es necesaria la combinación de varias mutaciones para lograr la potente actividad alcanzada en los ensayos anteriores.

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado para evaluar la actividad transferasa terminal fue PoliT-Cy5 (PoliT15-CY5), que fue comprado a Sigma. Los dNTPs fueron comprados a GE Healthcare. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 20 nM del oligonucleótido fluorescente indicado en cada caso, 100 μ M del dNTP indicado en cada caso, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso, a excepción de la TdT comercial de Promega (1 unidad). Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados (ver Figura 3)

- El mutante simple R387K (R) logra un aumento eficaz de la actividad transferasa terminal intrínseca de Pol μ wt, especialmente con dT y dC. Sin embargo dista mucho de llegar a los niveles alcanzados por cualquiera de los mutantes combinados (M3 y M7).
- El mutante simple μ -Chloop1 (*Ch*) logra un cambio en el patrón de inserción de dNTPs respecto a Pol μ wt, pero no supone un estímulo especialmente llamativo de su actividad transferasa terminal.
- El mutante Q275M (M2) logra un cierto estímulo de la actividad transferasa terminal en comparación con Pol μ wt.

La combinación de las dos mutaciones que componen cada mutante seleccionado (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) da lugar a niveles espectaculares de actividad transferasa terminal. Cada una de las mutaciones simples por separado supone una cierta mejora respecto a Pol μ wt en este sentido.

Ejemplo 4

Ensayo de actividad transferasa terminal de los mutantes dobles (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) en comparación con los mutantes simples de cada uno de ellos y en presencia de Co²⁺ como metal activador

En este caso, aunque el patrón de inserción de dNTPs es algo diferente respecto al de Mn²⁺, y en general está menos avanzado, resulta evidente que los mutantes dobles (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) destacan claramente respecto a los mutantes simples en cuanto a actividad transferasa terminal.

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado para evaluar la actividad transferasa terminal fue PoliT-Cy5 (PoliT15-CY5), que fue comprado a Sigma. Los dNTPs fueron comprados a GE Healthcare. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 100 mM de tampón cacodilato (pH 6,8), 1 mM CoCl₂, 0,1 mM DTT, 20 nM del oligonucleótido fluorescente indicado en cada caso, 100 μ M del dNTP indicado en cada caso, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso, a excepción de la TdT comercial de Promega (1 unidad). Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

ES 2 364 010 A1

Resultados (ver Figura 4)

La combinación de las dos mutaciones que componen cada mutante seleccionado (μ -R387K/Q275M y μ -R387K/Chloop1) logra niveles espectaculares de actividad transferasa terminal. Cada una de las mutaciones simples por separado supone una cierta mejora respecto a Pol μ wt en este sentido.

Ejemplo 5

Ensayo de dependencia de molde

Con este ensayo se comprueba si los mutantes dobles han visto afectada su capacidad de polimerización dependiente de molde respecto a Pol μ wt. Resulta conveniente que esta actividad se mantenga dentro de unos determinados niveles, ya que esto permitiría su aplicación en reacciones de mareaje con sustratos de ADN de cadena doble o con molde.

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente SP1C-FLO (GATCACAGTGAGTAC-FLO) fue hibridado con el oligonucleótido T13(G) (AGAAGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC) para generar el sustrato de ADN indicado en la parte superior de la Figura 5. Ambos oligonucleótidos fueron comprados a Sigma. Los dNTPs fueron comprados a GE Healthcare. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 2,5 mM MgCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 nM del híbrido fluorescente de ADN, la dosis de dNTP/dNTPs indicada en cada caso, y 100 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados

Tal y como se aprecia en la parte izquierda de la Figura 5 se suministran los 4 dNTPs, para tratar de comprobar la extensión máxima que puede llevar a cabo la proteína sobre el sustrato de ADN indicado en la parte superior. Únicamente la mutación simple Chloop1 parece producir una pequeña disminución en la elongación, sin que desaparezca la capacidad de polimerización. El mutante M7, que contiene la mutación Chloop1 también se ve afectado en el mismo grado. Los mutantes M2 y M3 incluso parecen mejorar la propia capacidad de elongación de Pol μ wt, lo cual resulta muy positivo.

En la parte derecha de la Figura 5 se lleva a cabo una reacción similar, pero suministrando sólo el nucleótido complementario a la primera posición en el molde. El paso a +1 se realiza de modo muy eficiente con todos los casos.

Ejemplo 6

Ensayo de dependencia de molde

En este ensayo se comprobó la dependencia de molde con los mutantes de dobles (M3 y M7) (ver Figura 6) y los mutantes simples en el contexto de un gap de ADN de 1 nucleótido con fosfato.

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente SP1C-FLO (GATCACAGTGAGTAC-FLO) fue hibridado con el oligonucleótido T13(G) (AGAAGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC) y Dgl-P (AGATACACTTCT-P) para generar el sustrato de ADN indicado en la parte superior de la Figura 6. Los oligonucleótidos fueron comprados a Sigma. El dNTP fue comprado a GE Healthcare. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 2,5 mM MgCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 nM del híbrido fluorescente de ADN, la dosis de dNTP/dNTPs indicada en cada caso, y 100 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados

Tal y como se puede apreciar en la Figura 6, en este tipo de contexto de ADN todos los mutantes muestran una eficiencia de inserción similar.

ES 2 364 010 A1

Ejemplo 7

Prueba de marcaje de extremo 3'OH

5 Se probó la serie completa de mutantes de Pol μ , junto con Pol μ wt y TdT en una reacción de marcaje en el extremo 3'OH de un oligonucleótido de cadena sencilla. Se utilizó como sustrato un oligonucleótido de cadena sencilla marcado con Cy5 en su extremo 5' para su seguimiento. Se suministró ddATP marcado con fluoresceína (FLO) susceptible de ser incorporado por la polimerasa en el extremo 3OH' del ADN. El canal ADN permite realizar el seguimiento del ADN original, y comprobar la proporción de oligo que ha sido marcada (posición +1) frente al resto no marcado (posición 0). El canal del ddNTP permite comprobar la entrada en la posición +1 del ddNTP marcado con FLO.

Materiales y métodos

15 El oligonucleótido fluorescente utilizado fue: SP1C-Cy5 (GATCACAGTGAGTAC-Cy5), que fue comprado a Sigma. El ddATP-Cy5 fue comprado a Perkin-Elmer. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol y 0,1 mg/ml BSA (excepto el canal de TdT, que llevaba 100 mM de tampón cacodilato, 1 mM CoCl₂ y 0,1 mM DTT), 10 nM del oligo fluorescente de ADN, 1 μ M ddATP-FLO, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados

25 Tal y como puede apreciarse en la Figura 7, Pol μ wt es capaz de marcar en torno al 50% del oligo suministrado. Los mutantes M4, M5 y M6 (μ -N457D-S458N) presentan un comportamiento similar. El mutante MI ve muy reducida su capacidad de marcaje respecto a Pol μ wt. El mutante M2 supone una mejora respecto a Pol μ wt aunque no llega a marcar el 100% del sustrato de partida. Los M3 y M7 son capaces de marcar el 100% del sustrato original de partida, superando incluso los niveles logrados con la TdT comercial de Promega.

Ejemplo 8

Prueba de marcaje de extremo 3'OH

35 Ensayo similar al realizado en el Ejemplo 7, en el que se compara la eficacia de los mutantes M3 y M7 en reacciones de marcaje, respecto a las mutaciones simples que componen cada uno de los mutantes.

Materiales y métodos

40 El oligonucleótido fluorescente utilizado fue: SP1C-Cy5 (GATCACAGTGAGTAC-Cy5), que fue comprado a Sigma. El ddATP-Cy5 fue comprado a Perkin-Elmer. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol y 0,1 mg/ml BSA (excepto el canal de TdT, que llevaba 100 mM de tampón cacodilato, 1 mM CoCl₂ y 0,1 mM DTT), 10 nM del oligo fluorescente de ADN, 1 μ M ddATP-FLO, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados (ver Figura 8)

- 50 - Las mutaciones simples R387K (*R*) y Ch-loop-1 (*Ch*) no logran ninguna mejora respecto a Pol μ wt en ese tipo de reacciones.
- 55 - El mutante M2, como ya se vio en la figura 7, sí supone una mejora puesto que es capaz de acabar con casi todo el sustrato de partida, aunque no con el 100%.
- M3 y M7 no logran el marcaje del 100% del sustrato de partida.

Ejemplo 9

Prueba de marcaje de extremo 3'OH

65 Ensayo similar al realizado en el ejemplo 8, en el que se compara la eficacia de los mutantes M3 y M7 en reacciones de marcaje, respecto a las mutaciones simples que componen cada uno de los mutantes. En este caso se utiliza un sustrato de ADN de cadena sencilla diferente (PoliT) para descartar que el resultado sea dependiente de secuencia.

ES 2 364 010 A1

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado fue: PoliT-Cy5 (PoliT 15-Cy5), que fue comprado a Sigma. El ddATP-Cy5 fue comprado a Perkin-Elmer. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol y 0,1 mg/ml BSA (excepto el canal de TdT, que llevaba 100 mM de tampón cacodilato, 1 mM CoCl₂ y 0,1 mM DTT), 10 nM del oligo fluorescente de ADN, 1 μ M ddATP-FLO, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados (ver Figura 9)

- El mutante simple Ch no logra ninguna mejora respecto a Pol μ wt en ese tipo de reacciones.
- El mutante R en este caso particular mejora levemente respecto a Pol μ wt, lo cual puede deberse a un efecto de secuencia.
- El mutante M2, como ya se vio en la figura 8, sí supone una mejora, pero no logra el mareaje del 100% del sustrato de partida, como sí ocurre en los casos de M3 y M7.

Ejemplo 10

Prueba de mareaje de extremo 3'OH

En este ensayo, similar al mostrado en el Ejemplo 9, se compara la eficacia de los mutantes M3 y M7 en reacciones de mareaje, respecto a las mutaciones simples que componen cada uno de los mutantes. En este caso se utiliza un sustrato de ADN de cadena sencilla diferente (PoliA) para contrastar con los anteriores.

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado fue: PoliA-Cy5 (PoliA15-Cy5), que fue comprado a Sigma. El ddATP-Cy5 fue comprado a Perkin-Elmer. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol y 0,1 mg/ml BSA (excepto el canal de TdT, que llevaba 100 mM de tampón cacodilato, 1 mM CoCl₂ y 0,1 mM DTT), 10 nM del oligo fluorescente de ADN, 1 μ M ddATP-FLO, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Resultados (ver Figura 10)

- Los mutantes simples R y Ch no logran ninguna mejora respecto a Pol μ wt en ese tipo de reacciones. Parece confirmarse que el efecto de mejora con R que se veía en la figura anterior era dependiente de secuencia.
- El mutante M2, como ya se vio en ejemplos anteriores, sí supone una mejora, pero no logra el mareaje del 100% del sustrato de partida, como sí ocurre en los casos de M3 y M7.

Ejemplo 11

Prueba de mareaje de extremo 3' con los 4 ddNTPs fluorescentes

Este ensayo muestra que la reacción de mareaje con M3 y M7 es altamente eficaz con los 4 ddNTPs fluorescentes, tanto en presencia de Mn²⁺ como de Co²⁺ (Fig. 11).

Materiales y métodos

El oligonucleótido fluorescente utilizado fue: SP1C-Cy5 (GATCACAGTGAGTAC-Cy5), que fue comprado a Sigma. Los dideoxinucleótidos fluorescentes (ddATP-FLO, ddUTP-FLO, ddCTP-FLO, ddGTP-FLO) fueron comprados a Perkin-Elmer. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de 1 mM MnCl₂, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% glicerol y 0,1 mg/ml BSA (en el caso de reacciones con 1 mM Mn²⁺) y 100 mM de tampón cacodilato, 1 mM CoCl₂ y 0,1 mM DTT (en el caso de reacciones con 1 mM Co²⁺), 10 nM del oligo fluorescente de ADN, 1 μ M ddATP-FLO, y 600 nM de la proteína indicada en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C, las reacciones se pararon añadiendo 5,6 μ l de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA). Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior lectura de señal fluorescente utilizando un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Ejemplo 12

Obtención de nuevos mutantes homólogos

5 Tal y como se muestra en la Figura 12, el alineamiento por FASTA, empleando los parámetros establecidos por defecto, de las secuencias correspondientes a las Pol μ wt de diferentes mamíferos, más concretamente, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Bos taurus* con el mutante M3, proporciona aquellos aminoácidos homólogos al 275 y 387 de M3 (o Pol μ wt humana).

10 La mutación de los aminoácidos homólogos de la Pol μ wt de *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Bos taurus* correspondientes a las posiciones 275 y 387 de M3, daría lugar a la obtención de nuevos mutantes, que potencialmente tendrían la actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal mejorada debido al elevado grado de identidad existente entre las diferentes polimerasas (Tabla 3). Tal y como se puede comprobar a partir de la Figura 12, los aminoácidos homólogos no necesariamente se encuentran en la misma posición en relación con su secuencia.

TABLA 3

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Bos Taurus</i>
<i>Homo sapiens</i>	100 %	76,06 %	75,81 %	80,81 %
<i>Mus musculus</i>	76,06 %	100 %	87,93 %	72,64 %
<i>Rattus norvegicus</i>	75,81 %	87,93 %	100 %	71,98 %
<i>Bos taurus</i>	80,81 %	72,64 %	71,98 %	100 %

Ejemplo 13

Obtención de nuevos mutantes con actividad transferasa terminal incrementada

35 Los datos estructurales de Pol μ wt utilizados convenientemente pueden ser empleados para la obtención de nuevos mutantes con actividad transferasa terminal incrementada, mediante la identificación y mutación de aminoácidos que se encuentren en el sitio catalítico de la enzima o cercanos a éste, preferentemente en superficie, esto es, en interacción directa con el ADN. Así por ejemplo, el análisis tridimensional de la estructura de la polimerasa puede dar lugar a la identificación de residuos que permitan la creación de un puente salino, la introducción de un grupo hidrofóbico o la creación de cualquier otro tipo de interacción que posibilite una mejor interacción con el ADN con el objetivo de obtener mutantes con actividad transferasa terminal incrementada.

45 Para la identificación de los aminoácidos candidatos son sobradamente conocidas determinadas técnicas de laboratorio, como por ejemplo la cristalografía por rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN), que permiten conocer la estructura tridimensional de las proteínas. Además de este tipo de técnicas, existen multitud de programas informáticos que posibilitan, a partir de la estructura primaria de la enzima, predecir cual es su configuración espacial (e.g. Swiss PDB Viewer). De este modo, resulta sencillo mediante la inspección visual de las estructuras determinar qué aminoácidos pueden ser candidatos para su mutación.

50 El empleo de este tipo de técnicas en combinación con la comparación de las estructuras primarias de enzimas homólogas y/o con actividades similares permite incluso afinar aún más en la selección de aquellos mutantes que potencialmente van a tener una actividad incrementada.

55 A modo de ejemplo, la recopilación de todas las secuencias conocidas de Pol μ y TdT de diferentes especies, su alineamiento y comparación de la estructura primaria permite la identificación de aquellos aminoácidos que se encuentran conservados en ambas familias de polimerasas y que sean diferentes entre sí. Cuando se realiza este proceso, algunos de los aminoácidos candidatos de Pol μ que podrían seleccionarse son los Q275, R387, N457 y S458, los cuales tras un análisis visual de la estructura tridimensional de la enzima se comprueba que se encuentran en superficie y cercanos al centro catalítico (Figura 14). La mutación de estos aminoácidos hacia el aminoácido homólogo de TdT (Q275M, R387K, N457D y S458N) y, opcionalmente, la combinación de estas mutaciones da lugar a la obtención de mutantes de Pol μ con una actividad transferasa terminal incrementada, tal y como se puede comprobar a lo largo de la descripción.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. ADN polimerasa mu ($Pol\mu$) mutada que presenta una actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal al menos alrededor de un 10% superior a la actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal de la ADN polimerasa mu mutada R387K.
2. ADN polimerasa mu mutada según la reivindicación 1, que comprende al menos dos mutaciones.
- 10 3. ADN polimerasa mu mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende una secuencia con al menos un 60% de identidad con la SEQ ID NO: 17, o con cualquiera de sus subsecuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o con un fragmento de cualquiera de dichas secuencias que mantiene la actividad transferasa terminal incrementada o sustancialmente incrementada.
- 15 4. ADN polimerasa mu mutada según la reivindicación 3, que comprende al menos dos mutaciones que consisten en (i) una primera mutación puntual en la posición 387 y (ii) una segunda mutación que consiste en:
- (a) una mutación puntual en un aminoácido conservado de $Pol\mu$ wt y distinto al aminoácido homólogo presente en la enzima TdT, o
- 20 (b) una mutación en el subdominio loop-1 de $Pol\mu$.
5. ADN polimerasa mu mutada según la reivindicación 4, donde la primera mutación puntual (i) en la posición 387 consiste en la sustitución del aminoácido que se encuentra dicha posición por cualquiera de los aminoácidos seleccionados del siguiente grupo: Glutamina, Asparragina, Cisteína, Treonina, Serina, Metionina, Lisina, Arginina, Histidina o análogos de los mismos.
- 25 6. ADN polimerasa mu mutada según la reivindicación 5, donde la segunda mutación puntual (a) es una mutación puntual en el aminoácido que se encuentra en la la posición 275 y consiste en la sustitución del aminoácido que se encuentra en dicha posición por cualquiera de los aminoácidos seleccionados del siguiente grupo: Glutamina, Asparragina, Cisteína, Treonina, Serina, Metionina o análogos de los mismos.
- 30 7. ADN polimerasa mu mutada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la segunda mutación (b) consiste en la delección y sustitución del loop-1 de $Pol\mu$ o de un fragmento del mismo por:
- 35 i) una secuencia con al menos alrededor de un 10% de identidad con la SEQ ID NO: 3 (loop-1 de $Pol\mu$), o
- ii) por una secuencia con al menos alrededor de un 10% de identidad con la SEQ ID NO: 4 (loop-1 de TdT).
- 40 8. ADN polimerasa mutada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya secuencia es seleccionada el grupo formado por SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, fragmentos o subsecuencias de las mismas que mantengan sustancialmente su actividad transferasa terminal.
9. Polinucleótido que codifica una ADN polimerasa mu mutada, o un fragmento o subsecuencia de la misma, de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 10. Polinucleótido según la reivindicación 9, donde su secuencia es seleccionada del grupo que comprende las secuencias SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.
- 50 11. Vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10.
12. Célula huésped que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, o un vector según la reivindicación 11.
- 55 13. Método para la producción de una ADN polimerasa mu mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende: i) el cultivo de una célula huésped según la reivindicación 12 bajo condiciones que promuevan la expresión del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, y ii) el aislamiento del mutante producido.
- 60 14. Método para la elongación de un polinucleótido diana que comprende: i) poner en contacto al polinucleótido diana con la ADN polimerasa mu mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y nucleótidos o análogos de nucleótidos (mezcla de reacción), y ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de al menos un nucleótido o un análogo del mismo en el extremo 3'OH del polinucleótido diana.
- 65 15. Método para el rellenado de huecos que comprende: i) poner en contacto a un polinucleótido diana, que comprende al menos un gap o hueco de al menos un nucleótido, con la ADN polimerasa mu mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y nucleótidos o análogos de nucleótidos (mezcla de reacción), y ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de al menos un nucleótido o análogo de nucleótido en el extremo 3'OH de *gap*.

ES 2 364 010 A1

16. Método para la detección de muestras apoptóticas que comprende: i) poner en contacto una muestra, que contiene material genético de células potencialmente apoptóticas, con la ADN polimerasa mu mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un nucleótido o análogo de nucleótido (mezcla de reacción), ii) someter la mezcla de reacción a condiciones que favorezcan la inserción de nucleótidos o análogos de los mismos, y iii) detectar la presencia o no de inserción, donde la detección de inserción es indicativa de que la muestra es apoptótica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

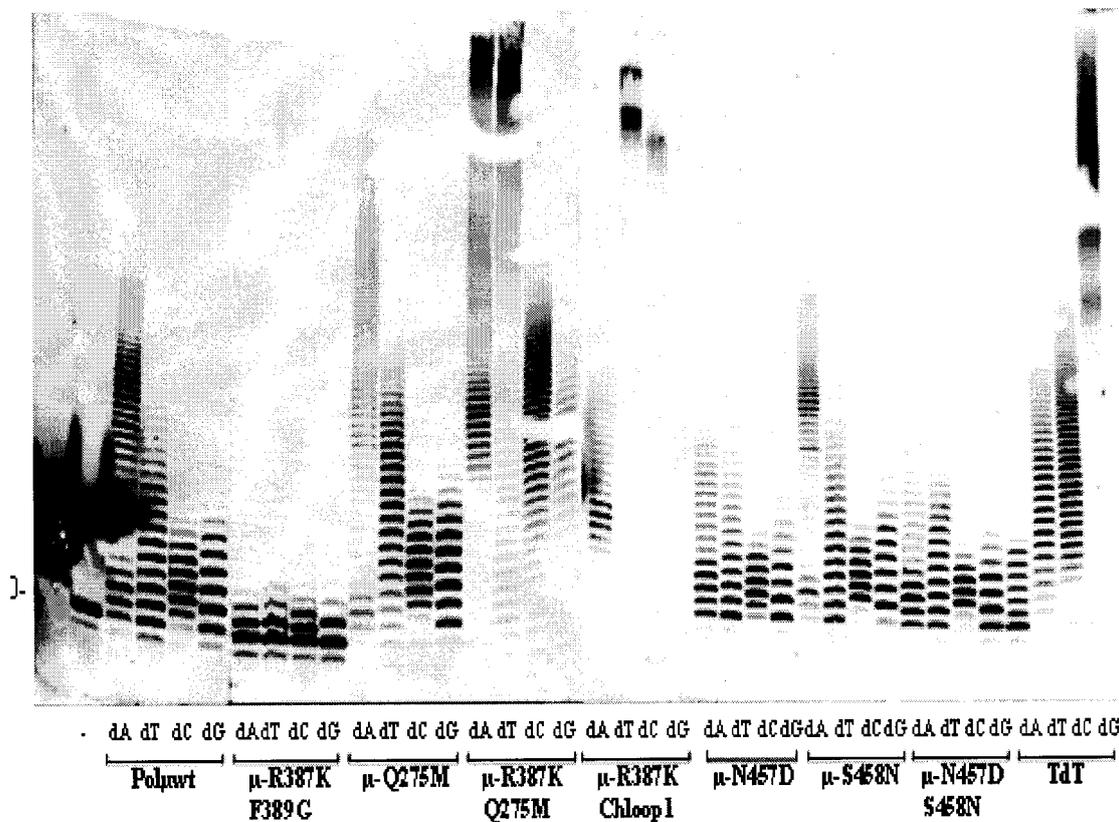


FIG. 2

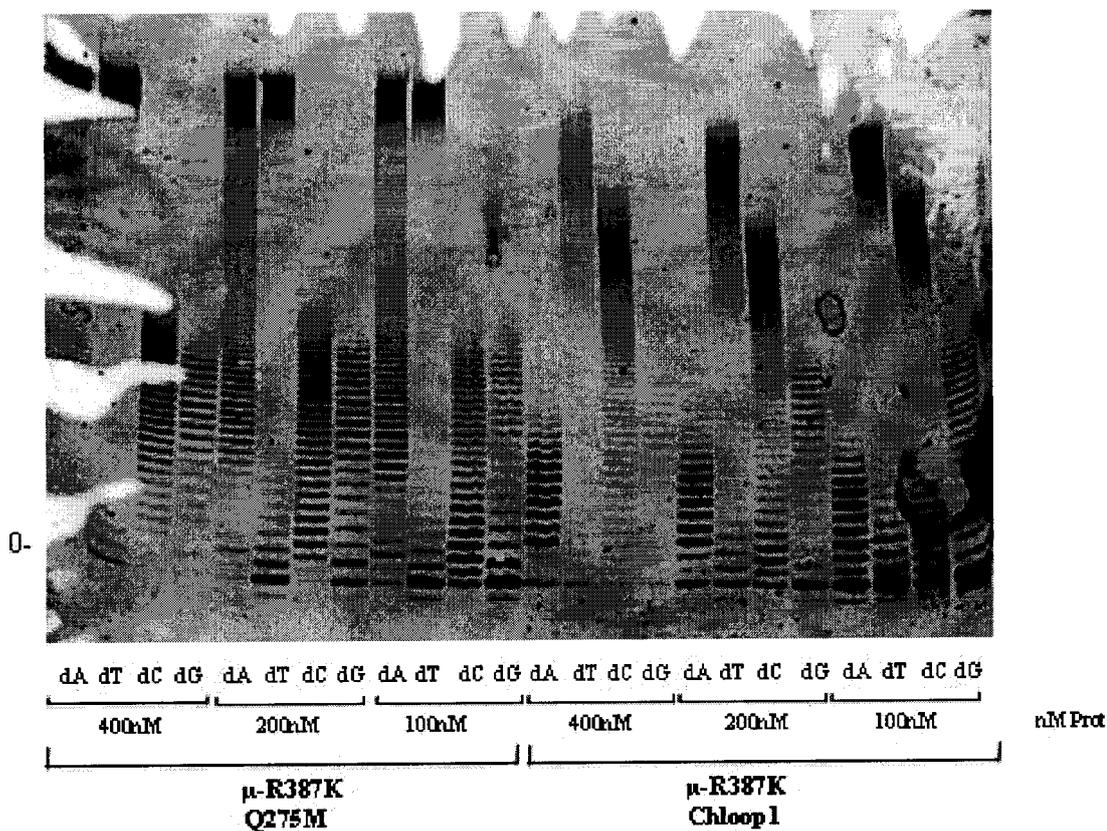


FIG.3

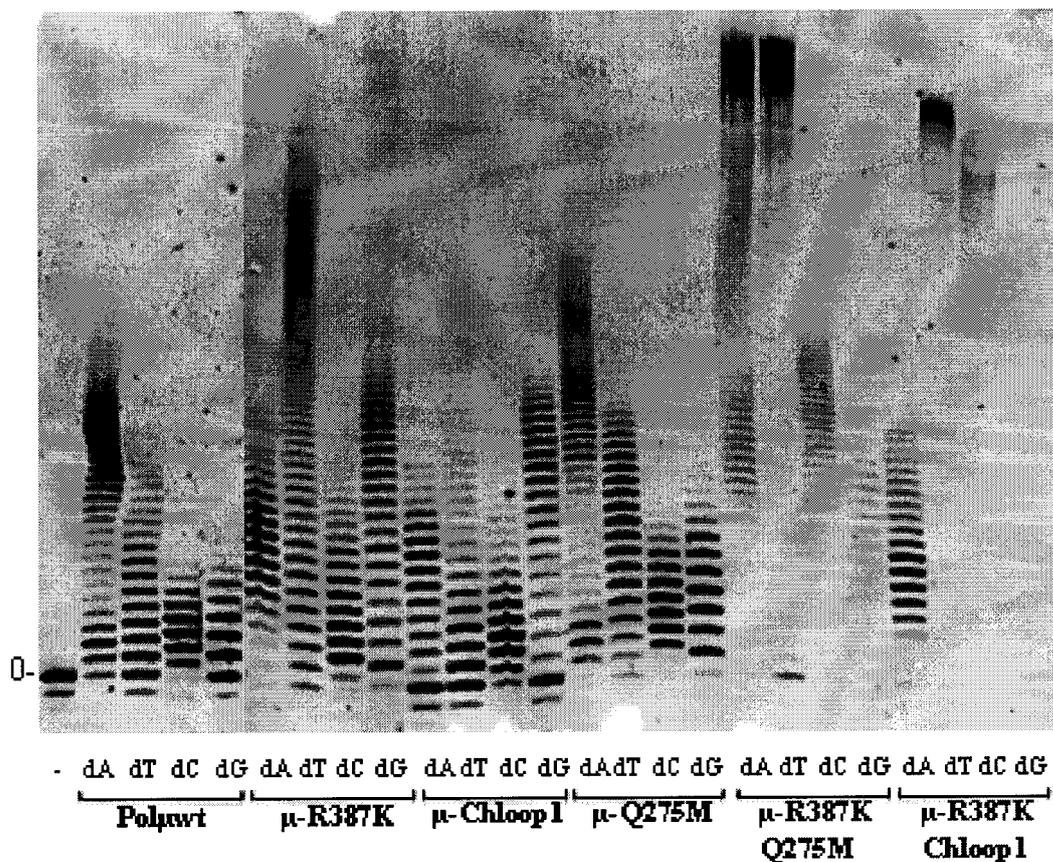


FIG.4

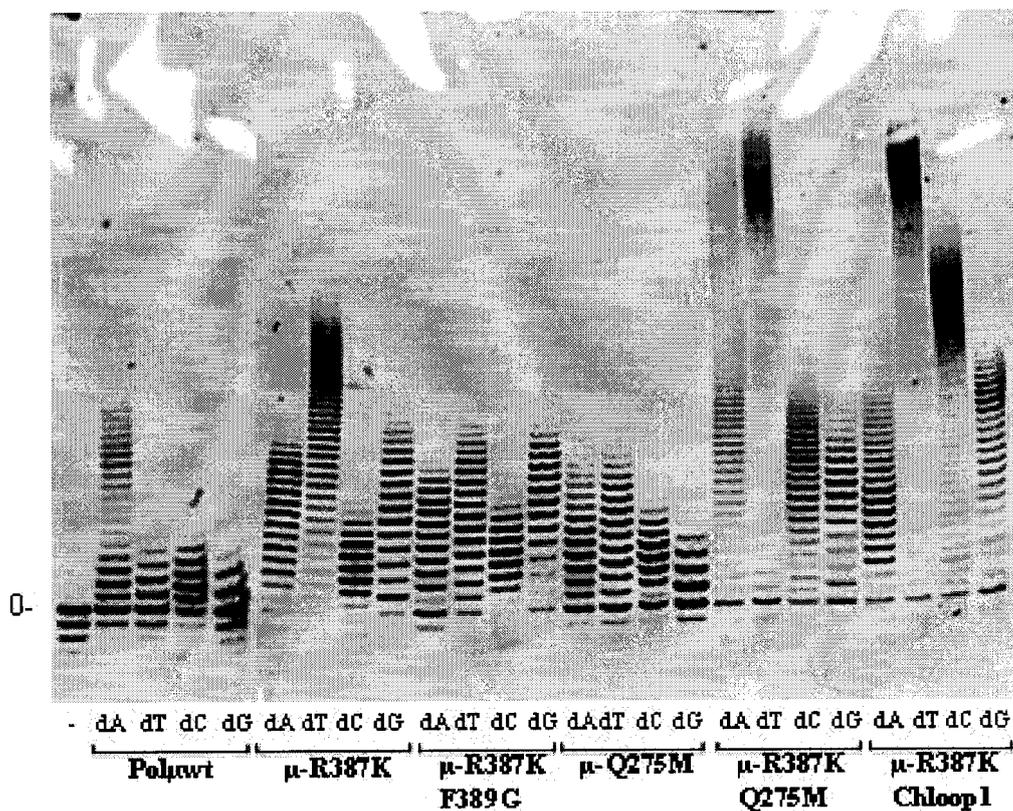


FIG.5

3'CTAGTGTCACTCATGGTCTATGTGAAGA-5'
 FLO-5'GATCACAGTGAGTAC

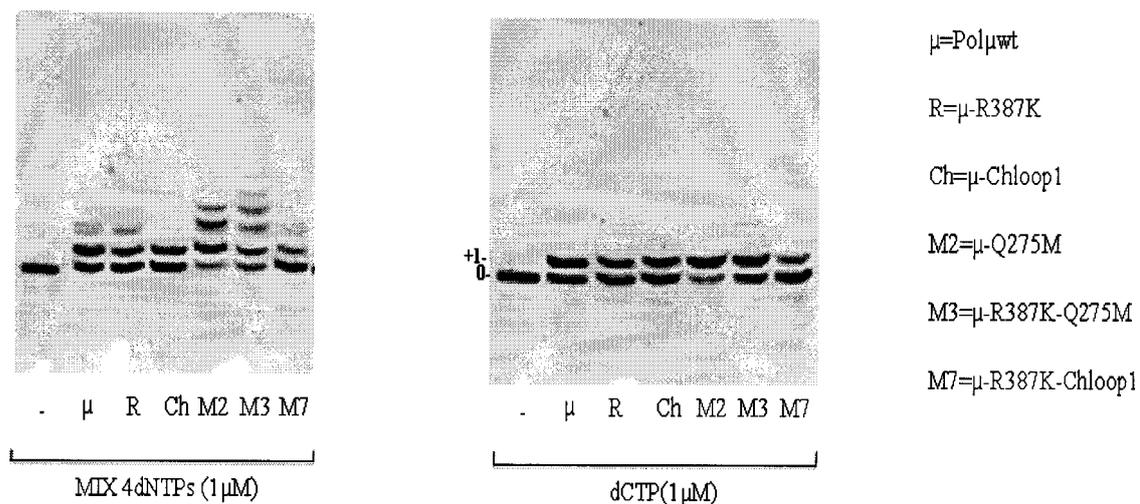


FIG.6

3'CTAGTGTCACTCATGGTCTATGTGAAGA-5'
 FLO-5'GATCACAGTGAGTAC AGATACTTCT-3'
 (P)

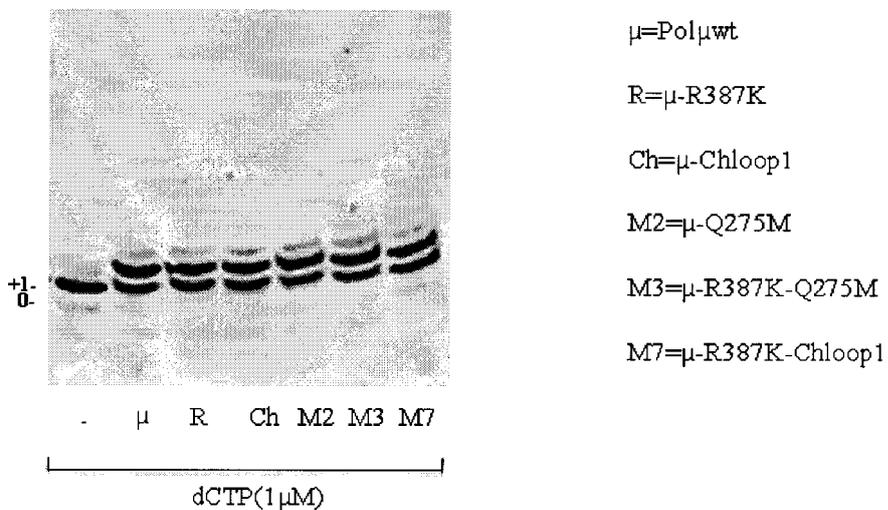


FIG. 7

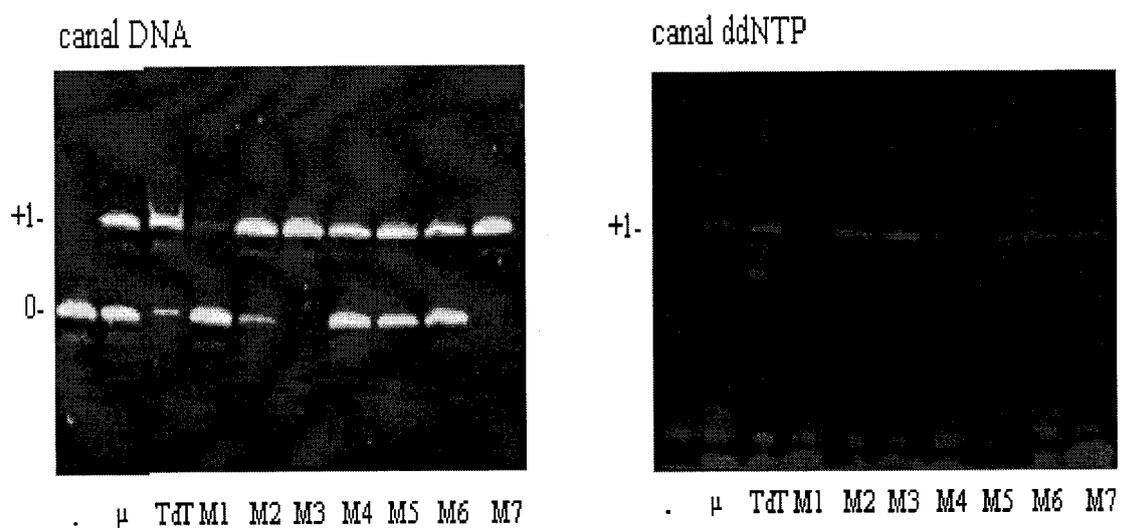


FIG. 8

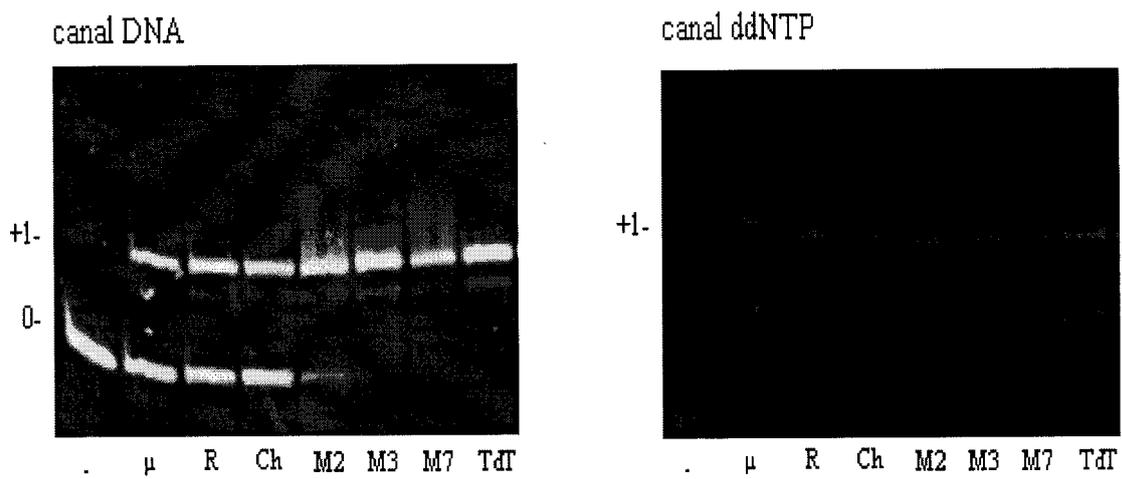


FIG. 9

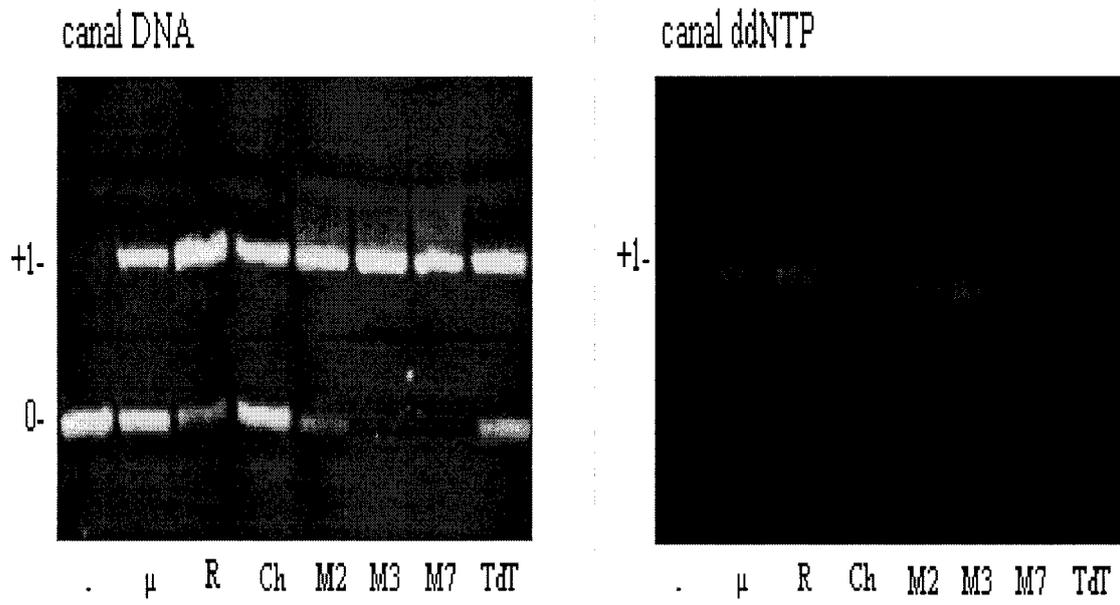


FIG. 10

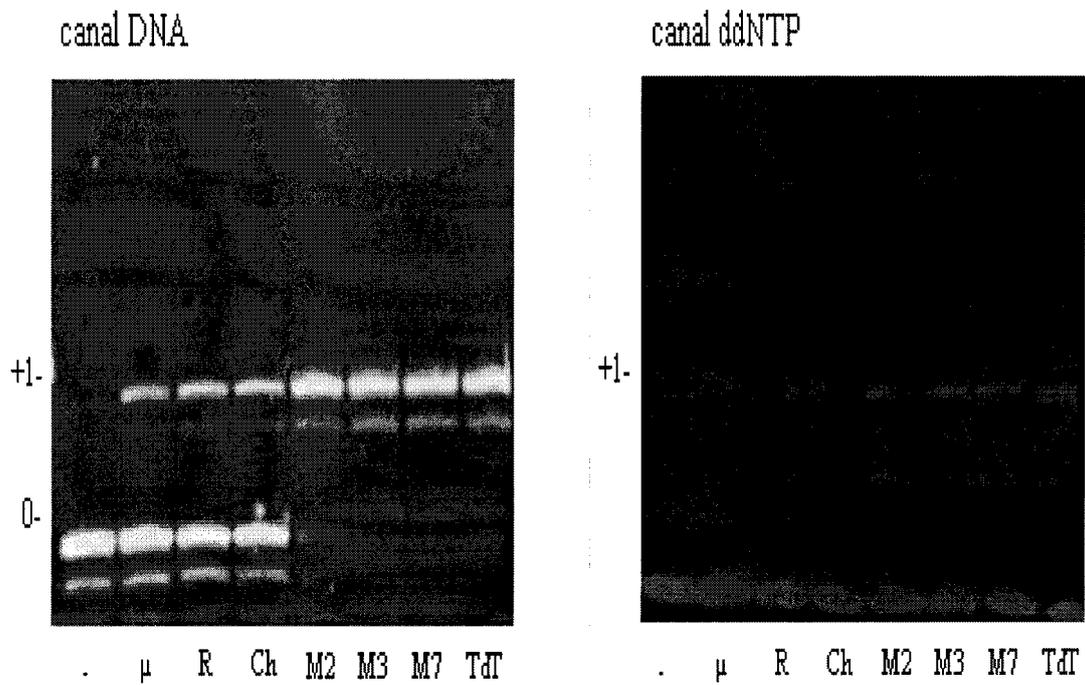


FIG. 11

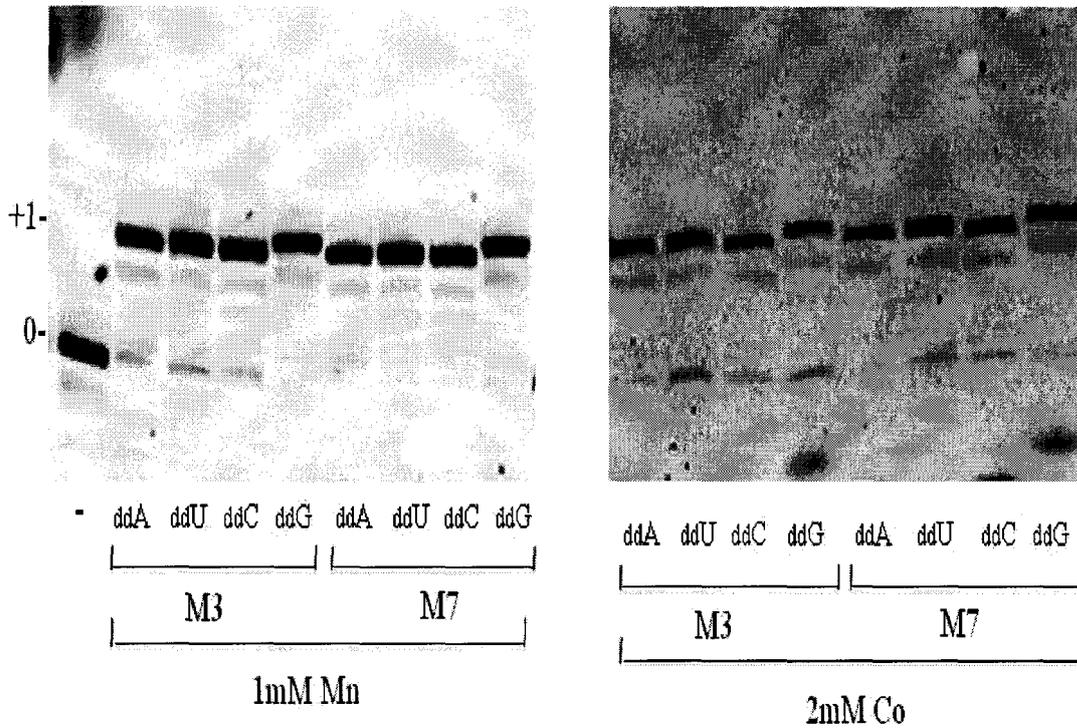


FIG.12

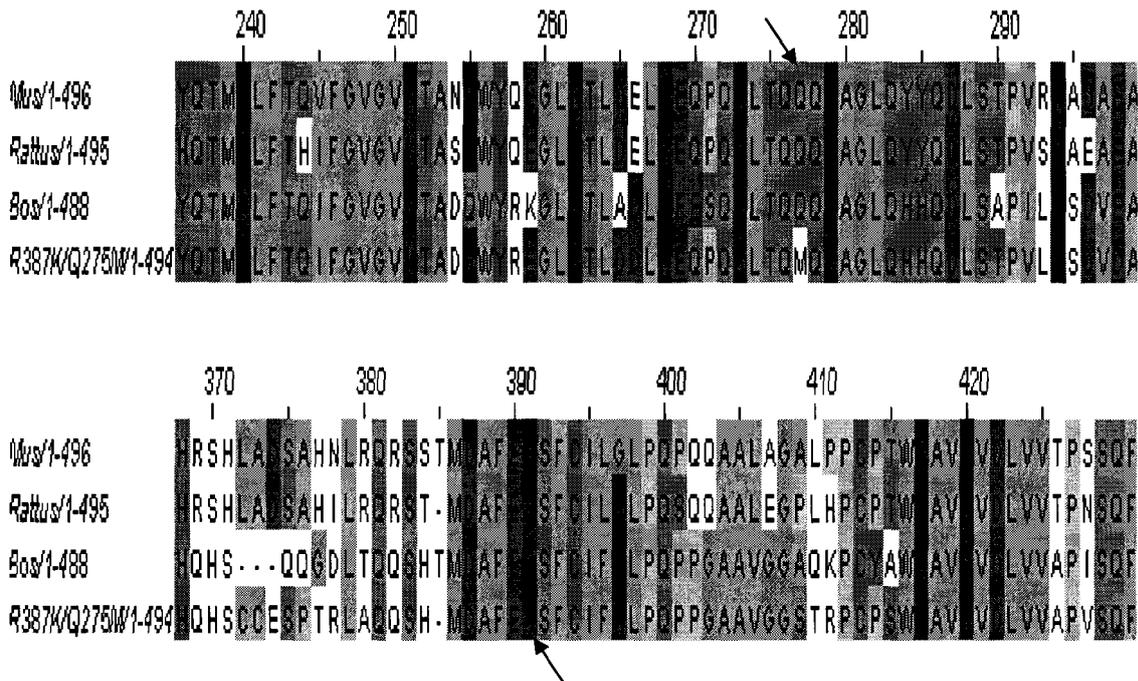


FIG. 13

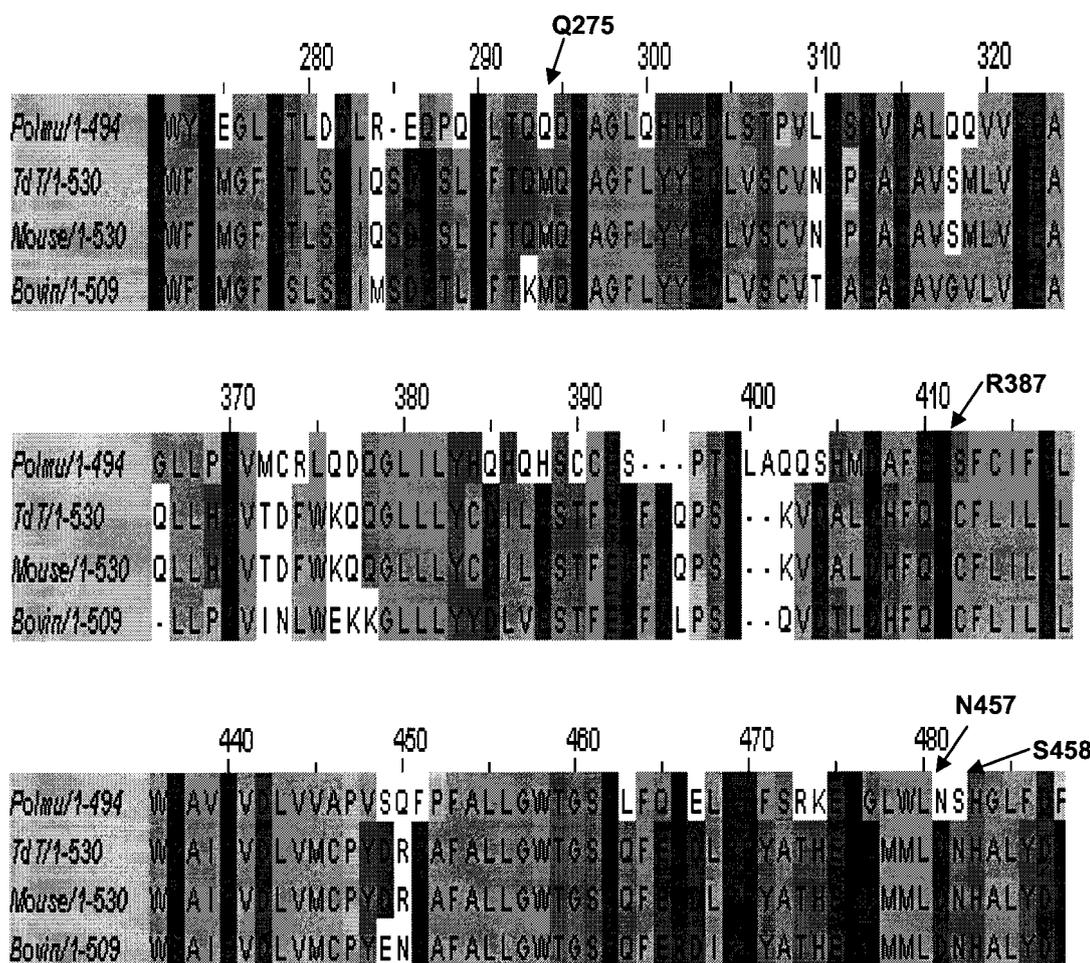
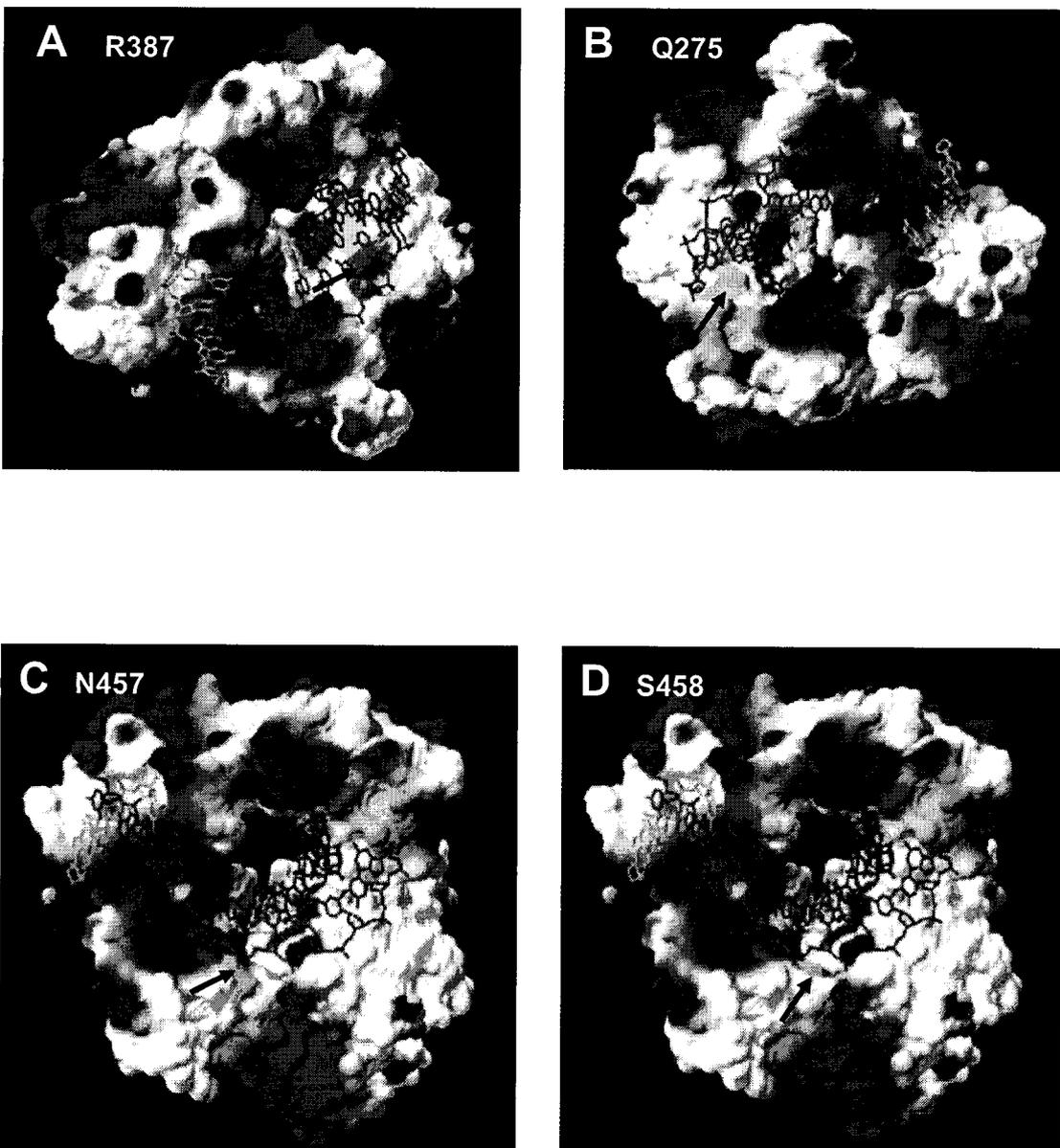


FIG. 14



ES 2 364 010 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> XPOL Biotech, S.L.

5 <120> Mutantes de la ADN polimerasa mu

<130> P5299ES00 - XPOL-01

10 <160> 17

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 373

<212> PRT

20 <213> *Homo Sapiens* (Pol mu NH2- BRCT-)

<400> 1

25 Met Leu Glu Val Ala Gly Pro Arg Lys Gly Pro Leu Ser Pro Ala Trp
1 5 10 15

30 Met Pro Ala Tyr Ala Cys Gln Arg Pro Thr Pro Leu Thr His His Asn
20 25 30

35 Thr Gly Leu Ser Glu Ala Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Ala Gly Phe
35 40 45

40 Glu Gly Ser Glu Gly Arg Leu Leu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Ser Val
50 55 60

45 Leu Lys Ala Leu Pro Ser Pro Val Thr Thr Leu Ser Gln Leu Gln Gly
65 70 75 80

50 Leu Pro His Phe Gly Glu His Ser Ser Arg Val Val Gln Glu Leu Leu
85 90 95

55 Glu His Gly Val Cys Glu Glu Val Glu Arg Val Arg Arg Ser Glu Arg
100 105 110

60 Tyr Gln Thr Met Lys Leu Phe Thr Gln Ile Phe Gly Val Gly Val Lys
115 120 125

65 Thr Ala Asp Arg Trp Tyr Arg Glu Gly Leu Arg Thr Leu Asp Asp Leu
130 135 140

Arg Glu Gln Pro Gln Lys Leu Thr Gln Gln Gln Lys Ala Gly Leu Gln
145 150 155 160

His His Gln Asp Leu Ser Thr Pro Val Leu Arg Ser Asp Val Asp Ala
165 170 175

ES 2 364 010 A1

<400> 2

5	Met	Pro	Ala	Tyr	Ala	Cys	Gln	Arg	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	His	His	Asn
	1				5					10					15	
10	Thr	Gly	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Phe
				20					25					30		
15	Glu	Gly	Ser	Glu	Gly	Arg	Leu	Leu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala	Ala	Ser	Val
			35					40					45			
20	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Gly
		50					55					60				
25	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Glu	His	Ser	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Leu	Leu
	65				70						75					80
30	Glu	His	Gly	Val	Cys	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg
					85					90					95	
35	Tyr	Gln	Thr	Met	Lys	Leu	Phe	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Val	Gly	Val	Lys
				100					105					110		
40	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu
			115					120					125			
45	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu	Thr	Gln	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln
		130				135						140				
50	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	Ala
	145					150					155					160
55	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala
					165					170					175	
60	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His
				180					185					190		
65	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly
			195					200					205			
70	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu
		210				215						220				
75	Tyr	His	Gln	His	Gln	His	Ser	Cys	Cys	Glu	Ser	Pro	Thr	Arg	Leu	Ala
	225					230					235					240

ES 2 364 010 A1

<210> 5

<211> 494

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens* (Pol mu, mutante M3)

<400> 5

```

10      Met Leu Pro Lys Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly Ser Pro Ser Gly Asp
      1          5          10          15
15      Ala Ala Ser Ser Thr Pro Pro Ser Thr Arg Phe Pro Gly Val Ala Ile
      20          25          30
20      Tyr Leu Val Glu Pro Arg Met Gly Arg Ser Arg Arg Ala Phe Leu Thr
      35          40          45
25      Gly Leu Ala Arg Ser Lys Gly Phe Arg Val Leu Asp Ala Cys Ser Ser
      50          55          60
30      Glu Ala Thr His Val Val Met Glu Glu Thr Ser Ala Glu Glu Ala Val
      65          70          75          80
35      Ser Trp Gln Glu Arg Arg Met Ala Ala Ala Pro Pro Gly Cys Thr Pro
      85          90          95
40      Pro Ala Leu Leu Asp Ile Ser Trp Leu Thr Glu Ser Leu Gly Ala Gly
      100          105          110
45      Gln Pro Val Pro Val Glu Cys Arg His Arg Leu Glu Val Ala Gly Pro
      115          120          125
50      Arg Lys Gly Pro Leu Ser Pro Ala Trp Met Pro Ala Tyr Ala Cys Gln
      130          135          140
55      Arg Pro Thr Pro Leu Thr His His Asn Thr Gly Leu Ser Glu Ala Leu
      145          150          155          160
60      Glu Ile Leu Ala Glu Ala Ala Gly Phe Glu Gly Ser Glu Gly Arg Leu
      165          170          175
65      Leu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Ser Val Leu Lys Ala Leu Pro Ser Pro
      180          185          190
70      Val Thr Thr Leu Ser Gln Leu Gln Gly Leu Pro His Phe Gly Glu His
      195          200          205

```

ES 2 364 010 A1

	Ser	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	His	Gly	Val	Cys	Glu	Glu
	210					215						220				
5	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	Tyr	Gln	Thr	Met	Lys	Leu	Phe
	225					230					235					240
10	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Val	Gly	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg
					245					250					255	
15	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu
				260					265					270		
20	Thr	Gln	Met	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr
			275					280					285			
25	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu
	290						295					300				
30	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly
	305					310					315					320
35	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr
					325					330					335	
40	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys
				340					345					350		
45	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	His	Gln	His	Ser
			355					360						365		
50	Cys	Cys	Glu	Ser	Pro	Thr	Arg	Leu	Ala	Gln	Gln	Ser	His	Met	Asp	Ala
	370						375					380				
55	Phe	Glu	Lys	Ser	Phe	Cys	Ile	Phe	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala
	385					390					395					400
60	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Pro	Cys	Pro	Ser	Trp	Lys	Ala	Val	Arg
					405					410					415	
65	Val	Asp	Leu	Val	Val	Ala	Pro	Val	Ser	Gln	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu
			420						425					430		
70	Gly	Trp	Thr	Gly	Ser	Lys	Leu	Phe	Gln	Arg	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser
			435					440					445			

ES 2 364 010 A1

	Leu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro
				180					185					190		
5	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Glu	His
			195					200					205			
10	Ser	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	His	Gly	Val	Cys	Glu	Glu
	210						215					220				
15	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	Tyr	Gln	Thr	Met	Lys	Leu	Phe
	225					230					235					240
20	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Val	Gly	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg
				245						250					255	
25	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu
				260					265					270		
30	Thr	Gln	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr
			275					280					285			
35	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu
		290					295					300				
40	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly
	305					310					315					320
45	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr
					325					330					335	
50	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys
				340					345					350		
55	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	Glu	Ser	Thr	Phe
			355					360					365			
60	Glu	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Arg	Lys	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	His	Phe
		370					375					380				
65	Glu	Lys	Ser	Phe	Cys	Ile	Phe	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala
	385					390					395					400
70	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Pro	Cys	Pro	Ser	Trp	Lys	Ala	Val	Arg	Val
					405						410				415	

ES 2 364 010 A1

	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp
	130						135					140				
5	Asp	Leu	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu	Thr	Gln	Met	Gln	Lys	Ala	Gly
	145					150					155					160
10	Leu	Gln	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val
					165					170					175	
15	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro
				180					185					190		
20	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln
			195					200					205			
25	Gly	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu
	210						215					220				
30	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu
	225					230					235					240
35	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	His	Gln	His	Ser	Cys	Cys	Glu	Ser	Pro	Thr	Arg
				245						250					255	
40	Leu	Ala	Gln	Gln	Ser	His	Met	Asp	Ala	Phe	Glu	Lys	Ser	Phe	Cys	Ile
				260					265					270		
45	Phe	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg
			275					280					285			
50	Pro	Cys	Pro	Ser	Trp	Lys	Ala	Val	Arg	Val	Asp	Leu	Val	Val	Ala	Pro
	290						295					300				
55	Val	Ser	Gln	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu	Gly	Trp	Thr	Gly	Ser	Lys	Leu
	305					310					315					320
60	Phe	Gln	Arg	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser	Arg	Lys	Glu	Lys	Gly	Leu	Trp
				325						330					335	
65	Leu	Asn	Ser	His	Gly	Leu	Phe	Asp	Pro	Glu	Gln	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln
				340					345					350		
70	Ala	Ala	Ser	Glu	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Tyr	Leu
			355					360					365			

ES 2 364 010 A1

Pro Pro Glu Gln Arg Asn Ala
370 375

<210> 8

5 <211> 357

<212> PRT

<213> *Homo sapiens* (M3: NH2- BRCT- 8 KDa-)

10 <400> 8

Met Pro Ala Tyr Ala Cys Gln Arg Pro Thr Pro Leu Thr His His Asn
1 5 10 15

15

Thr Gly Leu Ser Glu Ala Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Ala Gly Phe
20 25 30

20

Glu Gly Ser Glu Gly Arg Leu Leu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Ser Val
35 40 45

25

Leu Lys Ala Leu Pro Ser Pro Val Thr Thr Leu Ser Gln Leu Gln Gly
50 55 60

30

Leu Pro His Phe Gly Glu His Ser Ser Arg Val Val Gln Glu Leu Leu
65 70 75 80

35

Glu His Gly Val Cys Glu Glu Val Glu Arg Val Arg Arg Ser Glu Arg
85 90 95

40

Tyr Gln Thr Met Lys Leu Phe Thr Gln Ile Phe Gly Val Gly Val Lys
100 105 110

45

Thr Ala Asp Arg Trp Tyr Arg Glu Gly Leu Arg Thr Leu Asp Asp Leu
115 120 125

50

Arg Glu Gln Pro Gln Lys Leu Thr Gln Met Gln Lys Ala Gly Leu Gln
130 135 140

55

His His Gln Asp Leu Ser Thr Pro Val Leu Arg Ser Asp Val Asp Ala
145 150 155 160

60

Leu Gln Gln Val Val Glu Glu Ala Val Gly Gln Ala Leu Pro Gly Ala
165 170 175

65

Thr Val Thr Leu Thr Gly Gly Phe Arg Arg Gly Lys Leu Gln Gly His
180 185 190

Asp Val Asp Phe Leu Ile Thr His Pro Lys Glu Gly Gln Glu Ala Gly
195 200 205

ES 2 364 010 A1

Leu Leu Pro Arg Val Met Cys Arg Leu Gln Asp Gln Gly Leu Ile Leu
 210 215 220

5
 Tyr His Gln His Gln His Ser Cys Cys Glu Ser Pro Thr Arg Leu Ala
 225 230 235 240

10
 Gln Gln Ser His Met Asp Ala Phe Glu Lys Ser Phe Cys Ile Phe Arg
 245 250 255

15
 Leu Pro Gln Pro Pro Gly Ala Ala Val Gly Gly Ser Thr Arg Pro Cys
 260 265 270

20
 Pro Ser Trp Lys Ala Val Arg Val Asp Leu Val Val Ala Pro Val Ser
 275 280 285

25
 Gln Phe Pro Phe Ala Leu Leu Gly Trp Thr Gly Ser Lys Leu Phe Gln
 290 295 300

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

35
 Ser His Gly Leu Phe Asp Pro Glu Gln Lys Thr Phe Phe Gln Ala Ala
 325 330 335

40
 Ser Glu Glu Asp Ile Phe Arg His Leu Gly Leu Glu Tyr Leu Pro Pro
 340 345 350

45
 Glu Gln Arg Asn Ala
 355

45 <210> 9
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens* (M7: NH2- BRCT-)

50
 <400> 9

55
 Met His Arg Leu Glu Val Ala Gly Pro Arg Lys Gly Pro Leu Ser Pro
 1 5 10 15

60
 Ala Trp Met Pro Ala Tyr Ala Cys Gln Arg Pro Thr Pro Leu Thr His
 20 25 30

65
 His Asn Thr Gly Leu Ser Glu Ala Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Ala
 35 40 45

ES 2 364 010 A1

	Gly	Phe	Glu	Gly	Ser	Glu	Gly	Arg	Leu	Leu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala	Ala
	50						55					60				
5	Ser	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu
	65					70					75					80
10	Gln	Gly	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Glu	His	Ser	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Glu
					85					90					95	
15	Leu	Leu	Glu	His	Gly	Val	Cys	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Arg	Ser
				100						105				110		
20	Glu	Arg	Tyr	Gln	Thr	Met	Lys	Leu	Phe	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Val	Gly
			115					120					125			
25	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp
		130					135					140				
30	Asp	Leu	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu	Thr	Gln	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly
	145					150					155					160
35	Leu	Gln	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val
					165					170					175	
40	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro
				180						185				190		
45	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln
			195					200					205			
50	Gly	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu
	210						215					220				
55	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu
	225					230					235					240
60	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	Glu	Ser	Thr	Phe	Glu	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser
				245						250					255	
65	Arg	Lys	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	His	Phe	Glu	Lys	Ser	Phe	Cys	Ile	Phe
			260						265					270		
70	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Pro
			275					280					285			

ES 2 364 010 A1

	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu	Thr	Gln	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln
	130						135					140				
5	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	Ala
	145					150					155					160
10	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala
				165						170					175	
15	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His
				180					185					190		
20	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly
			195					200					205			
25	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu
	210						215					220				
30	Tyr	His	Gln	Glu	Ser	Thr	Phe	Glu	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Arg	Lys
	225					230					235					240
35	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	His	Phe	Glu	Lys	Ser	Phe	Cys	Ile	Phe	Arg	Leu
					245					250					255	
40	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Pro	Cys	Pro
				260					265					270		
45	Ser	Trp	Lys	Ala	Val	Arg	Val	Asp	Leu	Val	Val	Ala	Pro	Val	Ser	Gln
			275					280					285			
50	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu	Gly	Trp	Thr	Gly	Ser	Lys	Leu	Phe	Gln	Arg
	290						295					300				
55	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser	Arg	Lys	Glu	Lys	Gly	Leu	Trp	Leu	Asn	Ser
	305					310					315					320
60	His	Gly	Leu	Phe	Asp	Pro	Glu	Gln	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Ala	Ala	Ser
					325					330					335	
65	Glu	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Tyr	Leu	Pro	Pro	Glu
				340					345					350		
	Gln	Arg	Asn	Ala												
			355													
	<210> 11															
	<211> 494															

ES 2 364 010 A1

<212> PRT

<213> *Homo sapiens* (Mutante M2)

5 <400> 11

10	Met 1	Leu	Pro	Lys	Arg 5	Arg	Arg	Ala	Arg	Val 10	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly 15	Asp
15	Ala	Ala	Ser	Ser 20	Thr	Pro	Pro	Ser	Thr 25	Arg	Phe	Pro	Gly	Val 30	Ala	Ile
20	Tyr	Leu	Val 35	Glu	Pro	Arg	Met	Gly 40	Arg	Ser	Arg	Arg	Ala 45	Phe	Leu	Thr
25	Gly	Leu	Ala	Arg	Ser	Lys	Gly 55	Phe	Arg	Val	Leu	Asp 60	Ala	Cys	Ser	Ser
30	Glu	Ala	Thr	His	Val	Val 70	Met	Glu	Glu	Thr	Ser 75	Ala	Glu	Glu	Ala	Val 80
35	Ser	Trp	Gln	Glu	Arg 85	Arg	Met	Ala	Ala	Ala 90	Pro	Pro	Gly	Cys	Thr 95	Pro
40	Pro	Ala	Leu	Leu	Asp 100	Ile	Ser	Trp	Leu 105	Thr	Glu	Ser	Leu	Gly 110	Ala	Gly
45	Gln	Pro	Val 115	Pro	Val	Glu	Cys	Arg 120	His	Arg	Leu	Glu	Val 125	Ala	Gly	Pro
50	Arg	Lys	Gly 130	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala 135	Trp	Met	Pro	Ala	Tyr	Ala	Cys	Gln
55	Arg	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr 150	His	His	Asn	Thr	Gly 155	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu 160
60	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu 165	Ala	Ala	Gly	Phe	Glu 170	Gly	Ser	Glu	Gly	Arg 175	Leu
65	Leu	Thr	Phe	Cys 180	Arg	Ala	Ala	Ser	Val 185	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro
70	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln 200	Gly	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Glu	His 205

ES 2 364 010 A1

	Ser	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	His	Gly	Val	Cys	Glu	Glu
	210						215					220				
5	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	Tyr	Gln	Thr	Met	Lys	Leu	Phe
	225					230					235					240
10	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Val	Gly	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg
					245					250					255	
15	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu
				260					265					270		
20	Thr	Gln	Met	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr
			275					280					285			
25	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu
	290						295					300				
30	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly
	305					310					315					320
35	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr
					325					330					335	
40	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys
				340					345					350		
45	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	His	Gln	His	Ser
			355					360						365		
50	Cys	Cys	Glu	Ser	Pro	Thr	Arg	Leu	Ala	Gln	Gln	Ser	His	Met	Asp	Ala
	370						375					380				
55	Phe	Glu	Arg	Ser	Phe	Cys	Ile	Phe	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala
	385					390					395					400
60	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Pro	Cys	Pro	Ser	Trp	Lys	Ala	Val	Arg
					405					410					415	
65	Val	Asp	Leu	Val	Val	Ala	Pro	Val	Ser	Gln	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu
				420					425					430		
70	Gly	Trp	Thr	Gly	Ser	Lys	Leu	Phe	Gln	Arg	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser
			435					440						445		

ES 2 364 010 A1

Arg Lys Glu Lys Gly Leu Trp Leu Asn Ser His Gly Leu Phe Asp Pro
 450 455 460

5
 Glu Gln Lys Thr Phe Phe Gln Ala Ala Ser Glu Glu Asp Ile Phe Arg
 465 470 475 480

10
 His Leu Gly Leu Glu Tyr Leu Pro Pro Glu Gln Arg Asn Ala
 485 490

<210> 12
 15 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens* (M2: NH2- BRCT-)

20
 <400> 12

25
 Met His Arg Leu Glu Val Ala Gly Pro Arg Lys Gly Pro Leu Ser Pro
 1 5 10 15

30
 Ala Trp Met Pro Ala Tyr Ala Cys Gln Arg Pro Thr Pro Leu Thr His
 20 25 30

35
 His Asn Thr Gly Leu Ser Glu Ala Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Ala
 35 40 45

40
 Gly Phe Glu Gly Ser Glu Gly Arg Leu Leu Thr Phe Cys Arg Ala Ala
 50 55 60

45
 Ser Val Leu Lys Ala Leu Pro Ser Pro Val Thr Thr Leu Ser Gln Leu
 65 70 75 80

50
 Gln Gly Leu Pro His Phe Gly Glu His Ser Ser Arg Val Val Gln Glu
 85 90 95

55
 Leu Leu Glu His Gly Val Cys Glu Glu Val Glu Arg Val Arg Arg Ser
 100 105 110

60
 Glu Arg Tyr Gln Thr Met Lys Leu Phe Thr Gln Ile Phe Gly Val Gly
 115 120 125

65
 Val Lys Thr Ala Asp Arg Trp Tyr Arg Glu Gly Leu Arg Thr Leu Asp
 130 135 140

Asp Leu Arg Glu Gln Pro Gln Lys Leu Thr Gln Met Gln Lys Ala Gly
 145 150 155 160

ES 2 364 010 A1

Leu Gln His His Gln Asp Leu Ser Thr Pro Val Leu Arg Ser Asp Val
 165 170 175
 5
 Asp Ala Leu Gln Gln Val Val Glu Glu Ala Val Gly Gln Ala Leu Pro
 180 185 190
 10
 Gly Ala Thr Val Thr Leu Thr Gly Gly Phe Arg Arg Gly Lys Leu Gln
 195 200 205
 15
 Gly His Asp Val Asp Phe Leu Ile Thr His Pro Lys Glu Gly Gln Glu
 210 215 220
 20
 Ala Gly Leu Leu Pro Arg Val Met Cys Arg Leu Gln Asp Gln Gly Leu
 225 230 235 240
 25
 Ile Leu Tyr His Gln His Gln His Ser Cys Cys Glu Ser Pro Thr Arg
 245 250 255
 30
 Leu Ala Gln Gln Ser His Met Asp Ala Phe Glu Arg Ser Phe Cys Ile
 260 265 270
 35
 Phe Arg Leu Pro Gln Pro Pro Gly Ala Ala Val Gly Gly Ser Thr Arg
 275 280 285
 40
 Pro Cys Pro Ser Trp Lys Ala Val Arg Val Asp Leu Val Val Ala Pro
 290 295 300
 45
 Val Ser Gln Phe Pro Phe Ala Leu Leu Gly Trp Thr Gly Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 50
 Phe Gln Arg Glu Leu Arg Arg Phe Ser Arg Lys Glu Lys Gly Leu Trp
 325 330 335
 55
 Leu Asn Ser His Gly Leu Phe Asp Pro Glu Gln Lys Thr Phe Phe Gln
 340 345 350
 60
 Ala Ala Ser Glu Glu Asp Ile Phe Arg His Leu Gly Leu Glu Tyr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Glu Gln Arg Asn Ala
 370 375

<210> 13

<211> 357

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens* (M2: NH2- BRCT- 8 KDa-)

ES 2 364 010 A1

<400> 13

5	Met 1	Pro	Ala	Tyr	Ala 5	Cys	Gln	Arg	Pro	Thr 10	Pro	Leu	Thr	His	His 15	Asn
10	Thr	Gly	Leu	Ser 20	Glu	Ala	Leu	Glu	Ile 25	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Phe
15	Glu	Gly	Ser 35	Glu	Gly	Arg	Leu	Leu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala	Ala	Ser	Val
20	Leu	Lys 50	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro 55	Val	Thr	Thr	Leu	Ser 60	Gln	Leu	Gln	Gly
25	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Glu 70	His	Ser	Ser	Arg	Val 75	Val	Gln	Glu	Leu	Leu 80
30	Glu	His	Gly	Val	Cys 85	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Val 90	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg 95
35	Tyr	Gln	Thr	Met 100	Lys	Leu	Phe	Thr	Gln	Ile 105	Phe	Gly	Val	Gly	Val	Lys 110
40	Thr	Ala	Asp 115	Arg	Trp	Tyr	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu 125
45	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu 135	Thr	Gln	Met	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln 140
50	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser 150	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ser 155	Asp	Val	Asp	Ala 160
55	Leu	Gln	Gln	Val	Val 165	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala 175
60	Thr	Val	Thr	Leu 180	Thr	Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His 190
65	Asp	Val	Asp 195	Phe	Leu	Ile	Thr	His 200	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly 205
70	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys 215	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu 220

ES 2 364 010 A1

Tyr His Gln His Gln His Ser Cys Cys Glu Ser Pro Thr Arg Leu Ala
 225 230 235 240
 5 Gln Gln Ser His Met Asp Ala Phe Glu Arg Ser Phe Cys Ile Phe Arg
 245 250 255
 10 Leu Pro Gln Pro Pro Gly Ala Ala Val Gly Gly Ser Thr Arg Pro Cys
 260 265 270
 15 Pro Ser Trp Lys Ala Val Arg Val Asp Leu Val Val Ala Pro Val Ser
 275 280 285
 20 Gln Phe Pro Phe Ala Leu Leu Gly Trp Thr Gly Ser Lys Leu Phe Gln
 290 295 300
 25 Arg Glu Leu Arg Arg Phe Ser Arg Lys Glu Lys Gly Leu Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 30 Ser His Gly Leu Phe Asp Pro Glu Gln Lys Thr Phe Phe Gln Ala Ala
 325 330 335
 35 Ser Glu Glu Asp Ile Phe Arg His Leu Gly Leu Glu Tyr Leu Pro Pro
 340 345 350
 40 Glu Gln Arg Asn Ala
 355

40 <210> 14

<211> 1485

<212> DNA

<213> *Homo sapiens* (Mutante M3)

45

<400> 14

```

atgctcccca aacggcggcg agcgcggggtc ggggtccccta gcggcgatgc cgcttccctcc      60
50 acgccgcctt cgacgcgctt cccgggagtc gccatctacc tggtcgagcc togcattgggt      120
cgcagccgcc gggccttccct cacaggcctg gcgcgctcca aaggcttccg cgtccttgac      180
55 gcctgcagct ccgaagcgac acatgttggtg atggaagaga cctcagcaga ggaggccgctc      240
agctggcagg agcgcaggat ggcagctgct cccccggggtt gcaccccccc agctctgctg      300
60 gacataagct ggttaacaga ggcctggga gctgggcagc ctgtacctgt ggagtgcogc      360
caccgcctgg aggtggctgg gccaaaggaag gggcctctga gccagcatg gatgcctgcc      420
65 tatgcctgcc agcgccttac gccctcaca caccacaaca ctggcctctc cgaggctctg      480
gagatactgg ccgaggcagc aggccttgaa ggcagtgagg gccgcctcct caccttctgc      540
  
```

ES 2 364 010 A1

	agagcagcct cggtgctcaa ggcccttccc agccctgtca caaccctgag ccagctgcag	600
	gggcttcccc actttggaga acactcctct agggttgtcc aggagctgct ggagcatgga	660
5	gtgtgtgagg aggtggagag agttcggcgc tcagagaggt accagacat gaagctcttc	720
	accagatct tcggggtcgg tgtgaagact gctgaccggt ggtaccggga aggactgcga	780
10	accttagatg acctccgaga gcagccccag aaactaacc aaatgcagaa agcggggctc	840
	cagcaccacc aggacctgag caccacagtc ctgcgggccg atgtagatgc cctgcagcag	900
15	gtggtggagg aagctgtggg gcaggccctg cctggggcca ccgtcacgct gaccggcggc	960
	ttccgcaggg ggaagttgca gggccatgac gtggacttcc tcatcaccca cccaaggag	1020
	ggtcaggagg cggggctgct gcctagagtg atgtgccgcc tgcaggacca gggcctcatc	1080
20	ctgtaccacc agcaccagca cagctgctgt gagtccccta cccgcctggc ccaacagagc	1140
	cacatggagc cttttgagaa aagtttctgc attttccgcc taccacaacc tccaggggct	1200
25	gctgtggggg gatccacgag gccctgcccc tcctggaagg ccgtgagagt ggacttggtg	1260
	gttgcacccg tcagccagtt ccctttcgcc ctgctcgggt ggactggctc caagcttttc	1320
30	cagcgggagc tgcgccgctt cagccggaag gagaagggcc tgtggctgaa cagccatggg	1380
	ctgtttgacc cggagcagaa gacatttttc caagcggctt cagaggaaga catcttcaga	1440
35	cacctgggcc ttgagtacct tcctccagag cagagaaacg cctga	1485
	<210> 15	
	<211> 1488	
	<212> DNA	
40	<213> <i>Homo sapiens</i> (Mutante M7)	
	<400> 15	
45	atgctcccca aacggcggcg agcgcgggctc gggctccccta gcggcgatgc cgcttctctc	60
	acgccgccct cgacgcgctt cccgggagtc gccatctacc tggctcgagcc tcgcatgggt	120
	cgcagccgcc gggccttctt cacaggcctg gcgcgctcca aaggcttccg cgtccttgac	180
50	gcctgcagct ccgaagcgac acatgttgtg atggaagaga cctcagcaga ggaggccgctc	240
	agctggcagg agcgcaggat ggcagctgct cccccgggtt gcaccccccc agctctgctg	300
55	gacataagct ggttaacaga gagcctggga gctgggcagc ctgtacctgt ggagtgccgg	360
	caccgcctgg aggtggctgg gccaaaggaag gggcctctga gccagcatg gatgcctgcc	420
60	tatgcctgcc agcgcctac gccctcaca caccacaaca ctggcctctc cgaggctctg	480
	gagatactgg ccgaggcagc aggctttgaa ggcagtgagg gccgcctcct caccttctgc	540
65	agagcagcct cggtgctcaa ggcccttccc agccctgtca caaccctgag ccagctgcag	600
	gggcttcccc actttggaga acactcctct agggttgtcc aggagctgct ggagcatgga	660

ES 2 364 010 A1

	gtgtgtgagg aggtggagag agttcggcgc tcagagaggt accagacat gaagctcttc	720
	accagatct tcggggtcgg tgtgaagact gctgaccggt ggtaccggga aggactgcga	780
5	accttagatg acctccgaga gcagccccag aaactaacc aacagcagaa agcggggctc	840
	cagcaccacc aggacctgag caccaccagtc ctgcgggtccg atgtagatgc cctgcagcag	900
10	gtgggtggagg aagctgtggg gcaggccctg cctggggcca cgtcacgct gaccggcggc	960
	ttccgcaggg ggaagttgca gggccatgac gtggacttcc tcatcaccca cccaaggag	1020
15	ggtcaggagg cggggctgct gcctagagt atgtgccgc tgcaggacca gggcctcatc	1080
	ctgtaccacc agcaccagga gtcaacattt gaaaagctca ggttgcttag caggaaggtt	1140
20	gatgctttgg atcattttga gaaaagtttc tgcattttcc gcctaccaca acctccaggg	1200
	gctgctgtgg ggggatccac gaggccctgc ccatcctgga aggccgtgag agtggacttg	1260
	gtagttgcac ccgtcagcca gttccctttc gccctgctcg gttggactgg ctccaagctt	1320
25	ttccagcggg agctgcgccg cttcagccgg aaggagaagg gcctgtggct gaacagccat	1380
	gggctgtttg acccgagca gaagacattt ttccaagcgg cttcagagga agacatcttc	1440
30	agacacctgg gccttgagta cttcctcca gagcagagaa acgcctga	1488

<210> 16

<211> 1485

35 <212> DNA

<213> *Homo sapiens* (Mutante M2)

<400> 16

	atgctcccca aacggcggcg agcgcgggtc gggcccccta gcggcgatgc cgcttctctc	60
	acgccgccct cgacgcgctt cccgggagtc gccatctacc tggtcgagcc tcgcatgggt	120
45	cgcagccgcc gggccttctt cacaggcctg gcgcgctcca aaggcttccg cgtccttgac	180
	gcctgcagct ccgaagcgac acatgtttgt atggaagaga cctcagcaga ggaggccgtc	240
50	agctggcagg agcgcaggat ggcagctgct cccccgggtt gcaccccccc agctctgctg	300
	gacataagct ggttaacaga gagcctggga gctgggcagc ctgtacctgt ggagtgccgg	360
	caccgcctgg aggtggctgg gccaaaggaag gggcctctga gccagcatg gatgcctgcc	420
55	tatgcctgcc agcgccttac gccctcaca caccacaaca ctggcctctc cgaggctctg	480
	gagatactgg ccgaggcagc aggctttgaa ggcagtgagg gccgcctcct caccttctgc	540
60	agagcagcct cgggtgctcaa ggccttccc agccctgtca caaccctgag ccagctgcag	600
	gggcttcccc actttggaga aactcctct agggttgtcc aggagctgct ggagcatgga	660
65	gtgtgtgagg aggtggagag agttcggcgc tcagagaggt accagacat gaagctcttc	720
	accagatct tcggggtcgg tgtgaagact gctgaccggt ggtaccggga aggactgcga	780

ES 2 364 010 A1

```

accttagatg acctccgaga gcagccccag aaactaaccc aaatgcagaa agcgggggctc      840
cagcaccacc aggacctgag caccaccagtc ctgcgggtccg atgtagatgc cctgcagcag      900
5  gtggtggagg aagctgtggg gcaggccctg cctggggcca ccgtcacgct gaccggcggc      960
ttccgcaggg ggaagttgca gggccatgac gtggacttcc tcatcaccca cccaaggag      1020
10  ggtcaggagg cggggctgct gcctagagtg atgtgccgcc tgcaggacca gggcctcadc      1080
ctgtaccacc agcaccagca cagctgctgt gagtccccta cccgcctggc ccaacagagc      1140
15  cacatggacg cttttgagag aagtttctgc attttccgcc taccacaacc tccaggggct      1200
gctgtggggg gatccacgag gcctgcccc tcttgaagg ccgtgagagt ggacttggtg      1260
20  gttgcacccg tcagccagtt cccttccgcc ctgctcgggt ggactggctc caagcttttc      1320
cagcgggagc tgcgccgctt cagccggaag gagaagggcc tgtggctgaa cagccatggg      1380
ctgtttgacc cggagcagaa gacatttttc caagcggctt cagaggaaga catcttcaga      1440
25  cacctgggcc ttgagtacct tctccagag cagagaaacg cctga      1485

```

<210> 17

30 <211> 494

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 17

```

Met Leu Pro Lys Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly Ser Pro Ser Gly Asp
40  1          5          10          15
Ala Ala Ser Ser Thr Pro Pro Ser Thr Arg Phe Pro Gly Val Ala Ile
45  20          25          30
Tyr Leu Val Glu Pro Arg Met Gly Arg Ser Arg Arg Ala Phe Leu Thr
50  35          40          45
Gly Leu Ala Arg Ser Lys Gly Phe Arg Val Leu Asp Ala Cys Ser Ser
55  50          55          60
Glu Ala Thr His Val Val Met Glu Glu Thr Ser Ala Glu Glu Ala Val
60  65          70          75
Ser Trp Gln Glu Arg Arg Met Ala Ala Ala Pro Pro Gly Cys Thr Pro
65  85          90          95
Pro Ala Leu Leu Asp Ile Ser Trp Leu Thr Glu Ser Leu Gly Ala Gly
100          105          110

```

ES 2 364 010 A1

	Gln	Pro	Val	Pro	Val	Glu	Cys	Arg	His	Arg	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Pro
			115					120					125			
5	Arg	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala	Trp	Met	Pro	Ala	Tyr	Ala	Cys	Gln
		130					135					140				
10	Arg	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	His	His	Asn	Thr	Gly	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu
	145					150					155					160
15	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Phe	Glu	Gly	Ser	Glu	Gly	Arg	Leu
					165					170					175	
20	Leu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro
			180						185					190		
25	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Glu	His
			195					200					205			
30	Ser	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	His	Gly	Val	Cys	Glu	Glu
		210					215					220				
35	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	Tyr	Gln	Thr	Met	Lys	Leu	Phe
	225					230					235					240
40	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Val	Gly	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Arg	Trp	Tyr	Arg
				245						250					255	
45	Glu	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Glu	Gln	Pro	Gln	Lys	Leu
			260						265					270		
50	Thr	Gln	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Gln	His	His	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr
			275					280					285			
55	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Glu	Glu
		290					295					300				
60	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly
	305					310					315					320
65	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr
				325						330					335	
70	His	Pro	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Cys
			340						345					350		

ES 2 364 010 A1

	Arg	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	His	Gln	His	Ser
			355					360					365			
5	Cys	Cys	Glu	Ser	Pro	Thr	Arg	Leu	Ala	Gln	Gln	Ser	His	Met	Asp	Ala
		370					375					380				
10	Phe	Glu	Arg	Ser	Phe	Cys	Ile	Phe	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Gly	Ala
	385					390					395					400
15	Ala	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Pro	Cys	Pro	Ser	Trp	Lys	Ala	Val	Arg
					405					410					415	
20	Val	Asp	Leu	Val	Val	Ala	Pro	Val	Ser	Gln	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu
				420					425					430		
25	Gly	Trp	Thr	Gly	Ser	Lys	Leu	Phe	Gln	Arg	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser
			435					440					445			
30	Arg	Lys	Glu	Lys	Gly	Leu	Trp	Leu	Asn	Ser	His	Gly	Leu	Phe	Asp	Pro
		450					455					460				
35	Glu	Gln	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Ala	Ala	Ser	Glu	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg
	465					470					475					480
40	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Tyr	Leu	Pro	Pro	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala		
					485					490						
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901943

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/54** (2006.01)
C12N9/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ANDRADE, P. et al., "Limited terminal transferase in human DNA polymerase mu defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Sep 2009, Vol.106, No. 38, páginas 16203-16208, ISSN: 0027-8424. Epub: 04-09-2009, Resultados; Discusión.	1-16
Y	JUÁREZ, R, et al., 'A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis.', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2006, Vol. 34, No. 16, páginas 4572-4582, ISSN: 0305-1048, Materiales y Métodos; Resultados.	1-16
A	ROMAIN, F. et al., "Conferring a template-dependent polymerase activity to terminal deoxynucleotidyltransferase by mutations in the Loop1 region.", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Aug 2009, Vol. 37, No.14, páginas 4642-4656, ISSN: 0305-1048, Epub: 05-06-2009, Resultados; Discusión.	1-16
A	MOON, A.F. et al., 'Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase mu.', NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, 2007, Vol. 14, No. 1, páginas 45-53, ISSN: 1545-9985, todo el documento.	1-16

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:

<p>Fecha de realización del informe 20.07.2011</p>	<p>Examinador J. Vizán Arroyo</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901943

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/54** (2006.01)
C12N9/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOMÍNGUEZ, O. et al., "DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells.", THE EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION JOURNAL, 2000, Vol. 19, No. 7, páginas 1731-1742, ISSN: 0261-4189, todo el documento.	1-16
A	MOON, A.F. et al., 'The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases.', DNA REPAIR, 2007, Vol. 6, No. 12, páginas 1709-1725, ISSN: 1568-7864, todo el documento.	1-16
A	WO 01/64909 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 07-09-2001, todo el documento.	1-16

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
20.07.2011

Examinador
J. Vizán Arroyo

Página
2/5

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

C12N

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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

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	Andrade, P. et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> , (2009 Sep), <u>106</u> (38): 16203-8.	04-09-2009
D02	Juárez, R. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2006), <u>34</u> (16): 4572-82.	2006
D03	Romain, F. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2009 Aug), <u>37</u> (14): 4642-56.	05-06-2009
D04	Moon, A.F. et al., <i>Nat. Struct. Mol. Biol.</i> , (2007), <u>14</u> (1): 45-53.	2007
D05	Domínguez, O. et al., <i>EMBO J.</i> , (2000), <u>19</u> (7):1731-42.	2000
D06	Moon, A.F. et al., <i>DNA Repair</i> , (2007), <u>6</u> (12): 1709-25.	2007
D07	WO 01/64909 A1	07-09-2001

En D1 se describe la actividad actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal de diferentes mutantes puntuales de la DNA polimerasa mu (Pol μ).

En D2-D3 se analizan estructural y funcionalmente el subdominio Loop 1 de Pol μ y el de la Desoxinucleotidil-transferasa Terminal (TdT).

En D4-D7 se caracterizan diferentes miembros de la familia Polimerasa X (TdT, Pol β , Pol λ , Pol μ).

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes)

1.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-16, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicaciones independientes 1-16.

2.1.1. Se considera que los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se describe al mutante Pol μ (R387K) caracterizado por tener aumentada la actividad transferasa terminal con respecto a la del alelo silvestre Pol μ (cf. D1: Resultados; Tabla 1). En D2 se analiza la actividad enzimática de la construcción quimérica Pol μ (Ch-loop1), obtenida mediante la sustitución de la secuencia del subdominio loop 1 de Pol μ humana por la del correspondiente subdominio loop 1 de TdT humana (c.f. D2: Materiales y Métodos; Resultados, Figura 5).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos mutantes Pol μ con una actividad transferasa terminal superior a la del mutante Pol μ (R387K).

2.1.3. La solución propuesta es la enzima mutante Pol μ (M7) caracterizada por la secuencia SEQ ID NO 6. Dicho mutante comprende la mutación R387K y la sustitución de la secuencia del subdominio loop 1 de Pol μ por la correspondiente secuencia loop 1 de TdT (c.f. página 11, líneas 32-33). Para valorar adecuadamente la actividad inventiva de esta solución es necesario considerar si, a la fecha de presentación de la solicitud de patente, partiendo del estado de la técnica más próximo, el experto en la materia intentaría aplicar dicha solución con una expectativa razonable de éxito. Además, es preciso considerar si se plantearon dificultades técnicas no previsibles durante la puesta en práctica de dicho procedimiento.

Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1 y D2, junto con los conocimientos de uso y aplicación habitual en este campo de la biotecnología, recogidos en D3-D7 se concluye que la solución propuesta por la solicitud de patente al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por esta razón, el objeto de la reivindicación 1, en cuanto al mutante Pol μ (M7) (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10), se considera que no es inventivo. Así mismo, se considera que el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-16 tampoco es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-16, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.