

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 536**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)
C12N 9/14	(2006.01)
C12N 9/22	(2006.01)
C12N 9/50	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10803492 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2501716**

54 Título: **Composiciones para aumentar la estabilidad y actividad de polipéptidos, y métodos relacionados**

30 Prioridad:

19.11.2009 US 262919 P
01.06.2010 US 350457 P
18.06.2010 US 356541 P
07.10.2010 US 390857 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2015

73 Titular/es:

SOLIS BIODYNE OÜ (100.0%)
Riia 185a
51014 Tartu , EE

72 Inventor/es:

KAHRE, OLEV;
ARTMA, KADRI y
KAHRE, TIINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 533 536 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para aumentar la estabilidad y actividad de polipéptidos, y métodos relacionados

5 **Antecedentes de la invención**

10 Existe la necesidad en la técnica de métodos y composiciones que potencien la estabilidad de proteínas. Existe particularmente la necesidad de composiciones que potencien la estabilidad de polimerasas tales como polimerasas Taq de modo que puedan retener la actividad enzimática después de exposición a corto plazo o largo plazo a temperaturas por encima de congelación. Existe también la necesidad en la técnica de composiciones que potencien la fidelidad, sensibilidad, y rendimiento de las polimerasas. Se describen proteínas de fusión estabilizadas que tienen la cola ácida de sinucleína en Lee et al. Pharmaceutical Research 22, 10 (2005) 1735-1746.

15 **Sumario de la invención**

La invención es como se define en las reivindicaciones.

20 Esta descripción proporciona péptidos, polipéptidos, polipéptidos de fusión, composiciones, y métodos para posibilitar la retención de la actividad de una enzima (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa, nucleasa, transcriptasa inversa, ADN desaminasa, ARN desaminasa, proteasa) o una proteína (por ejemplo, eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia humana (hLIF), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), insulina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), leptina, bevacizumab) después de exposición a corto plazo o largo plazo a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. Los péptidos, polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones proporcionados en este documento pueden potenciar la estabilidad de una enzima o proteína a temperatura ambiente. Una enzima o proteína proporcionada en este documento puede ser cualquier proteína de unión a ácido nucleico, por ejemplo, una proteína de unión a ADN, una proteína de unión a ARN, un fragmento de las mismas, o cualquier combinación de las mismas. Una enzima o proteína proporcionada en este documento puede unirse a otras proteínas, por ejemplo, receptores de hormonas.

30 En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones proporcionados en este documento retienen la actividad a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones retienen la actividad enzimática o actividad hormonal a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, la actividad enzimática o actividad hormonal de los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones después de su exposición a una temperatura entre -20 °C y 50 °C es al menos el 50 % de la actividad enzimática del polipéptido antes de su exposición a dicha temperatura.

40 Las marcas peptídicas proporcionadas en este documento aumentan la estabilidad de los polipéptidos. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas inhiben la pérdida de actividad enzimática de los polipéptidos. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas inhiben la degradación de los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas aumentan la estabilidad o inhiben la pérdida de actividad enzimática de los polipéptidos durante al menos un día. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas aumentan la estabilidad o inhiben la pérdida de actividad enzimática de los polipéptidos durante al menos una semana. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas aumentan la estabilidad o inhiben la pérdida de actividad enzimática de los polipéptidos durante al menos un mes.

45 En algunas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en este documento muestran estabilidad, actividad enzimática, o actividad hormonal potenciada en comparación con un polipéptido similar que no comprende una marca peptídica proporcionada en este documento. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de la actividad enzimática o actividad hormonal de un polipéptido similar que no comprende a marca peptídica proporcionada en este documento. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de la actividad enzimática o actividad hormonal de un polipéptido similar que no comprende una marca peptídica proporcionada en este documento, después de su exposición a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, o 200 % mayor actividad enzimática o actividad hormonal que la actividad enzimática o actividad hormonal de un polipéptido similar que no comprende una marca peptídica proporcionada en este documento, después de su exposición a una temperatura entre -20 °C y 50 °C.

60 Los polipéptidos se unen a una marca peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1. En algunas realizaciones, la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, SEC ID N° 13, o SEC ID N° 14. También se proporcionan en este documento marcas peptídicas que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 13 o SEC ID N° 14. En algunas realizaciones, los polipéptidos, unidos a marcas peptídicas proporcionadas en este documento, comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, o SEC ID N° 11. En algunas realizaciones, los polipéptidos, unidos a marcas peptídicas proporcionadas en este documento, comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, o SEC ID N° 11. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %

idéntica a la SEC ID N° 1, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 11, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, SEC ID N° 18, SEC ID N° 20, SEC ID N° 22. En algunas realizaciones, los polipéptidos no tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 11.

5 En algunas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en este documento se unen a una marca peptídica que está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 15. En algunas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en este documento se unen a una marca peptídica que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 15. También se proporciona en este documento un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, o SEC ID N° 12. También se proporciona en este documento un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, o SEC ID N° 12.

15 También se proporciona en este documento un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 10. También se proporciona en este documento un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 10. También se proporciona en este documento un polipéptido que comprenden un motivo de secuencia que se une a un ADN bicatenario. También se proporciona en este documento un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 9. También se proporciona en este documento un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 9. También se proporciona en este documento un polipéptido codificado por la SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 12, SEC ID N° 15, SEC ID N° 17, SEC ID N° 19, SEC ID N° 21, o SEC ID N° 23.

25 Se describen en este documento polipéptidos de fusión que comprenden una marca peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % a un 98 % idéntica a la SEC ID N° 1 y al menos un polipéptido, donde la marca peptídica está unida a dicho al menos un polipéptido, y la marca peptídica estabiliza el polipéptido de fusión a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En una realización, la marca peptídica se une covalentemente a ese al menos un polipéptido. En una realización, la marca peptídica se une no covalentemente a ese al menos un polipéptido. En una realización, la marca peptídica se une al extremo amino del al menos un polipéptido. En una realización, la marca peptídica se une al extremo carboxi del al menos un polipéptido. Se describe en este documento un polipéptido de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido. El primer polipéptido puede ser una enzima y el segundo polipéptido puede ser una proteína de unión a doble cadena. La marca peptídica puede unirse al extremo amino del primer polipéptido, y el extremo carboxi del primer polipéptido puede unirse al extremo amino del segundo polipéptido. La marca peptídica puede unirse al extremo amino del segundo polipéptido, y el extremo carboxi del segundo polipéptido puede unirse al extremo amino del primer polipéptido.

40 En un aspecto, esta descripción proporciona un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende una marca peptídica unida a un polipéptido, donde dicho polipéptido retiene una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de al menos aproximadamente -10 °C a aproximadamente 50 °C, y donde dicho polipéptido de fusión no tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

45 En otro aspecto, esta descripción proporciona una composición que comprende: (a) un polipéptido de fusión que comprende un primer polipéptido unido a un péptido, donde dicho polipéptido de fusión retiene una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de al menos aproximadamente -10 °C a aproximadamente 50 °C ; y (b) un segundo polipéptido.

50 El péptido puede unirse covalentemente a dicho polipéptido, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido. El péptido puede unirse no covalentemente a un polipéptido, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido. El péptido puede unirse a dicho polipéptido, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido en el extremo amino de dicho polipéptido, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido. El péptido puede unirse a dicho polipéptido, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido en el extremo carboxi de dicho polipéptido, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido. El polipéptido, primer polipéptido, o segundo polipéptido puede ser una proteína termoestable. La proteína termoestable puede ser una enzima. La enzima puede ser una polimerasa, una transcriptasa inversa, una nucleasa, una pirofosfatasa, una proteasa, o una desaminasa. Se describe en este documento un polipéptido de fusión que es un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4. El polipéptido de fusión puede ser al menos un 70 % idéntico a un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, o SEC ID N° 12. El péptido puede ser al menos un 70 % idéntico a la SEC ID N° 1.

60 Se proporcionan en este documento composiciones que comprenden un polipéptido de fusión que comprende una marca peptídica unida a un primer polipéptido, y un segundo polipéptido, donde la marca peptídica estabiliza dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. La marca peptídica puede estabilizar el primer polipéptido o el segundo polipéptido durante al menos 1 día a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. El polipéptido de fusión o el segundo polipéptido puede retener la actividad enzimática o actividad hormonal a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. La actividad enzimática o actividad hormonal del polipéptido de fusión o el segundo polipéptido después de su exposición a una temperatura entre -20 °C y 50 °C puede ser al menos el 50 %

de la actividad enzimática o actividad hormonal del polipéptido de fusión o el segundo polipéptido antes de su exposición a dicha temperatura. El primer polipéptido o el segundo polipéptido puede ser una polimerasa, transcriptasa inversa, nucleasa, pirofosfatasa, desaminasa, o proteasa. El primer polipéptido o el segundo polipéptido puede ser eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia humana (hLIF), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), insulina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), leptina, o bevacizumab. El primer polipéptido o el segundo polipéptido puede comprender al menos una mutación. El polipéptido de fusión puede comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 11, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, SEC ID N° 18, SEC ID N° 20, o SEC ID N° 22. El polipéptido de fusión puede comprender un polipéptido codificado por la SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 12, SEC ID N° 15, SEC ID N° 17, SEC ID N° 19, SEC ID N° 21, o SEC ID N° 23.

Las composiciones proporcionadas en este documento pueden comprender adicionalmente un tercer polipéptido. El polipéptido de fusión puede tener una secuencia mostrada en la SEC ID N° 2, el segundo polipéptido puede tener una secuencia mostrada en la SEC ID N° 6, y el tercer polipéptido puede tener una secuencia mostrada en la SEC ID N° 11.

El segundo polipéptido puede ser una polimerasa. El segundo polipéptido puede ser al menos un 70 % idéntico a un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5 o SEC ID N° 12. El segundo polipéptido puede ser al menos un 70 % idéntico a un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4. El polipéptido de fusión puede comprender una enzima o polimerasa y dicho péptido puede tener al menos un 70 % de identidad con un péptido codificado por la SEC ID N° 3, SEC ID N° 7, o SEC ID N° 9. El polipéptido, primer polipéptido, o segundo polipéptido pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: ADN polimerasa I, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq), y ADN polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo). El polipéptido, primer polipéptido, o segundo polipéptido puede ser eritropoyetina. El polipéptido, primer polipéptido o segundo polipéptido puede ser una polimerasa Taq. El polipéptido, primer polipéptido o segundo polipéptido puede ser una polimerasa Tgo, o ser un 70 % idéntico a una polimerasa Tgo. El polipéptido, primer polipéptido o segundo polipéptido puede ser una polimerasa Taq. El polipéptido, primer polipéptido, o segundo polipéptido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: pirofosfatasa de *Thermoplasma acidophilum* (TAPP), dCTP desaminasa de *Pirococcus horikoshii*, citidina desaminasa y una desoxicitidina desaminasa. La desaminasa puede ser una ARN desaminasa o una ADN desaminasa. El polipéptido, primer polipéptido, o segundo polipéptido puede ser una proteína no termoestable. La proteína no termoestable puede ser un factor inhibidor de leucemia humana (hLIF) o leptina. La temperatura puede ser aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C.

La exposición a la temperatura puede ser durante al menos 1 semana. La actividad enzimática puede ser mayor de aproximadamente el 50 % de la actividad de la enzima antes de la exposición a una temperatura de al menos aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. El péptido puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 8, SEC ID N° 10, o SEC ID N° 13. El polipéptido de fusión puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 2. El péptido puede ser al menos un 70 % idéntico a un péptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es la SEC ID N° 3, SEC ID N° 7, o SEC ID N° 9. El polipéptido unido al péptido puede ser al menos un 70 % idéntico a un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es la SEC ID N° 5 o SEC ID N° 12. El polipéptido unido al péptido puede ser al menos un 70 % idéntico a un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es la SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, o SEC ID N° 12.

En otro aspecto más, la descripción proporciona un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende un péptido con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % homóloga a la SEC ID N° 1 donde el péptido está unido a un polipéptido. En algunas realizaciones, el péptido se une al polipéptido a través de un enlace covalente o no covalente. En algunas realizaciones, el polipéptido es una proteína termoestable. En algunas realizaciones, la proteína termoestable es una enzima. En algunas realizaciones, la enzima es una polimerasa, una transcriptasa inversa, una nucleasa, una proteasa, una pirofosfatasa, o una desaminasa. En algunas realizaciones, la polimerasa es ADN polimerasa I, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq), o ADN polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo). En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa Taq. En algunas realizaciones, la pirofosfatasa es pirofosfatasa de *Thermoplasma acidophilum* (TAPP). En algunas realizaciones, la desaminasa es dCTP desaminasa de *Pirococcus horikoshii*. En algunas realizaciones, la desaminasa es una citidina desaminasa o una desoxicitidina desaminasa. En algunas realizaciones, la desaminasa es una ARN desaminasa o una ADN desaminasa. En algunas realizaciones, el polipéptido es una proteína no termoestable. En algunas realizaciones, dicho polipéptido, primer polipéptido o segundo polipéptido es ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth) o polimerasa ZO5.

El polipéptido, primer polipéptido o segundo polipéptido puede ser factor inhibidor de leucemia humana (hLIF) o leptina. El polipéptido unido al péptido puede retener una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. El polipéptido puede mostrar una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. La exposición a una temperatura puede ser durante más de 1 día. La actividad enzimática puede ser mayor de aproximadamente el 50 % de la actividad de la composición antes de su exposición a una temperatura de al menos

aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. El péptido puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 7.

5 También se describe un polipéptido de fusión que comprende un primer péptido que es al menos un 70 % idéntico a un péptido codificado por la SEC ID N° 3 y un segundo péptido que es al menos un 70 % idéntico a un péptido codificado por la SEC ID N° 9. El primer y segundo péptidos pueden estar unidos a un tercer péptido. El primer y segundo péptidos pueden unirse entre sí. El enlace puede ser covalente. El primer péptido puede unirse al extremo N-terminal de un polipéptido y donde dicho segundo péptido se une al extremo C-terminal de dicho polipéptido.

10 El segundo péptido puede unirse al extremo C-terminal de dicho primer péptido. El polipéptido de fusión puede tener al menos un 70 % de identidad con un péptido codificado por la SEC ID N° 7.

15 También se describe un método de amplificación de ácido nucleico que comprende diluir un cebador de ácido nucleico con una mezcla que comprende una polimerasa, donde la polimerasa se une a un péptido que es al menos un 70 % idéntico a un péptido codificado por la SEC ID N° 3, SEC ID N° 7, SEC ID N° 9, SEC ID N° 15, SEC ID N° 17 o SEC ID N° 19. La polimerasa puede unirse en su extremo N-terminal al péptido. La polimerasa se une en su extremo C-terminal al péptido. La polimerasa puede ser una polimerasa Taq. La polimerasa puede mostrar una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. La polimerasa puede mostrar una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. La mezcla puede comprender adicionalmente una segunda polimerasa. La segunda polimerasa puede unirse a una secuencia peptídica que es al menos un 70 % homóloga a la SEC ID N° 1, SEC ID N° 8, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, o SEC ID N° 18. La polimerasa puede mostrar una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos un día. La actividad enzimática puede ser mayor de aproximadamente el 50 % de la actividad de la composición antes de su exposición a la temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos un día.

20 La invención proporciona métodos para aumentar la estabilidad de un polipéptido que comprende unir dicho polipéptido a una marca peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1.

30 También se describe el uso de una marca peptídica para aumentar la estabilidad de un polipéptido, donde la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1.

35 En algunas realizaciones, la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, o SEC ID N° 18. En algunas realizaciones, la marca peptídica está codificada por una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 3, SEC ID N° 15, SEC ID N° 17, o SEC ID N° 19. En algunas realizaciones, la marca peptídica comprende al menos uno a seis restos de histidina. En algunas realizaciones, la marca peptídica comprende un sitio de escisión por proteasa. En algunas realizaciones, el sitio de escisión por proteasa comprende la secuencia de aminoácidos DDDDK. En algunas realizaciones, la marca peptídica inhibe la degradación o desnaturalización del polipéptido a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, la marca peptídica inhibe la pérdida de la función proteica del polipéptido a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, la función proteica del polipéptido después de su exposición a dicha temperatura es de al menos el 50 % de la función proteica del polipéptido antes de su exposición a dicha temperatura. En algunas realizaciones, la marca peptídica mantiene la estabilidad del polipéptido durante al menos un día a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido unido a la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 11, SEC ID N° 20, o SEC ID N° 22.

40 En algunas realizaciones, la marca peptídica se une covalentemente al polipéptido. En algunas realizaciones, la marca peptídica se une no covalentemente al polipéptido. En algunas realizaciones, la marca peptídica se une al extremo amino del polipéptido. En algunas realizaciones, la marca peptídica se une al extremo carboxi del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido es eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia humana (hLIF), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), insulina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), leptina, o bevacizumab. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende al menos una mutación.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido unido a la marca peptídica está codificado por una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 12, SEC ID N° 21, o SEC ID N° 23. En algunas realizaciones, el polipéptido es una proteína o enzima termoestable. En algunas realizaciones, la enzima es una polimerasa, transcriptasa inversa, nucleasa, pirofosfatasa, desaminasa, o proteasa. En algunas realizaciones, la polimerasa es una ADN polimerasa I, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), o ADN polimerasa ZO5. En algunas realizaciones, la pirofosfatasa es una pirofosfatasa de *Thermoplasma acidophilum* (TAPP). En algunas realizaciones, la desaminasa es una dCTP desaminasa de *Pirococcus horikoshii*.

También se describen en este documento métodos para aumentar la estabilidad de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende proporcionar una marca peptídica que es un 70 % a un 98 % idéntica a la SEC ID N° 1. Se proporcionan en este documento métodos para aumentar la estabilidad de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende proporcionar un polipéptido que no es la SEC ID N° 2, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 11. Se proporcionan en este documento métodos para inhibir la pérdida de actividad enzimática o actividad hormonal de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende proporcionar una marca peptídica que es un 70 % a un 98 % idéntica a la SEC ID N° 1. Se proporcionan en este documento métodos para inhibir la pérdida de actividad enzimática o actividad hormonal de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende proporcionar un polipéptido que no es la SEC ID N° 2, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 11.

Se proporcionan en este documento métodos para inhibir la degradación de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende proporcionar una marca peptídica que es un 70 % a un 98 % idéntica a la SEC ID N° 1. Se proporcionan en este documento métodos para inhibir degradación de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición que comprende proporcionar un polipéptido que no es la SEC ID N° 2, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 11. El péptido está unido al polipéptido. El polipéptido o composición puede comprender adicionalmente un segundo polipéptido, donde la marca peptídica unida al polipéptido aumenta la estabilidad del segundo polipéptido. El polipéptido o composición puede comprender adicionalmente un tercer polipéptido, donde la marca peptídica unida al polipéptido aumenta la estabilidad del segundo polipéptido o el tercer polipéptido.

En algunas realizaciones, se proporcionan en este documento métodos para aumentar la estabilidad de un polipéptido que comprende unir dicho polipéptido a una marca peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1, donde la marca peptídica no es la SEC ID N° 1. También se describe el uso de una marca peptídica para aumentar la estabilidad de un polipéptido, donde la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1, donde la marca peptídica no es la SEC ID N° 1. Se proporcionan en este documento métodos para aumentar la estabilidad de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición, donde el polipéptido, polipéptido de fusión, o composición no es la SEC ID N° 1 unida a una polipéptido. Se proporciona en este documento el uso de una marca peptídica para aumentar la estabilidad del polipéptido, polipéptido de fusión, o composición, donde el polipéptido, polipéptido de fusión, o composición no es la SEC ID N° 1 unida a un polipéptido. Se proporcionan en este documento métodos para aumentar la estabilidad de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición, donde el polipéptido, polipéptido de fusión, o composición no es la SEC ID N° 1 unida a una polimerasa Taq. Se proporciona en este documento el uso de una marca peptídica para aumentar la estabilidad de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición, donde el polipéptido, polipéptido de fusión, o composición no es la SEC ID N° 1 unida a una polimerasa Tgo. Se proporciona en este documento el uso de una marca peptídica para aumentar la estabilidad de un polipéptido, polipéptido de fusión, o composición, donde el polipéptido, polipéptido de fusión, o composición no es la SEC ID N° 1 unida a una polimerasa Tgo.

En otro aspecto más, esta descripción proporciona un vector de ácido nucleico para su uso en una bacteria que comprende una secuencia de inicio de la traducción eucariota cadena arriba de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido unido a un péptido, donde dicho polipéptido retiene la actividad enzimática a una temperatura entre aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C, o 20 °C a aproximadamente 50 °C. Dicho polipéptido puede traducirse como una forma corta y también como una forma larga. La secuencia de inicio de la traducción eucariota puede codificar, al menos parcialmente, un polipéptido que retiene una actividad enzimática a una temperatura entre aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. La secuencia de inicio de la traducción eucariota puede ser una secuencia Kozak (GCCGCCACCATGGTC). La secuencia de inicio de la traducción eucariota puede estar cadena arriba de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es la SEC ID N° 1, 2, 6, 8, 10, 11 o 13 o variantes, fragmentos, o mutantes de las mismas. La composición comprende una bacteria que comprende un vector de ácido nucleico descrito en este documento.

En otro aspecto más, esta descripción proporciona una composición que comprende un polipéptido unido a un péptido, donde dicho polipéptido retiene una actividad enzimática a una temperatura entre aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C, donde dicho polipéptido está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene una secuencia de inicio de la traducción eucariota. El polipéptido puede ser una proteína termoestable. La proteína termoestable puede ser una enzima. La enzima puede ser una polimerasa, una pirofosfatasa, o una desaminasa. La polimerasa puede ser una ADN polimerasa I, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq), o ADN polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo). La polimerasa puede ser una polimerasa Taq. La polimerasa puede no ser una polimerasa Taq. La pirofosfatasa puede ser pirofosfatasa de *Thermoplasma acidophilum* (TAPP). La desaminasa puede ser dCTP desaminasa de *Pirococcus horikoshii*. La desaminasa puede ser una citidina desaminasa o una desoxicitidina desaminasa. La desaminasa puede ser una ARN desaminasa o una ADN desaminasa. Dicha secuencia de inicio de la traducción eucariota puede ser una secuencia Kozak (GCCGCCACCATGGTC). Dicha composición puede comprender una forma corta y también una forma larga de dicho polipéptido. Dicho polipéptido unido a un péptido puede ser al menos un 70 % idéntico a un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, o SEC ID N° 12. Dicho polipéptido se une a un péptido al menos un 70 % idéntico a la SEC ID N° 1, 3 o 10.

En algunos casos, cuando la enzima (por ejemplo, polimerasa Taq, ADN desaminasa, ARN desaminasa) se une al péptido (por ejemplo, un péptido al menos un 70 % idéntico a la SEC ID N° 1) muestra al menos un 20 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de su actividad antes de su exposición a corto plazo o largo plazo a temperaturas de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 35 °C. En algunos casos, la exposición sucede durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 10 horas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 10 semanas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 10 meses.

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de las realizaciones se proporcionan en este documento expuesto con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de las realizaciones proporcionadas en este documento por referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos que exponen realizaciones ilustrativas, en que se utilizan los principios de las realizaciones.

La **Figura 1** representa una amplificación por qPCR que se realiza para ensayar la estabilidad de una proteína de fusión péptido-polipéptido (SEC ID N° 2) después de exposición a 35 °C. La primera muestra de mezcla fresca de qPCR se almacena a -20 °C (panel superior) y La segunda muestra se almacena a 35 °C durante 4 semanas (panel inferior).

La **Figura 2** representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 1) de una marca peptídica de 42 aminoácidos.

La **Figura 3** representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión (SEC ID N° 2) que consiste en la marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) unida al extremo N-terminal de polimerasa Taq de tipo silvestre. La secuencia de la marca peptídica de 42 aminoácidos está subrayada.

La **Figura 4** representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 3) que codifica la marca peptídica de 42 aminoácidos (SEC ID N° 1).

La **Figura 5** representa la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de fusión (SEC ID N° 2) que consiste en la marca peptídica de 42 aminoácidos (a.a.) de la Figura 2 (SEC ID N° 1) unida al extremo N-terminal de polimerasa Taq de tipo silvestre. La secuencia de nucleótidos completa se denomina SEC ID N° 4. La secuencia de nucleótidos que codifica la marca peptídica de 42 aminoácidos está subrayada.

La **Figura 6** representa la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de fusión (SEC ID N° 6) que consiste en el fragmento modificado de marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) (negrita y subrayado) unido a un péptido correspondiente a un fragmento de proteína de unión a doble hebra (DSP) (parte subrayada, sin negrita), unido al extremo N-terminal de polimerasa Taq de tipo silvestre. La secuencia de nucleótidos completa se denomina SEC ID N° 5.

La **Figura 7** representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión (SEC ID N° 6) que consiste en el fragmento modificado de marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) (negrita y subrayado) unido a un péptido correspondiente a un fragmento de proteína de unión a doble hebra (DSP) (parte subrayada, sin negrita), unido al extremo N-terminal de polimerasa Taq de tipo silvestre.

La **Figura 8** representa la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 7) que codifica una marca peptídica que consiste en el fragmento modificado de marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) (negrita y subrayado) unido a un péptido correspondiente a un fragmento de proteína de unión a doble hebra (DSP) (parte subrayada, sin negrita).

La **Figura 9** representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 8) de un péptido marca que consiste en el fragmento modificado de marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) (negrita y subrayado) unido a un péptido correspondiente a un fragmento de proteína de unión a doble hebra (DSP) (parte subrayada, sin negrita).

La **Figura 10** representa la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 9) que codifica un péptido marca DSP.

La **Figura 11** representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 10) de la marca DSP.

La **Figura 12** representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 11) de un polipéptido de fusión del fragmento modificado de marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) (negrita y subrayado) unido a un polipéptido de polimerasa Tgo unido a un péptido DSP (parte subrayada, sin negrita).

La **Figura 13** representa la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 12) que codifica un polipéptido de fusión del fragmento modificado de marca peptídica de la Figura 2 (SEC ID N° 1) (negrita y subrayado) unido a un polipéptido de polimerasa Tgo, que está unido a un péptido DSP (parte subrayada, sin negrita).

La **Figura 14** representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 13) de un fragmento del péptido de la SEC ID N° 1.

La **Figura 15** representa un gel de electroforesis que muestra la amplificación de ADN a partir de ADN genómico de cebada usando una diversidad de polimerasas.

La **Figura 16** representa una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 14) de un fragmento modificado del péptido de la SEC ID N° 1.

La **Figura 17** representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 15) que codifica el péptido de 36 aminoácidos (SEC ID N° 14).

La **Figura 18** representa una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 16) de un fragmento modificado del péptido de la SEC ID N° 1.

La **Figura 19** representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 17) que codifica el péptido de 40 aminoácidos (SEC ID N° 16).

La **Figura 20** representa una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 18) de un fragmento modificado del péptido de la SEC ID N° 1.

La **Figura 21** representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 19) que codifica el péptido de 29 aminoácidos

(SEC ID N° 18).

La **Figura 22** representa una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 20) de un fragmento modificado del péptido de la SEC ID N° 1 unido a un polipéptido de eritropoyetina humana.

La **Figura 23** representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 21) que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 20.

La **Figura 24** representa una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 22) de un fragmento modificado del péptido de la SEC ID N° 1 unido a un factor inhibidor de leucemia humana.

La **Figura 25** representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 23) que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 22.

La **Figura 26** representa un gel de electroforesis que muestra la amplificación de ADN a partir de ADN genómico de ratón usando mezclas de marca peptídica-polimerasa.

Descripción detallada de la invención

Resumen

La presente descripción proporciona composiciones y métodos que potencian la estabilidad de las proteínas (por ejemplo, enzimas termoestables, enzimas no termoestable) después de exposición a corto plazo o largo plazo a una temperatura entre -20 °C y +50 °C o de aproximadamente -20 °C a +35 °C. Las composiciones pueden ser marcas peptídicas o proteínas de fusión que comprenden marcas peptídicas. Las proteínas pueden ser cualquier tipo de proteína. Las marcas peptídicas pueden ayudar a la retención de la estructura, estabilidad, actividad enzimática, actividad de unión, y cualquier otra propiedad de la proteína. En algunas realizaciones, las proteínas son proteínas de unión a ácido nucleico. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión muestran estabilidad o actividad enzimática potenciada en comparación con una proteína similar que no tiene la marca, especialmente después de exposición a corto plazo o largo plazo a una cierta temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente). También se describen en este documento polipéptidos de fusión que potencian la actividad (por ejemplo, sensibilidad, rendimiento, especificidad) de otras proteínas, cuando los polipéptidos de fusión se mezclan junto con dichas proteínas en una muestra de reacción. También se proporcionan vectores para las composiciones descritas en este documento, kits, así como métodos para usar las composiciones.

Marcas peptídicas

Las composiciones descritas en este documento incluyen péptidos (por ejemplo, un péptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 (Figura 2), SEC ID N° 8 (Figura 9), SEC ID N° 10 (Figura 11), SEC ID N° 13 (Figura 14), SEC ID N° 14 (Figura 16) que potencia la estabilidad de un polipéptido (por ejemplo, enzima, polimerasa Taq), y variantes, mutantes, y fragmentos del mismo.

Como se usa en este documento, potenciar o aumentar la estabilidad de un polipéptido se refiere a, por ejemplo, mantener la estabilidad del polipéptido, inhibir la degradación del polipéptido, inhibir la desnaturalización del polipéptido, inhibir la pérdida de actividad proteica (por ejemplo, actividad enzimática u hormonal) del polipéptido, inhibir la agregación del polipéptido, inhibir la cristalización del polipéptido, inhibir la absorción del polipéptido, conservar la función del polipéptido, o conservar la estructura primaria, secundaria, o terciaria del polipéptido.

La SEC ID N° 1 (Figura 2) muestra la secuencia de aminoácidos de una forma larga (42 aminoácidos) de marca peptídica descrita en este documento. La SEC ID N° 13 (Figura 14) describe un fragmento de 31 aminoácidos de la SEC ID N° 1, que también puede usarse como marca peptídica para los polipéptidos, polipéptidos de fusión, composiciones, y métodos descritos en este documento. La SEC ID N° 14 (Figura 16) describe un fragmento de 36 aminoácidos de la SEC ID N° 1, que también puede usarse como marca peptídica para los polipéptidos, polipéptidos de fusión, composiciones, y métodos descritos en este documento. La SEC ID N° 1, SEC ID N° 13, y SEC ID N° 14 pueden usarse individualmente, juntas, o en combinación con otras marcas, para potenciar la estabilidad, afinidad de unión, actividad enzimática, rendimiento, u otra propiedad de un polipéptido.

La SEC ID N° 10 describe la secuencia de un fragmento de una proteína de unión a ADN bicatenario (DSP). El péptido de la SEC ID N° 10 también puede usarse en las composiciones y métodos descritos en este documento, en sí mismo, o con la marca peptídica de la SEC ID N° 1, u otra marca peptídica descrita en este documento. Por ejemplo, la Figura 7 (SEC ID N° 6) proporciona un ejemplo de una polimerasa unida a un fragmento de la SEC ID N° 1 y a un fragmento de la SEC ID N° 10. La Figura 12 (SEC ID N° 11) proporciona un ejemplo de una polimerasa (aquí, polimerasa tgo) que está unida tanto a un fragmento de la SEC ID N° 1 como a un fragmento de DSP, la SEC ID N° 10, que se describe como la secuencia sin negrita, subrayada en la SEC ID N° 11 (Figura 12).

Las composiciones también incluyen péptidos que son al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idénticos (u homólogos) a la SEC ID N° 1 (Figura 2). También se describen composiciones que incluyen péptidos que son un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idénticos (u homólogos) a la SEC ID N° 8 (Figura 9), la SEC ID N° 10 (Figura 11), la SEC ID N° 13 (Figura 14), o la SEC ID N° 14 (Figura 16). También se describen composiciones que incluyen péptidos que son al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % idénticos a péptidos codificados por la SEC ID N° 3, SEC ID N° 7, SEC ID N° 9, o SEC ID N° 15.

La marca peptídica puede estar limitada a 50 aminoácidos. El péptido puede estar limitado a 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 aminoácidos.

5 El porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una alineación global que tiene en cuenta la longitud completa del péptido o polipéptido, como se describe por el algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman et al., (1970), J. Mol. Biol. 48:444; Sellers (1974), SIAM J. Appl. Math., 26:787). Parámetros ilustrativos para el análisis FASTA son: ktup=1, penalización por abertura de hueco=10, penalización por extensión de hueco=1, y matriz de sustitución=BLOSUM62.

10 En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden una marca peptídica His, donde la marca peptídica His comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 restos His. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden una marca peptídica His, donde la marca peptídica His comprende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 restos His. En algunas realizaciones, la marca peptídica His comprende de 1 a 5, de 2 a 6, de 3 a 7, de 4 a 8, de 5 a 9, de 6 a 10, de 7 a 11, de 8 a 12, de 9 a 13, de 10 a 14, de 1 a 10, de 2 a 11, de 3 a 12, de 4 a 13, de 5 a 14, de 6 a 15, de 7 a 16, de 8 a 17, de 9 a 19, de 10 a 20, de 1 a 20, de 2 a 19, de 3 a 18, de 4 a 17, de 5 a 16, de 6 a 15, de 7 a 14, de 8 a 13, de 9 a 12, de 10 a 11, de 1 a 6, de 1 a 7, de 1 a 8, de 1 a 9, o de 1 a 10 restos His.

20 En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden una secuencia que puede escindirse por una proteasa. En algunas realizaciones, la marca peptídica comprende un sitio de escisión por proteasa. Ejemplos no limitantes de proteasas y restos de escisión asociados (en paréntesis) incluyen tripsina (Arg o Lys), quimotripsina (Trp, Tyr, Phe, Leu, Met, o His), endoproteinasa Asp-N (Asp), endoproteinasa Arg-C (Arg), endoproteinasa Glu-C (Glu), endoproteinasa Lys-C (Lys), prolina-endopeptidasa (Pro), pepsina (Phe, Tyr, Trp, o Leu), termolisina (Ile, Leu, Val, Ala, Met, o Phe), trombina (Arg), elastasa (Ala o Val), papaína (Leu o Gly), proteinasa K (aminoácidos aromáticos), subtilisina (His, Ser, Asp), y clostripaína (Arg). En algunas realizaciones, las marcas peptídicas comprenden una secuencia que puede escindirse por una carboxipeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa Y, catepsina C, enzima liberadora de acicloaminoácido, y piroglutamato aminopeptidasa. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden un sitio de escisión por proteasa, donde la marca peptídica comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 sitios de escisión por proteasa. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden un sitio de escisión por proteasa, donde el sitio de escisión por proteasa comprende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 sitios de escisión por proteasa. En algunas realizaciones, la marca peptídica comprende de 1 a 5, de 2 a 6, de 3 a 7, de 4 a 8, de 5 a 9, de 6 a 10, de 7 a 11, de 8 a 12, de 9 a 13, de 10 a 14, de 1 a 10, de 2 a 11, de 3 a 12, de 4 a 13, de 5 a 14, de 6 a 15, de 7 a 16, de 8 a 17, de 9 a 19, de 10 a 20, de 1 a 20, de 2 a 19, de 3 a 18, de 4 a 17, de 5 a 16, de 6 a 15, de 7 a 14, de 8 a 13, de 9 a 12, de 10 a 11, de 1 a 6, de 1 a 7, de 1 a 8, de 1 a 9, o de 1 a 10 sitios de escisión por proteasa. En algunos casos el sitio de escisión por proteasa tiene la secuencia: DDDDK. En algunos casos, el sitio de escisión por proteasa tiene al menos cuatro restos "D". El sitio de escisión por proteasa puede ser al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % idéntico a la secuencia DDDDK. En algunos casos, la marca peptídica puede comprender una secuencia que se parece a un sitio de escisión por proteasa, pero no servir realmente como un sitio de escisión proteolítica. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden una marca D (Asp), donde la marca peptídica comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 restos Asp, por ejemplo, DD, DDD, DDDD, etc. En algunas realizaciones, la marca Asp comprende al menos 4 restos Asp. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas proporcionadas en este documento comprenden una marca Asp con no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 restos Asp. En algunas realizaciones, la marca Asp comprende de 1 a 5, de 2 a 5, de 3 a 7, de 4 a 8, de 5 a 9, de 6 a 10, de 7 a 11, de 8 a 12, de 9 a 13, de 10 a 14, de 1 a 10, de 2 a 11, de 3 a 12, de 4 a 13, de 5 a 14, de 6 a 15, de 7 a 16, de 8 a 17, de 9 a 19, de 10 a 20, de 1 a 20, de 2 a 19, de 3 a 18, de 4 a 17, de 5 a 16, de 6 a 15, de 7 a 14, de 8 a 13, de 9 a 12, de 10 a 11, de 1 a 6, de 1 a 7, de 1 a 8, de 1 a 9, o de 1 a 10 restos Asp. En algunas realizaciones, la marca peptídica comprende una marca His (como se describe en este documento) y una marca Asp. En algunas realizaciones, uno o más restos Asp está sustituido con otro aminoácido (por ejemplo, uno o más restos Glu). En algunas realizaciones, la marca His está sustituida con uno o más aminoácidos (por ejemplo, Lys o Arg).

55 Todas las referencias a polipéptidos, proteínas y péptidos, como se usa en este documento, se refieren a un polímero de restos de aminoácido. Es decir, una descripción referida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de una proteína, y viceversa. Las expresiones se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural así como polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácido es un aminoácido de origen no natural, por ejemplo, un análogo de aminoácido. Como se usa en este documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), donde los restos de aminoácido están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

60 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y de origen no natural, así como análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de un modo similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina) y pirolisina y selenocisteína. Análogos de aminoácido se refiere

a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, en un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, tal como, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (tales como, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.

Como se usa en este documento, la expresión "aminoácido no natural" o "aminoácido codificado de forma no natural" se refiere a cualquier aminoácido, aminoácido modificado, y/o análogo de aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes de origen natural o selenocisteína o pirrolisina. Otros términos que pueden usarse como sinónimos con la expresión "aminoácido codificado de forma no natural" y "aminoácido no natural" son "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural", y versiones diversamente compuestas y no compuestas de las mismas. La expresión "aminoácido codificado de forma no natural" también incluye, aunque sin limitación, aminoácidos que aparecen por modificación (por ejemplo, modificaciones post-traduccionales) de un aminoácido codificado de forma natural (incluyendo aunque sin limitación, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero no se incorporan de forma natural por sí mismos en una cadena polipeptídica creciente por el complejo de traducción. Ejemplos de dichos aminoácidos de origen no natural incluyen, aunque sin limitación, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina, O-fosfotirosina, ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaproico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasaragina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, sigma-N-metilarginina, y otros aminoácidos similares y aminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

El término "péptido" se refiere a un polímero compuesto por uno a aproximadamente 50 restos de aminoácido, variantes estructurales de origen natural relacionadas, y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos unidos mediante enlaces peptídicos.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por al menos aproximadamente 50 restos de aminoácido, variantes estructurales de origen natural relacionadas, y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos mediante enlaces peptídicos. Como se usa en este documento, los polipéptidos proporcionados en este documento pueden ser polipéptidos o proteínas de fusión.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a ácidos nucleicos de origen natural y origen no natural, así como análogos de ácido nucleico que funcionan de un modo similar a los ácidos nucleicos de origen natural. Los ácidos nucleicos pueden seleccionarse entre ARN, ADN o moléculas análogas de ácido nucleico, tales como ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados en el azúcar o la estructura. Debe observarse, sin embargo, que otros análogos nucleicos, tales como ácidos péptido nucleicos (PNA) o ácidos nucleicos cerrados (LNA), también son adecuados. Ejemplos de ácidos nucleicos de origen no natural incluyen: bases sustituidas con halógeno, bases sustituidas con alquilo, bases sustituidas con hidroxilo, y bases sustituidas con tiol, así como 5-propinil-uracilo, 2-tio-5-propinil-uracilo, 5-metilcitosina, isoguanina, isocitosina, pseudoisocitosina, 4-tiouracilo, 2-tiouracilo y 2-tiotimina, inosina, 2-aminopurina, N9-(2-amino-6-cloropurina), N9-(2,6-diaminopurina), hipoxantina, N9-(7-desaza-guanina), N9-(7-desaza-8-aza-guanina) y N8-(7-desaza-8-aza-adenina), 2-amino-6-"h"-purinas, 6-amino-2-"h"-purinas, 6-oxo-2-"h"-purinas, 2-oxo-4-"h"-pirimidinas, 2-oxo-6-"h"-purinas, 4-oxo-2-"h"-pirimidinas. Esos formarán dos pares de bases enlazadas por hidrógeno con bases no tioladas y tioladas; respectivamente, 2,4-dioxo y 4-oxo-2-tioxo pirimidinas, 2,4-dioxo y 2-oxo-4-tioxo pirimidinas, 4-amino-2-oxo y 4-amino-2-tioxo pirimidinas, 6-oxo-2-amino y 6-tioxo-2-amino purinas, 2-amino-4-oxo y 2-amino-4-tioxo pirimidinas, y 6-oxo-2-amino y 6-tioxo-2-amino purinas.

El término "aproximadamente", como se usa en este documento, salvo que se indique otra cosa, se refiere a un valor que está no más del 10 % por encima o por debajo del valor que está modificado por el término. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente -20 °C" significa un intervalo de -22 °C a -18 °C. Como otro ejemplo, "aproximadamente 1 hora" significa un intervalo de 54 minutos a 66 minutos.

Enlaces

Las marcas peptídicas proporcionadas en este documento potencian la estabilidad de una proteína (o polipéptido) después de unirse a la proteína de algún modo (por ejemplo, enlace covalente o no covalente). Un péptido (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 1, 8, 10, 13, o 14) se une covalentemente a un polipéptido o enzima (por ejemplo, Taq, Tgo, TAPP, CDA, desaminasa de *Pirococcus horikoshii*). El péptido puede unirse al extremo N-terminal del polipéptido o enzima (por ejemplo, Taq, Tgo, TAPP, CDA, desaminasa de *Pirococcus horikoshii*). Por ejemplo, un péptido que es al menos un 70 % idéntico a un péptido codificado por la SEC ID N° 3 puede unirse al extremo N-terminal de la polimerasa Taq como se representa en la Figura 3. Asimismo, un péptido que es al menos un 70 % idéntico a un péptido codificado por la SEC ID N° 7 puede unirse al extremo N-terminal de la polimerasa Taq como se representa en la Figura 7. En otros casos, el péptido se une al extremo C-terminal de un polipéptido o enzima. Por ejemplo, la Figura 13 representa la secuencia de ácido nucleico de la polimerasa Tgo que se une en el

extremo C-terminal a un fragmento del péptido DSP.

En algunos casos, se unen múltiples marcas peptídicas a un polipéptido descrito en este documento. Un polipéptido puede unirse a múltiples copias de la misma marca peptídica o a dos o más diferentes marcas peptídicas. En algunos ejemplos, una marca peptídica se une al extremo N-terminal del polipéptido, mientras se une una segunda marca peptídica al extremo C-terminal del polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido mostrado en la Figura 12 (SEC ID N° 11) incluye una marca peptídica (SEC ID N° 1) unida al extremo N-terminal de la polimerasa tgo y también una diferente marca peptídica (fragmento de DSP) (parte subrayada de la SEC ID N° 11) fusionada al extremo C-terminal de la polimerasa tgo. En otros ejemplos más, se unen dos o más (iguales o diferentes) marcas en tándem a un polipéptido. Por ejemplo, la Figura 7 (SEC ID N° 6) representa un fragmento de la SEC ID N° 1 unido al péptido DSP de la SEC ID N° 10 (Figura 11), que después se une a otro fragmento de la SEC ID N° 1, que se une al extremo N-terminal de la polimerasa Taq.

En algunos casos, las marcas peptídicas se proporcionan en este documento directamente unidas entre sí y/o al polipéptido. La Figura 7 muestra un ejemplo de marcas directamente unidas entre sí, y después directamente unidas a un polipéptido. En otros casos, las marcas se separan entre sí por un enlazador (por ejemplo, enlazador peptídico o enlazador descrito en este documento). Las marcas también pueden unirse al polipéptido mediante un enlazador.

En algunas realizaciones, un péptido se une al polipéptido o enzima (por ejemplo, polimerasa) mediante ingeniería genética. Por ejemplo, se crea una construcción de ADN que es capaz de expresar un polipéptido que comprende el péptido (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 1) fusionado a una enzima (por ejemplo, polimerasa Taq). Un ejemplo de una parte de la secuencia de ácido nucleico de dicha construcción se representa en la Figura 5 (SEC ID N° 4). Otro ejemplo se representa en Figura 6, SEC ID N° 5, y otro más se representa en la Figura 13 (SEC ID N° 12).

En algunos casos se une un polipéptido (por ejemplo, polimerasa, polimerasa Taq, etc.) a un péptido que comprende un fragmento (también mencionado en este documento como "porte") de proteína de unión a doble hebra (DSP) (SEC ID N° 6, parte subrayada pero sin negrita), o variantes, fragmentos, o mutantes de la misma. En algunos casos el fragmento de DSP se une a una marca peptídica (por ejemplo, a un péptido que es la SEC ID N° 1 o 13, o mutantes o variantes de las mismas). En otros casos más, el péptido (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 1 o 13) se une a un fragmento de una polimerasa, que se une a una segunda polimerasa.

En algunas realizaciones, un péptido también puede unirse a la enzima a través de un enlazador, tal como un enlazador peptídico. El enlazador de secuencia peptídica puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de 10 aminoácidos de longitud. Ejemplos son polipéptidos que contienen múltiples restos de aspartato o glutamato. La secuencia y longitud de un péptido apropiado pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo empleando un programa de software de predicción de enlazadores peptídicos para identificar enlazadores potenciales. Un ejemplo de dicho programa de enlazadores se describe en George y Heringa, (2003), Protein Engineering, 15(11):871-879.

En otros casos más, un péptido (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 1) se une a una enzima mediante un enlace no covalente. Ejemplos de enlazadores que pueden ser útiles incluyen: enlazadores inestables en ácido, enlazadores éster, enlazadores hidrazona, enlazadores que contienen sulfonamida, enlazadores que se pueden escindir ezimáticamente, o enlazadores basados en polímero. Los enlazadores basados en polímero, tales como polietilenglicol (PEG, Fórmula VI), se usan ampliamente para conjugar fármacos tanto de molécula pequeña como de molécula grande. Cuando se usa para unir un péptido a un agente terapéutico, los polipéptidos conjugados a PEG pueden ofrecer varias ventajas deseables incluyendo mayor solubilidad, menos inmunogenicidad, semi-vida mejorada, suministro dirigido y actividad potenciada de los fármacos.

Muchas moléculas con múltiples grupos reactivos pueden servir como componentes de reticulación útiles y están disponibles en el mercado en compañías como Sigma-Aldrich, o Pierce. Son de particular utilidad los componentes de reticulación que están disponibles en forma activada y pueden usarse directamente para conjugación. Los componentes de reticulación pueden comprender múltiples grupos reactivos con estructura química similar o idéntica. Dichos grupos reactivos pueden activarse y acoplarse simultáneamente a múltiples componentes no de reticulación idénticos provocando la formación directa de productos homomultiméricos. Ejemplos de componentes de reticulación con múltiples grupos reactivos similares son ácido cítrico, EDTA, TSAT. También pueden ser útiles moléculas de PEG ramificadas que contienen múltiples grupos reactivos idénticos.

Existe una gran cantidad de productos químicos específicos que funcionan conforme a la siguiente reducida cantidad de esquemas básicos de reacción, todos los cuales se describen en detalle en www.piercenet.com. Ejemplos de agentes útiles de reticulación son imidoésteres, halógenos activos, maleimida, piridil disulfuro, y NHS-ésteres. Los agentes de reticulación homobifuncionales tienen dos grupos reactivos idénticos y se usan a menudo en un procedimiento de reticulación química de una etapa. Ejemplos son BS3 (un análogo de DSS no escindible soluble en agua), BSOCOES (base-reversible), DMA (dimetil adipimidato-2HCl), DMP (dimetil pimelimidato-2HCl), DMS (dimetil suberimidato-2HCl), DSG (análogo de 5-carbonos de DSS), DSP (reactivo de Lomant), DSS (no escindible), DST (escindible por agentes oxidantes), DTBP (dimetil 3,3'-ditiobispropionimidato-2HCl), DTSSP, EGS,

sulfo-EGS, THPP, TSAT, DFDNB (1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno) es especialmente útil para reticular entre distancias espaciales pequeñas (Koblatt, J.A. y Lake, D.F. (1980). Cross-linking of cytochrome oxidase subunits with difluorodinitrobenzene. Can J. Biochem. 58, 219-224).

- 5 Los agentes de reticulación homobifuncionales sulfhidrilo-reactivos son reticulantes de proteína homobifuncional que reaccionan con sulfhidrilos y se basan a menudo en maleimidadas, que reaccionan con grupo SH a pH 6,5-7,5, formando enlaces tioéter estables. BM[PEO]3 es un espaciador poliéter de 8 átomos que reduce el potencial de precipitación del conjugado en aplicaciones de reticulación sulfhidrilo-a-sulfhidrilo. BM[PEO]4 es similar pero con un espaciador de 11 átomos. BMB es un reticulante no escindible con un espaciador de cuatro carbonos. BMDB crea un enlace que puede escindirse con peryodato. BMH es un reticulante sulfhidrilo-reactivo homobifuncional ampliamente usado. BMOE tiene un enlazador especialmente corto. DPDPB y DTME son reticulantes escindibles. HVBS no tiene el potencial de hidrólisis de las maleimidadas. TMEA es otra opción. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos diferentes grupos reactivos. Ejemplos son NHS-ésteres y aminas/hidrazinas mediante activación EDC, AEDP, ASBA (foto-reactivo, yodable), EDC (carbodiimida soluble en agua). Son reticulantes bifuncionales amina-sulfhidrilo reactivos AMAS, APDP, BMPS, EMCA, EMCS, GMBS, KMUA, LC-SMCC, LC-SPDP, MBS, SBAP, SIA (extra corto), SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, SMPT, SPDP, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-LC-SMPT, sulfo-LC-SPDP, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB. Agentes de reticulación heterobifuncionales grupo amino-reactivos ANB-NOS, MSA, NHS-ASA, SADP, SAED, SAND, SANPAH, SASD, SFAD, sulfo-HSAB, sulfo-NHS-LC-ASA, sulfo-SADP, sulfo-SANPAH, TFCS. Son agentes de reticulación arginina-reactivos, por ejemplo APG, que reacciona específicamente con argininas a pH 7-8.

Algunas propiedades de las marcas peptídicas

- 25 En algunos casos, el péptido posibilita que una enzima muestre al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de la actividad de la misma enzima o similar que no está unida al péptido. En algunos casos, el péptido posibilita que una enzima muestre al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de su actividad enzimática antes de exposición a largo plazo o corto plazo a una temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente, cualquier temperatura por encima de -20 °C). En algunos casos, el péptido posibilita que un polipéptido muestre al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de su afinidad de unión en comparación con su afinidad de unión antes de exposición a largo plazo o corto plazo a una temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente, cualquier temperatura por encima de -20 °C).

- 35 En algunos casos, una polipéptido de proteína de fusión descrito en este documento puede potenciar la actividad de otros polipéptidos en una mezcla de reacción. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido de fusión (por ejemplo, un polipéptido de fusión codificado por la SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, o SEC ID N° 12), potencia la sensibilidad, especificidad, fidelidad, o rendimiento de una reacción. Por ejemplo, un polipéptido de fusión con actividad ADN polimerasa (por ejemplo, SEC ID N° 2, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 11) puede añadirse a una muestra que contiene una segunda (diferente) ADN polimerasa (por ejemplo, polimerasa Taq, la fusión Taq de la SEC ID N° 2, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 11), y potencia de este modo la especificidad, fidelidad, sensibilidad o rendimiento de la segunda ADN polimerasa. En algunos casos, la potenciación es de más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 2000 %, 2500 %, 3000 %, 4000 %, o 5000 %. En algunos casos, el polipéptido de fusión también potencia la especificidad, fidelidad o rendimiento de una tercera polimerasa, o de una mezcla de reacción que contiene tres o más polimerasas.

- 50 Las marcas peptídicas descritas en este documento pueden potenciar la estabilidad, actividad enzimática, u otra propiedad de un polipéptido de fusión después de exposición a corto o largo plazo a una cierta temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente). Por ejemplo, una polimerasa (por ejemplo, polimerasa Taq) puede perder una parte sustancial de su actividad lose después de exposición a temperatura ambiente durante un periodo de una semana o más, o incluso un día o más o tres horas o más.

- 55 Una composición descrita en este documento (por ejemplo, un péptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 (Figura 2), de la SEC ID N° 8 (Figura 9), o de la SEC ID N° 10 o 13) puede unirse a la enzima o polimerasa (por ejemplo, polimerasa Taq, polimerasa TGO) y posibilitar de este modo que la enzima o polimerasa retenga la actividad después de su exposición a una temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente) en el tiempo. En algunos casos, un péptido se une a una polimerasa (por ejemplo, polimerasa Taq) y posibilita de este modo que la polimerasa retenga al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de su actividad, incluso después de exposición a largo plazo o corto plazo a una cierta temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente de aproximadamente 20 °C a 22 °C). En algunos casos, el péptido se une a una polimerasa o enzima que no es polimerasa Taq.

- 65 Las marcas peptídicas descritas en este documento también pueden potenciar la capacidad de un polipéptido (por ejemplo, polimerasa) de unirse a ADN monocatenario y/o ADN bicatenario. A menudo, dicha unión a ADN es no

específica. En algunos casos, la potenciación es de más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 2000 %, 2500 %, 3000 %, 4000 %, o 5000 %. La marca peptídica DSP representada en la SEC ID N^o 10 y fragmentos, variantes, y mutantes de la misma, puede ser especialmente adecuada para potenciar la capacidad de unión no específica a ADN bicatenario o monocatenario de un polipéptido.

Los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones pueden retener la actividad de los mismos a una temperatura entre -20 °C y 50 °C. Los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones pueden retener la actividad de los mismos a una temperatura entre -15 °C y 50 °C; entre -10 °C y 50 °C; entre -5 °C y 50 °C; entre 0 °C y 50 °C; entre 5 °C y 50 °C; entre 10 °C y 50 °C; entre 15 °C y 50 °C; entre 20 °C y 50 °C; entre 20 °C y 45 °C; entre 20 °C y 40 °C; entre 20 °C y 35 °C; entre 20 °C y 30 °C; entre 20 °C y 25 °C; entre 20 °C y 22 °C; entre 15 °C y 25 °C; entre 10 °C y 25 °C; entre 5 °C y 25 °C; entre 0 °C y 25 °C; entre 0 °C y 30 °C; entre 0 °C y 35 °C; entre 0 °C y 40 °C; entre 0 °C y 45 °C; entre 5 °C y 10 °C; entre 5 °C y 15 °C; entre 5 °C y 20 °C; entre 5 °C y 25 °C; entre 5 °C y 30 °C; entre 5 °C y 35 °C; entre 5 °C y 40 °C; entre 5 °C y 45 °C; entre 10 °C y 15 °C; entre 10 °C y 20 °C; entre 10 °C y 25 °C; entre 10 °C y 30 °C; entre 10 °C y 35 °C; entre 10 °C y 40 °C; entre 10 °C y 45 °C; entre 15 °C y 20 °C; entre 15 °C y 30 °C; entre 15 °C y 35 °C; entre 1 °C y 40 °C; entre 15 °C y 45 °C.

En algunos casos, el polipéptido de fusión (por ejemplo, proteína de fusión de la SEC ID N^o 2, 6, u 11) se expone a una temperatura que es de al menos aproximadamente -20 °C, -19 °C, -18 °C, -17 °C, -16 °C, -15 °C, -14 °C, -13 °C, -12 °C, -11 °C, -10 °C, -9 °C, -8 °C, -7 °C, -6 °C, -5 °C, -4 °C, -3 °C, -2 °C, -1 °C, 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, o 50 °C y después retiene un cierto porcentaje de su estabilidad, actividad, sensibilidad, fidelidad, rendimiento, u otra propiedad. La exposición a la temperatura puede ser a corto plazo o largo plazo. La exposición a una temperatura puede ser durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 minutos. La exposición a la temperatura puede ser durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas, o durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. En algunos casos, la temperatura es temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a 22 °C). En algunos casos, la polimerasa se expone a temperatura ambiente durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas. Por ejemplo, la polimerasa (por ejemplo, Taq) puede exponerse a temperatura ambiente o al menos 35 °C durante al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 10 semanas, o al menos 15 semanas.

En un ejemplo, la Figura 1 representa la actividad de una polimerasa Taq fusionada a un péptido después de almacenamiento a -20 °C o después de almacenamiento a +35 °C durante 4 semanas. El panel superior muestra la actividad polimerasa cuando la polimerasa se almacena a -20 °C; el panel inferior muestra la actividad polimerasa del péptido-polipéptido de fusión después de almacenarse a 35 °C durante 4 semanas. Como se muestra en la Figura 1, la enzima de fusión de polimerasa Taq muestra actividad similar después de almacenarse en ambas condiciones.

Polipéptidos

Una composición descrita en este documento (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N^o 1, SEC ID N^o 8 o SEC ID N^o 10 o SEC ID N^o 13, o fragmentos, variantes, o mutantes de las mismas) puede unirse a una diversidad de polipéptidos, proteínas, enzimas, o péptidos.

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a cualquier enzima útil para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método de K. B. Mullis, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos N^o 4.683.195, 4.683.202, y 4.965.188 y cualquier otro método mejorado conocido en la técnica. La PCR es un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de DNA sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana normalmente consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores oligonucleotídicos a la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia precisa de ciclado térmico en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus hebras respectivas de la secuencia diana bicatenaria. Para realizar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y los cebadores después hibridan con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Después de la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa de modo que se forma un nuevo par de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión por polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, la desnaturalización, hibridación y extensión constituyen un ciclo) para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada.

En algunas realizaciones, pueden unirse diversas polimerasas a las marcas peptídicas de acuerdo con las reivindicaciones. Dichas polimerasas incluyen polimerasa Taq (útil por ejemplo en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), ADN polimerasa I (útil por ejemplo en ensayos de traslado de mella y extensión de

cebador), polimerasa Klenow (útil por ejemplo en marcaje de cebador aleatorio), desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (útil por ejemplo para marcaje de extremo 3'), transcriptasa inversa (por ejemplo, para sintetizar ADN a partir de moldes de ARN) u otras polimerasas tales como ARN polimerasa SP6, ARN polimerasa T3 y ARN polimerasa T7 para transcripción in vitro.

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a ADN polimerasa dependiente de ADN, que es una enzima que sintetiza una copia complementaria de ADN a partir de un molde de ADN añadiendo un nucleótido al extremo 3' de una hebra de reciente formación. Algunas ADN polimerasas también tienen capacidad de corrección de errores, que se confiere por la actividad 3' a 5' exonucleasa.

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas dependientes de ADN proporcionadas en este documento pueden ser enzimas de origen natural aisladas de bacterias o bacteriófagos o expresadas de forma recombinante, o pueden estar modificadas o tener formas desarrolladas que se han modificado por ingeniería para poseer ciertas características deseables, por ejemplo, termoestabilidad, o la capacidad de reconocer o sintetizar una hebra de ADN a partir de diversos moldes modificados. Las ADN polimerasas dependientes de ADN requieren un cebador complementario para iniciar la síntesis. Se sabe que en condiciones adecuadas una ADN polimerasa dependiente de ADN puede sintetizar una copia complementaria de ADN a partir de un molde de ARN. Las ADN polimerasas dependientes de ARN (descritas en este documento) normalmente tienen también actividad ADN polimerasa dependiente de ADN.

Ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, ADN polimerasa de *Thermococcus littoralis*, ADN polimerasa de bacteriófago T7, polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo), polimerasa Pfu, fragmento Klenow de ADN polimerasa de *E. coli*, ADN polimerasa Tma, ADN polimerasa exo-Tli, ADN polimerasa exo-KOD, ADN polimerasa exo-JDF-3, ADN polimerasa exo-PGB-D, ADN polimerasa U1Tma (N-truncada) de *Thermatoga maritima*, o ADN polimerasas de bacteriófagos T4, Phi-29, M2, o T5.

En algunas realizaciones, donde sea deseado, pueden unirse polimerasas estables a temperatura a una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 4.889.818 que describe una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus*. Polimerasas estables a temperatura representativas adicionales incluyen sin limitación, por ejemplo, polimerasas extraídas de bacterias tales como ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermococcus gorgonarius* (Tgo), *Pirococcus horikoshii*, *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus woesei*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (que tiene temperatura óptima algo inferior que las otras enumeradas), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*, *Thermococcus littoralis*, y *Metanotermus fervidus*.

En algunos casos, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones se une a una enzima termoestable que puede tener o no necesariamente actividad polimerasa (por ejemplo, pirofosfatasa de *Thermoplasma acidophilum* (TAPP), pirofosfatasa, dCTP desaminasa (CDA), desoxicitidina desaminasa, citidina desaminasa, ARN desaminasa, ADN desaminasa). En algunos casos, una marca peptídica (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 1 o 8), se une a un polipéptido no termoestable (por ejemplo, factor inhibidor de leucemia humana (hLIF), leptina).

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a polimerasas que muestran actividad de desplazamiento de hebra (también conocida como polimerización en círculo rodante). El desplazamiento de hebra puede provocar la síntesis de copias en tándem de un molde de ADN circular, y es particularmente útil en reacción isotérmica de PCR. Ejemplos no limitantes de polimerasas adecuadas de círculo rodante proporcionadas en este documento incluyen aunque sin limitación ADN polimerasa T5 (Chatterjee et al., Gene 97:13-19 (1991)), y holoenzima ADN polimerasa T4 (Kaboord y Benkovic, Curr. Biol. 5:149-157 (1995)), ADN polimerasa de fago M2 (Matsumoto et al., Gene 84:247 (1989)), ADN polimerasa de fago PRD1 (Jung et al., Proc. Natl. Aced Sci. USA 84:8287 (1987), y Zhu e Ito, Biochim. Biophys. Acta. 1219:267-276 (1994)), fragmento Klenow de ADN polimerasa I (Jacobsen et al., Eur. J. Biochem. 45:623-627 (1974)).

Un ejemplo de una clase de polimerasas de círculo rodante utiliza cebado de proteína como modo para iniciar la replicación. Polimerasas ejemplares de esta clase son ADN polimerasas modificadas y no modificadas, elegidas o derivadas de los fagos γ 29, PRD1, Cp-1, Cp-5, Cp-7, γ 15, γ 1, γ 21, γ 25, BS 32 L17, PZE, PZA, Nf, M2Y (o M2), PR4, PR5, PR722, B103, SF5, GA-1, y miembros relacionados de la familia Podoviridae.

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a una ARN polimerasa dependiente de ADN o transcriptasa, que es una enzima que sintetiza múltiples copias de ARN a partir de una molécula de ADN bicatenaria o parcialmente bicatenaria que tiene una secuencia promotora que es habitualmente bicatenaria. Las moléculas de ARN se sintetizan en la dirección 5'-a-3' empezando en una posición específica justo cadena abajo del promotor. Ejemplos de transcriptasas son la ARN polimerasa dependiente de ADN de *E. coli* y bacteriófagos T7, T3, y SP6.

En algunas realizaciones, una marca peptídica descrita en este documento puede unirse a una ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa inversa (RT), que es una enzima que sintetiza una copia complementaria de

ADN a partir de un molde de ARN. En este método, la transcripción inversa se acopla a PCR, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos 5.322.770. En RT-PCR, el molde de ARN se convierte en ADNc debido a la actividad transcriptasa inversa de una enzima, y después se amplifica usando la actividad de polimerización de la misma enzima o una diferente. Todas las transcriptasas inversas conocidas también tiene la capacidad de crear una copia complementaria de ADN a partir de un molde de ADN; por tanto, son ADN polimerasas dependientes tanto de ARN como de ADN. Las RT también pueden tener una actividad RNasa H. Pueden usarse transcriptasas inversas y polimerasas tanto termoestables como termolábiles.

Puede obtenerse una transcriptasa inversa común del virus de la leucemia murina de Maloney (MMLV-RT). Las marcas peptídicas descritas en este documento pueden unirse a polipéptidos que tienen actividad transcriptasa inversa incluyendo, aunque sin limitación: transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Maloney (M-MLV), transcriptasa inversa del virus de sarcoma de Rous (RSV), transcriptasa inversa del virus de mieloblastosis de aves (AMV), transcriptasa inversa del virus asociado a Rous (RAV), transcriptasa inversa del virus asociado a mieloblastosis (MAV), transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), transcriptasa inversa, transcriptasa inversa retroviral del virus de sarcoma-leucosis de aves (ASLV), transcriptasa inversa de retrotransposón, transcriptasa inversa de hepatitis B, transcriptasa inversa del virus del mosaico de la coliflor, transcriptasa inversa bacteriana, ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne), ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma), ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli o VENTR™), ADN polimerasa de *Pirococcus furiosus* (Pfu), DEEPVENT™, ADN polimerasa GB-D de especies *Pirococcus*, ADN polimerasa de *Pirococcus woosii* (Pwo), ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst), ADN polimerasa de *Bacillus caldophilus* (Bca), ADN polimerasa de *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), ADN polimerasa de *Thermoplasma acidophilum* (Tac), ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl/Tub), ADN polimerasa de *Thermus ruber* (Tru), ADN polimerasa de *Thermus brockianus* (DYNAZYME™), ADN polimerasa de *Metanobacterium thermoautotrophicum* (Mth), y mutantes, variantes y derivados de las mismas.

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a una amilasa. Ejemplos no limitantes de amilasas incluyen aquellas de *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Myceliophthora thermophila*, *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus woesei*, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermococcus aggregans*, *Thermococcus fumicolans*, *Thermococcus hydrothermalis*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermococcus profundus*, *Bacillus cicularis*, *Bacillus cereus* var. *Mycoides*, y *Clostridium thermosulphurogenes*.

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a una pululanasa. Ejemplos no limitantes de pululanasas incluyen aquellas de *Bacillus* sp., *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus woei*, *Thermococcus aggregans*, *Thermus caldophilus* Gk24, *Thermococcus celer*, *Thermococcus hydrothermalis*, *Thermococcus litoralis*, y *Thermotoga maritima* MSB8.

En algunas realizaciones, una marca peptídica descrita en este documento puede unirse a una xilanasa. Ejemplos no limitantes de xilasas incluyen aquellas de *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus* sp. cepa SPS-0, *Bacillus subtilis*, *Clostridium abosurn*, *Dictyoglomus* sp. cepa B₁, *Fusarium proliferatum*, *Pirococcus furiosus*, *Scytalidium thermophilum*, *Streptomyces* sp. cepa S38, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Thermotoga maritima* MSB8, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga* sp. cepa FJSS3-B1, y *Thermotoga thermarum*.

En algunas realizaciones, una marca peptídica descrita en este documento puede unirse a una celulasa. Ejemplos no limitantes de celulasas incluyen aquellas de *Anaerocellum thermophilum*, *Bacillus subtilis*, *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus horikoshi*, *Rhodothermus marinus*, *Thermotoga maritima* MSB8, y *Thermotoga neapolitana* (endocelulasa A o B).

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a una enzima proteolítica. Ejemplos no limitantes de enzimas proteolíticas incluyen aquellas de *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus* sp. JB-99, *Bacillus stearothermophilus* TP26, *Bacillus* sp. N° AH-101, *Bacillus thermoruber*, *Pirococcus* sp. KOD1, *Staphylothermus marinus*, *Thermoacidophiles*, *Thermococcus aggregans*, *Thermococcus celer*, *Thermococcus litoralis*, y *Thermotoga maritima*.

En algunas realizaciones, una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones puede unirse a una lipasa. Ejemplos no limitantes de lipasas incluyen aquellas de *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus* sp. RSJ-1, *Bacillus* sp. J33, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenletus*, *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Geobacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pirobaculum calidifontis*, *Pirococcus furiosus*, y *Pirococcus horikoshii*.

En algunos casos, una o más de las siguientes polimerasas se unen a una marca peptídica codificada por la SEC ID N° 3, por la SEC ID N° 7, o por la SEC ID N° 9, u otra marca peptídica descrita en este documento: ADN polimerasa G46E E678G CS5, ADN polimerasa G46E L329A E678G CS5, ADN polimerasa G46E E678G CS6, ADN polimerasa Δ ZO5R, polimerasa ZOS, ADN polimerasa E615G Taq, polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl) (por ejemplo, una polimerasa Tfl modificada que incorpora los nucleótidos terminadores T descritos en este documento), polimerasa de

Thermatoga maritime o Tma-25, polimerasa Tma-30, ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa Pfx, polimerasa SPS-17 de especie *Thermus*, polimerasa Taq E615G, polimerasa de *Thermus* ZO5R, ADN polimerasa de T7, ADN polimerasa I de Kornberg o ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa Klenow, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa de *Micrococcus*, ADN polimerasa alfa, transcriptasa inversa, transcriptasa inversa de AMV, transcriptasa inversa de M-MuLV, ADN polimerasa, ARN polimerasa, ARN polimerasa de *E. coli*, ARN polimerasa SP6, ARN polimerasa T3, ADN polimerasa T4, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa II, transferasa terminal, polinucleótido fosforilasa (PNP), ADN polimerasa que incorpora ribonucleótido, o similares. En algunos casos, se une una enzima con corrección de errores a un polipéptido codificado por la SEC ID N° 3, o a un polipéptido codificado por la SEC ID N° 7. Puede unirse cualquier polimerasa alternativa (por ejemplo, una polimerasa descrita en este documento), a un fragmento de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 7 o SEC ID N° 9, por ejemplo, a una proteína de unión a doble hebra (DSP).

En algunas realizaciones, las marcas peptídicas (o estructuras) proporcionadas en este documento también pueden proporcionar estabilidad a polipéptidos que no son polimerasas. Las marcas peptídicas pueden ayudar a la retención de cualquier actividad de un polipéptido, por ejemplo, actividad de unión, actividad enzimática, especialmente cuando el polipéptido se expone a una temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente) durante un cierto periodo de tiempo. Por ejemplo, las marcas peptídicas descritas en este documento pueden unirse a eritropoyetina (EPO) (también conocida como hematopoyetina o hemopoyetina), por ejemplo, para potenciar su estabilidad a temperatura ambiente. La EPO es una hormona glucoproteica que controla la eritropoyesis, o producción de glóbulos rojos. Es una citoquina para precursores de eritrocitos (glóbulos rojos) en la médula ósea. Pueden usarse formas purificadas de EPO para tratar enfermedades tales como anemia o enfermedades neurológicas (por ejemplo, esquizofrenia). Los tipos de EPO disponibles en el mercado incluyen aunque sin limitación eritropoyetina (Epoetin-alfa™) y Darbepoietin-alfa™. Las marcas incluyen, aunque sin limitación: Epogen™, Epoetin™, Procrit™, Eprex™, NeoRecormon™, Darbepoetin™, Epoetin delta™ PDpoetin™, Aranesp™, y Metoxi polietilenglicol-epoetin beta (Mircera™).

La EPO está codificada por un gen de copia única que tiene cinco exones. Los genes de EPO humana y de ratón tienen secuencias un 90 % similares inmediatamente cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción, un 80 % en las regiones codificantes, y un 65 % en el primer intrón. Las localizaciones de intrones y sitios donantes y aceptores de corte y ajuste están conservadas entre los genes de EPO humana y de ratón. El ARNm para EPO contiene regiones no traducidas tanto 5' como 3' y codifica una secuencia peptídica líder y una proteína EPO madura predicha de 166 aminoácidos para ser humano y ratón, y 168 aminoácidos para mono. La forma secretada de EPO humana, la EPO de origen natural recuperada de orina (uh-EPO0) o la EPO recombinante (rh-EPO) expresada en células de ovario de hámster chino (CHO), carece de la arginina C-terminal, que se retira por escisión post-traduccional. La proteína EPO humana madura comprende 165 aminoácidos y tiene un peso molecular de 34 kDa, con restos glucosilo que contribuyen a aproximadamente el 40 % del peso de la molécula. La molécula EPO comprende cuatro hélices que interactúan mediante sus dominios hidrófobos para formar una estructura predominantemente globular dentro de un entorno acuoso (Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866). La EPO humana y murina tiene cuatro cisteínas y la EPO de mono tiene cinco. Existen puentes disulfuro internos en EPO humans, entre Cys7 y Cys161, y entre Cys29 y Cys33. Al menos uno de estos puentes disulfuro es importante en la estructura secundaria.

La EPO inicia la eritropoyesis por unión a la parte extracelular de un homodímero preformado de receptor de eritropoyetina (EPOR) (es decir, (EPOR)₂) de un modo que forma un puente entre localizaciones específicas en las subunidades individuales EPOR. Cuando la EPO se une al (EPOR)₂, grandes partes del ligando globular están alejadas de las regiones de unión y miran hacia afuera, lejos del complejo de EPO y (EPOR)₂ en el medio acuoso. La EPO humana tiene cuatro sitios de glucosilación: un único sitio O-unido en Ser126 y tres sitios N-unidos en Asn24, Asn38, y Asn83. Los sitios de glucosilación N-unidos están conservados en EPO murina y de mono. Las cadenas de oligosacárido de EPO humana son oligosacáridos tetra-antenas sialilados que contienen fucosa, algunos de los cuales contienen N-acetil-lactosaminas repetidas. Los demás oligosacáridos N-unidos son oligosacáridos tri-antenas y bi-antenas.

En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones proporcionados en este documento comprenden EPO en su forma nativa. En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones comprenden EPO con una o más mutaciones. En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones comprenden EPO con una o más mutaciones en los cuatro sitios de glucosilación: un único sitio O-unido en Ser126 y tres sitios N-unidos en Asn24, Asn38, y Asn83. En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones comprenden EPO con una o más mutaciones en las cuatro hélices. En algunas realizaciones, los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones comprenden EPO con una o más mutaciones en los restos que forman los puentes disulfuro: en Cys7, Cys161, Cys29, y Cys33. En algunas realizaciones, las mutaciones EPO pueden comprender sustitución, delección o adición de aminoácidos conservados o no conservados.

En algunas realizaciones, cualquier proteína terapéutica puede unirse a una marca peptídica de acuerdo con las reivindicaciones. Puede encontrarse un resumen de agentes terapéuticos proteicos en Leader et al. (2008) Nature Review/Drug Discovery 7: 21-39. Ejemplos de agentes terapéuticos proteicos incluyen agentes terapéuticos

proteicos con actividad enzimática o reguladora, agentes terapéuticos proteicos con actividad especial de direccionamiento, vacunas proteicas, y agentes de diagnóstico proteicos.

Los polipéptidos, polipéptidos de fusión, o composiciones proporcionados en este documento pueden comprender un péptido o polipéptido cosmético. En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido cosmético incluye, aunque sin limitación, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), trombopoyetina, factor alfa de crecimiento transformante (TGF- α), factor beta de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento placentario, proteína morfogenética ósea humana (BMP), BMP2, BMP7, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), colagenasa, gelatinasa, metaloproteinasas de matriz-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -23A, -23B, -24, -25, -26, -27, o -28.

Ejemplos de agentes terapéuticos proteicos con actividad enzimática o reguladora, incluyen agentes terapéuticos para tratar: trastornos endocrinos (por ejemplo, insulina, hormona del crecimiento (GH) somatotropina, calcitonina de salmón, restos 1-34 de hormona paratiroidea humana); trastornos de hemostasis y trombosis (por ejemplo, factor VIIa, VIII, factor IX, antitrombina III, concentrado de proteína C, activador de plasminógeno tisular (tPA), uroquinasa); deficiencias metabólicas (por ejemplo, beta-gluco-cerebrosidasa, alfa-L iduronidasa); trastornos pulmonares y gastrointestinales (por ejemplo, inhibidor de alfa-1-proteinasa, lactasa, enzimas pancreáticas); trastornos de inmunodeficiencia (por ejemplo, adenosina desaminasa, inmunoglobulinas combinadas); trastornos sanguíneos (por ejemplo, albúmina humana, eritropoyetina, como se describe en este documento); fertilidad (hormona foliculo-estimulante (FSH) humana, gonadotropina coriónica humana (HCH), Lutropina-alfa); inmunorregulación (por ejemplo, interferón (IFN), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), IFN-alfa tipo I, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-gamma beta, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina-5, interleuquina-6, interleuquina-7, interleuquina-8, interleuquina-9, interleuquina-10, interleuquina-11, interleuquina-12, interleuquina-13, interleuquina-14, interleuquina-15, interleuquina-16, interleuquina-17, interleuquina-18, interleuquina-19, interleuquina-20, interleuquina-21, interleuquina-22, interleuquina-23, interleuquina-24, interleuquina-25, interleuquina-26, interleuquina-27, interleuquina-28, interleuquina-29, interleuquina-30, interleuquina-31, interleuquina-32, interleuquina-33, interleuquina-34, interleuquina-35); regulación del crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), trombopoyetina, factor alfa de crecimiento transformante (TGF- α), factor beta de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento placentario, proteína morfogenética ósea humana (BMP), BMP2, BMP7, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)). Otros agentes terapéuticos proteicos incluyen agentes terapéuticos proteolíticos (por ejemplo, tripsina, nesiritida; toxina botulínica tipo A o B, colagenasa, desoxirribonucleasa I humana, dornasa alfa, hialuronidasa, padolor, L-asparaginasa, anticuerpos humanizados (por ejemplo, bevacizumab (Avastin™), rituximab, trastuzumab); enfuvirtida, abcximab, vacunas proteicas (por ejemplo, vacuna HBsAg, vacuna HPV, OspA), e IgG anti-rhesus.

En algunas realizaciones, también pueden unirse agentes de diagnóstico proteicos a las marcas peptídicas de acuerdo con las reivindicaciones. Ejemplos incluyen aunque sin limitación: glucagón, hormona liberadora de hormona de crecimiento, agentes para formación de imágenes para cáncer y otras enfermedades, y antígenos de VIH y antígenos de HCV.

En algunas realizaciones, los polipéptidos unidos a las marcas peptídicas de acuerdo con las reivindicaciones pueden ser proteínas fibrosas o proteínas globulares. Los tipos de proteínas a las cuales pueden unirse las marcas peptídicas incluyen, sin limitación: proteínas del citoesqueleto (por ejemplo, actina, Arp2/3, coronina, distrofina, FtsZ %, queratina, miosina, espectrina, Tau (proteína), tubulina); proteínas de matriz extracelular (por ejemplo, colágeno, elastina, F-espondina, pikachurina); proteína plasmática (por ejemplo, albúmina sérica, componente amiloide P sérico); factores de coagulación (por ejemplo, proteínas del complemento, C1-inhibidor, C3-convertasa, factor VIII, factor IX, factor XIII, fibrina, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionado con proteína Z, trombina, factor de von Willebrand); proteínas de fase aguda (por ejemplo, proteína C-reactiva); hemoproteínas; proteínas de adhesión celular (por ejemplo, cadherina, integrina, NCAM, selectina); proteínas de transporte transmembrana (por ejemplo, CFTR, glicoforina D, escramblasa); canales de iones (por ejemplo, receptor de acetilcolina); receptores acoplados a proteína G; canales de potasio; proteínas de sinpote/antiporte; hormonas y factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, insulina, factor de crecimiento tipo insulina, oxitocina, hormona foliculo-estimulante, hormona luteinizante); proteínas reguladoras de la transcripción (por ejemplo, MyoD, C-myc); proteínas de almacenamiento/transporte de nutrientes (por ejemplo, ferritina); inmunoglobulinas; tripsina.

En algunas realizaciones, los polipéptidos unidos a las marcas peptídicas de acuerdo con las reivindicaciones pueden ser péptidos de unión a ácido nucleico (por ejemplo, un péptido capaz de unirse a cualquier ácido nucleico, incluyendo ADN, ARN, ARNm, ARNc, miARN, ARNip, ADNc).

En algunas realizaciones, un péptido proporcionado en este documento es una enzima de restricción. Ejemplos de enzimas de restricción incluyen AatII, Acc651, Accl, Acil, Acll, Acul, Afel, AfIII, AfIII, Agel, Ahd1, AleI, Alul, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, Ascl, Asel, AsiSI, Aval, Avall, AvrII, BaeGI, Bael, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, Bccl, BceAI, Bcgl, BciVI, BcII, Bfal, BfuAI, BfuCI, BgII, BgIII, Bipl, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu101, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAII, BsiWI, Bsil, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BsrI, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZI71, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, Cac8I, Clal, CspCI, CviAII, CviKI-1, CviQI, Ddel, Dpnl, DpnII, Dral, DralII, Drdl, Eael, EagI, EarI, Ecil, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, Faul, Fnu4HI, FokI, Fsel, Fspl, Haell, HaellI, Hgal, Hhal, HincII, HindIII, HinfI, HinPII, Hpal, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188 III, Hpy99I, HpyAV, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, KasI, KpnI, Mbol, MbolI, Mfel, Mlul, MlyI, Mmel, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA11, MspI, MwoI, NaeI, NarI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, NruI, Nsil, Nspl, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PhiI, PleI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, Psl, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, Pvul, Pvull, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, Scal, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfiI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, Stul, StyD4I, Styl, SwaI, T, TaqI, Tfilo, TliI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI, TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, y ZraI.

En algunas realizaciones, el péptido también puede unirse a una endonucleasa constitutiva. Ejemplos de endonucleasas constitutivas incluyen I-CeuI, I-SceI, PI-PspI, y PI-SceI. El péptido también puede unirse a una endonucleasa de mellas. Ejemplos de endonucleasa de mellas incluyen Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, y Nt.CviPII. En algunas realizaciones, el péptido es de alta fidelidad. El péptido puede ser una variante de alta fidelidad de cualquier péptido descrito en este documento.

En algunas realizaciones, el péptido es una nucleasa celular, una nucleasa de frijol mungo, una nucleasa PI, una nucleasa S1. En algunas realizaciones, el péptido es una nucleasa específica de hebra individual (sss). En algunas realizaciones, el péptido es una nucleasa útil para análisis mutacional y/o análisis de polimorfismos de un único nucleótido. La nucleasa celular puede usarse para análisis mutacional y análisis de polimorfismos de un único nucleótido para escindir desapareamientos de un único par de bases en moldes de ADN heterodúplex - método de escisión de desapareamientos TILLING (lesiones inducidas por direccionamiento en genomas). En otras realizaciones, el péptido tiene capacidad de rápida digestión.

En algunas realizaciones, el péptido unido a un péptido de acuerdo con las reivindicaciones puede ser una desoxirribonucleasa, ribonucleasa, exonucleasa, endonucleasa, exodesoxirribonucleasa, exorribonucleasa, endodesoxirribonucleasa, endorribonucleasa, oligonucleasa, RecBCD, desoxirribonucleasa I, desoxirribonucleasa II, desoxirribonucleasa IV, endonucleasa UvrABC, nucleasa S1 de aspergillus, o nucleasa de micrococos.

Polipéptidos modificados

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en este documento pueden modificarse de cualquier modo conocido en la técnica. Por ejemplo, las polimerasas descritas en este documento pueden modificarse para su uso en métodos de PCR Hot Start. La "PCR Hot Start" es una forma modificada de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Las polimerasas descritas en este documento también pueden modificarse para usarse en métodos de PCR Hot Start. La PCR Hot Start normalmente implica el uso de una polimerasa que se inactiva a temperaturas inferiores y ambiente, y que posteriormente se activa a temperaturas mayores, habitualmente durante la etapa de desnaturalización de PCR (por ejemplo, cuando la reacción alcanza una temperatura de 90 a 105 °C, por ejemplo, 95 °C). En algunos ejemplos, la muestra debe incubarse durante un cierto periodo de tiempo (por ejemplo, más de 1, 5, 7, 10, 15, 20, o 30 minutos) a una temperatura específica (por ejemplo, aproximadamente 85 °C, 90 °C, 95 °C, 100 °C, 105 °C o 110 °C). Por ejemplo, la reacción puede incubarse durante 15 min a 95 °C para activar una polimerasa de PCR Hot Start. El uso de dicha polimerasa evita la extensión de cebadores hibridados de forma no específica y dímeros de cebador formados a bajas temperaturas durante la preparación de la PCR. Una técnica de PCR Hot Start es especialmente útil para evitar amplificación no específica de ADN, y aumentar la sensibilidad y rendimiento.

La inhibición de la polimerasa usada para la PCR Hot Start se causa por un anticuerpo, péptido, o modificación química. La modificación se hace habitualmente en cadenas laterales de sitios activos (por ejemplo, ABgene ThermoStart). Un ejemplo de una polimerasa modificada químicamente útil para PCR Hot Start es una polimerasa modificada con reactivos modificadores de aldehído, preferiblemente formaldehído (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.183.998). Otros ejemplos incluyen polimerasas modificadas mediante otras reacciones químicas, tales como por una reacción con anhídrido, y otras modificaciones descritas en la patente de Estados Unidos N° 5.773.258. Las polimerasas útiles para PCR Hot Start también pueden modificarse por unión a un anticuerpo específico de polimerasa (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.338.671). En algunos casos, las polimerasas se secuestran de otros reactivos en una mezcla de reacción, con barreras físicas antes de que tenga lugar el termociclado. Por ejemplo, en un método de barrera de cera, se usa una cera tal como cera de parafina o una perla de cera de parafina para secuestrar la polimerasa de otros reactivos en la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones, las polimerasas descritas en este documento pueden modificarse químicamente para

facilitar los métodos de PCR Hot Start, por cualquier método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.773.258, la patente de Estados Unidos N° 6.183.998). En algunos casos, las polimerasas se modifican con un anticuerpo o péptido para facilitar los métodos de PCR Hot Start. En otros casos más, una polimerasa descrita en este documento se secuestra en cera de parafina (por ejemplo, perla de cera de parafina).

Los reactivos necesarios para realizar PCR Hot Start se envasan en kits que están disponibles en el mercado. Esta activación de la polimerasa es a temperaturas mayores, tales como temperaturas altas útiles para la etapa de desnaturalización de PCR.

Variantes polipeptídicas

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en la presente descripción (por ejemplo, polimerasas) también incluyen una gran cantidad de variaciones de secuencia, mutantes, y fragmentos de los mismos, que pueden generarse (por ejemplo, in vitro) y seleccionarse para la actividad y estabilidad. También incluyen cualquier polipéptido modificado que esté disponible en el mercado (por ejemplo, polimerasa titanium (Invitrogen); Taq Gold (Applied Biosystems), etc.). Las polimerasas Taq que están truncadas a menudo retienen la actividad. Por tanto, los polipéptidos descritos en este documento incluyen truncamientos N' y C'-terminales de polimerasas Taq. De hecho, incluyen cualquier polimerasa Taq que retenga la actividad.

Para aislar variantes de secuencia, puede realizarse mutagénesis aleatoria de la secuencia completa o subsecuencias específicas correspondientes de dominios particulares. Como alternativa, puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio de forma reiterativa evitando al mismo tiempo mutaciones en restos críticos para la función proteasa. Pueden usarse programas de predicción de tolerancia a mutaciones para reducir enormemente la cantidad de variantes de secuencia no funcionales que se generarían estrictamente por mutagénesis aleatoria. Se describen diversos programas para predecir los efectos de sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica sobre la función proteica (por ejemplo, SIFT, PolyPhen, PANTHER PSEC, PMUT, y TopoSNP) en, por ejemplo, Henikoff et al., (2006), Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 7:61-80.

Además, la presente descripción proporciona diferentes porcentajes de identidad de secuencia para los polipéptidos descritos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., (1986), Bull. Math. Bio., 48:603, y Henikoff y Henikoff, (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915. En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar los valores de alineación usando una penalización por abertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 1, y la matriz de valores "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (supra). El porcentaje de identidad entonces se calcula como: $(\text{Cantidad total de coincidencias idénticas}) / (\text{longitud de la secuencia más larga más la cantidad de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias}) (100)$.

Existen muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineación de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos descrita en este documento y la secuencia de aminoácidos de otro péptido. El algoritmo FASTA se describe por Pearson et al., (1988), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:2444, y por Pearson (1990), Meth. Enzymol. 183:63. En resumen, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, SEC ID N°4 o SEC ID N° 6 o SEC ID N° 9) y una secuencia de ensayo que tienen la mayor densidad de identidades (si la variable k_{tup} es 1) o pares de identidades (si $k_{\text{tup}}=2$), sin considerar sustituciones conservativas de aminoácidos, inserciones, o deleciones. Las diez regiones con la mayor densidad de identidades después se vuelven a valorar comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "recortan" para incluir solamente aquellos restos que contribuyan al mayor valor. Si hay varias regiones con valores mayores que el valor de "corte" (calculado por una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor k_{tup}), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones pueden unirse para formar una alineación aproximada con huecos. Finalmente, las regiones de mayor valoración de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman et al., (1970), J. Mol. Biol. 48:444; Sellers (1974), SIAM J. Appl. Math., 26:787), que permite inserciones y deleciones de aminoácidos. Los parámetros ilustrativos para el análisis FASTA son: $k_{\text{tup}}=1$, penalización por abertura de hueco=10, penalización por extensión de hueco=1, y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de valores ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, (1990), Meth. Enzymol., 183:63.

También se proporcionan en este documento proteínas que tienen un cambio conservativo de aminoácido, en comparación con una secuencia de aminoácidos descrita en este documento. Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una "sustitución conservativa de aminoácido" se ilustra por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina, y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina. La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de secuencias proteicas, que representan regiones altamente

conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas. Véase Henikoff et al., (1992), Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, 89:10915. Por consiguiente, pueden usarse las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 para definir sustituciones conservativas de aminoácidos que pueden introducirse en las secuencias de aminoácidos proporcionadas en este documento. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos en base solamente a las propiedades químicas (como se ha analizado anteriormente), la expresión "sustitución conservativa de aminoácido" preferiblemente se refiere a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 de más de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido es conservativa si la sustitución se caracteriza por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones conservativas de aminoácidos preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones conservativas de aminoácidos más preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3).

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales, y ser aún esencialmente como se expone en una de las secuencias descritas en este documento, siempre que la secuencia retenga suficiente actividad proteica biológica que sea funcional en las composiciones y métodos proporcionados en este documento.

En algunos casos, la composición comprende un polipéptido que es al menos un 10 %, 20 %, 50 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntico a un polipéptido codificado por la SEC ID N° 3, SEC ID N°4, SEC ID N°5, SEC ID N°7, SEC ID N°10, SEC ID N° 12, fragmentos, mutantes o variantes de las mismas.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones proporcionadas en este documento pueden administrarse como formulaciones farmacéuticas incluyendo aquellas adecuadas para administración oral (incluyendo bucal y sub-lingual), rectal, intranasal, tópica, transdérmica, por parche transdérmico, pulmonar, vaginal, por supositorio, o parenteral (incluyendo intramuscular, intra-arterial, intratecal, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para administración por formación de aerosol, inhalación o insuflación. Pueden encontrarse información general sobre sistemas de suministro de fármacos en Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Lippencott Williams y Wilkins, Baltimore Md. (1999)).

La composición farmacéutica puede incluir vehículos y excipientes (incluyendo aunque sin limitación tampones, carbohidratos, manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes), agua, aceites incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, soluciones salinas, dextrosa acuosa y soluciones de glicerol, agentes aromatizantes, agentes colorantes, floculantes y otros aditivos aceptables, adyuvantes, o aglutinantes, otras sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes emulsionantes, agentes humectantes y similares. Ejemplos de excipientes incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La preparación farmacéutica puede estar sustancialmente libre de conservantes. Como alternativa, la preparación farmacéutica puede contener al menos un conservante. Se encuentra metodología general sobre formas farmacéuticas de dosificación en Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Lippencott Williams y Wilkins, Baltimore Md. (1999)). Se reconocerá que, aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido para los especialistas en la técnica para administrar las composiciones proporcionadas en este documento, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Puede encontrarse un análisis minucioso de los vehículos/excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, AR, ed., 20ª edición, 2000: Williams y Wilkins PA, EEUU.

Los compuestos también pueden encapsularse dentro de liposomas usando tecnología bien conocida. También pueden emplearse microesferas biodegradables como vehículos para las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento. Se describen microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344 y 5.942.252.

El compuesto puede administrarse en liposomas o microesferas (o micropartículas). Los métodos para preparar liposomas y microesferas para su administración a un paciente son bien conocidos para los especialistas en la técnica. La patente de Estados Unidos 4.789.734 describe métodos para encapsular materiales biológicos en liposomas. Esencialmente, el material se disuelve en una solución acuosa, se añaden los fosfolípidos y lípidos apropiados, junto con tensoactivos si se requiere, y se dializa o sonica el material, según sea necesario. Se proporciona una revisión de métodos conocidos por G. Gregoriadis, Capítulo 14, "Liposomes", Drug Carriers in Biology and Medicine, pág. 2,sup.87-341 (Academic Press, 1979).

Las microesferas formadas de polímeros o proteínas son bien conocidas para los especialistas en la técnica, y pueden adaptarse para el paso a través del tracto gastrointestinal directamente al torrente sanguíneo. Como

alternativa, el compuesto puede incorporarse y las microesferas, o compuesto de microesferas, puede implantarse para liberación lenta durante un periodo de tiempo que varía de días a meses. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.906.474, 4.925.673 y 3.625.214, y Jein, TIPS 19;155-157 (1998).

- 5 La concentración de fármaco puede ajustarse, el pH de la solución puede tamponarse y la isotonicidad puede ajustarse para que sea compatible con inyección intravenosa, como se sabe bien en la técnica.

10 Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse como una solución o suspensión estéril, en vehículos adecuados, bien conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización bien conocidas, o pueden filtrarse a esterilidad. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de su administración. Se describen formulaciones adecuadas y vehículos adicionales en Remington "The Science and Practice of Pharmacy" (20ª Ed., Lippincott Williams y Wilkins, Baltimore MD).

15 Los agentes o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden proporcionarse solos o en combinación con uno o más agentes diferentes o con una o más formas diferentes. Por ejemplo una formulación puede comprender uno o más agentes en proporciones particulares, dependiendo de las potencias relativas de cada agente y la indicación pretendida. Por ejemplo, en composiciones para abordar dos dianas huésped diferentes y donde las potencias son similares, puede usarse una proporción aproximadamente 1:1 de agentes. Las dos formas pueden formularse juntas, en la misma unidad de dosificación por ejemplo, en una crema, supositorio, comprimido, cápsula, pulverizador de aerosol, o paquete de polvo a disolver en na bebida; o cada forma puede formularse en una unidad diferente, por ejemplo, dos cremas, dos supositorios, dos comprimidos, dos cápsulas, un comprimido y un líquido para disolver el comprimido, dos pulverizadores de aerosol, o un paquete de polvo y un líquido para disolver el polvo, etc.

25 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa aquellas sales que retienen la eficacia y propiedades biológicas de los agentes proporcionados en este documento, y que no son biológicamente indeseables o indeseables de otro modo. Por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable no interfiere con el efecto de un agente proporcionado en este documento en la prevención, reducción, o desestabilización de la formación de un complejo de múltiples subunidades, o promoción de la alteración de un complejo de múltiples subunidades.

30 Las sales típicas son aquellas de los iones inorgánicos, tales como, por ejemplo, iones sodio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Dichas sales incluyen sales con ácidos inorgánicos u orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido p toluenosulfónico, ácido acético, ácido fumárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico o ácido maleico. Además, si el agente o agentes contienen un grupo carboxi u otro grupo ácido, puede convertirse en una sal de adición farmacéuticamente aceptable con bases inorgánicas u orgánicas. Ejemplos de bases adecuadas incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, ciclohexilamina, dicitclohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, y similares.

40 Un éster o amida farmacéuticamente aceptable se refiere a aquellos que retienen la eficacia y propiedades biológicas de los agentes proporcionados en este documento, y que no son biológicamente indeseables o indeseables de otro modo. Por ejemplo, el éster o amida no interfiere con el efecto beneficioso de un agente proporcionado en este documento en la prevención, reducción o desestabilización del ensamble del complejo de múltiples subunidades, o promoción de la alteración o eliminación del complejo de múltiples subunidades en las células, o prevención o alivio de uno o más signos o síntomas patológicos asociados con la exposición a uno o más complejos de múltiples subunidades o componentes insolubles en un sujeto. Los ésteres típicos incluyen etilo, metilo, isobutilo, etilenglicol, y similares. Las amidas típicas incluyen amidas sin sustituir, alquil amidas, dialquil amidas, y similares.

50 Las composiciones acuosas proporcionadas en este documento comprenden una cantidad eficaz de una composición de la presente invención, que puede disolverse o dispersarse en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable usado en este documento puede incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

60 Vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares para composiciones inyectables pueden incluir sales de calcio, por ejemplo, tales como cloruros de calcio, bromuros de calcio, sulfatos de calcio, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden proporcionarse en forma líquida, y formularse en solución acuosa basada en solución salina de pH variable (5-8), con o sin detergentes tales como polisorbato-80 al 0,01-1 %, o aditivos de carbohidrato, tales como manitol, sorbitol, o trehalosa. Los tampones habitualmente usados incluyen histidina, acetato, fosfato, o citrato. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse

mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol; fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, y gelatina.

Para administración a seres humanos, las preparaciones cumplen normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general, y pureza requeridas por la FDA y otras normas de agencias reguladoras. Los compuestos activos generalmente se formularán para administración parenteral, por ejemplo, se formularán para inyección mediante vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesional, o intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa que contiene un componente o ingrediente activos será conocida para los especialistas en la técnica a la luz de la presente descripción. Normalmente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su uso en la preparación de soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de su inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos ingredientes diferentes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen técnicas de secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de forma sistémica de un modo compatible con la formulación de la dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz basándose en los criterios descritos en este documento. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

La cantidad apropiada de una composición farmacéutica a administrar, la cantidad de tratamientos, y la dosis unitaria variarán de acuerdo con el sujeto a tratar, y la patología del sujeto. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, también pueden usarse otros métodos alternativos de administración de la presente invención, incluyendo aunque sin limitación administración intradérmica (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.997.501; 5.848.991; y 5.527.288), administración pulmonar (véanse las patentes de Estados Unidos N° 6.361.760; 6.060.069; y 6.041.775), administración bucal (véanse las patentes de Estados Unidos N° 6.375.975; y 6.284.262), administración transdérmica (véanse las patentes de Estados Unidos N° 6.348.210; y 6.322.808) y administración transmucosa (véase la patente de Estados Unidos 5.656.284). Dichos métodos de administración son bien conocidos en la técnica. Uno también puede usar administración intranasal de la presente invención, tal como con soluciones o pulverizaciones nasales, aerosoles o inhalantes. Las soluciones nasales son habitualmente soluciones acuosas diseñadas para administrarse a las fosas nasales en gotas o pulverizaciones. Las soluciones nasales se preparan de modo que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales. Por tanto, las soluciones nasales acuosas habitualmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5. Además, pueden incluirse conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas y estabilizantes apropiados de fármacos, si se requiere, en la formulación. Se conocen diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen, por ejemplo, antibióticos y antihistaminas y se usan para la profilaxis del asma.

Formulaciones adicionales, que son adecuadas para otros modos de administración, incluyen supositorios y pesarios. También puede usarse un pesario rectal o supositorio. Los supositorios son formas sólidas de dosificación de diversos pesos y formas, habitualmente medicados, para su inserción en el recto o la uretra. Después de su inserción, los supositorios se ablandan, funden o disuelven en los fluidos de la cavidad. Para supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales generalmente incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en cualquier intervalo adecuado, por ejemplo, en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferiblemente el 1 %-2 %.

Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, o polvos. Las composiciones farmacéuticas orales pueden comprender un diluyente inerte o vehículo comestible asimilable, o pueden encerrarse en una cápsula de gelatina de revestimiento duro o blando, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires,

suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones pueden contener al menos el 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse, por supuesto, y puede ser convenientemente entre aproximadamente el 2 a aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25-60 %. La cantidad de compuestos activos en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina pueden añadirse o un agente aromarizante, tal como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma monodosis es una cápsula, puede contener, además materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden recubrirse con goma-laca, azúcar o ambos. Un jarabe puede contener los compuestos activos sacarosa como agente edulcorante, metileno y propil parabenos como conservantes, un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Una composición farmacéutica oral puede recubrirse entéricamente para proteger los ingredientes activos del entorno del estómago; los métodos y formulaciones de recubrimiento entérico son bien conocidos en la técnica.

Kits/mezclas/composiciones adicionales

Las composiciones descritas en este documento pueden formularse directamente en composiciones (por ejemplo, concentración de solución 5x) a usarse en técnicas que requieren el uso de una enzima termoestable, tales como composiciones para reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) (por ejemplo, PCR a tiempo real, RT PCT, RT qPCR, qPCR con sonda, EvaGreen qPCR, HRM).

Los kits descritos en este documento pueden comprender un colorante de unión a ADN, particularmente colorantes que se unen a ADN bicatenario y emiten una señal tal como una señal fluorescente. Ejemplos no limitantes de colorantes de unión a ADN incluyen EvaGreen™, descrito en la patente de Estados Unidos N° 7.601.498; LC Green; SYTO9; Chromofy; BEBO; y SYBR Green. Dichos colorantes son particularmente útiles para aplicaciones de PCR cuantitativa (qPCR).

Los kits pueden comprender un colorante de referencia (por ejemplo, colorante ROX), o un colorante inactivador (por ejemplo, TAMRA). En otros casos, puede usarse FRET. FRET también puede usarse para el colorante de referencia. En algunos casos, el colorante FRET usado para los colorantes de referencia está compuesto por un colorante fluoróforo (por ejemplo, FAM) seguido de una secuencia de ácido nucleico seguida de un colorante (por ejemplo, colorante Rox). Ejemplos de secuencias de ácido nucleico incluyen desoxinucleótidos, tales como elementos dT repetitivos. Ejemplos incluyen, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más nucleótidos dT. Pueden usarse otros nucleótidos (repetidos o mezclas de diferentes nucleótidos). Por ejemplo, pueden usarse nucleótidos dA, dC, dG, o dU repetidos. Ejemplos no limitantes de colorantes FRET incluyen los siguientes: 5' FAM-TTTTTTTT-3'ROX (8dT); 5'FAM- TTTTTTTT- 3'ROX (9dT); o 5'FAM- TTTTTTTT-3'ROX (10dT). El fenómeno FRET puede funcionar a distancias de 1-5 nm, hasta 10 nM. La distancia T-T puede ser aproximadamente de 0,24 a 0,36 nm. La distancia entre el colorante de referencia e inactivador puede ser entre aproximadamente 0,24 a 0,36 nm. El colorante de referencia puede tener una secuencia de nucleótidos que coloca los pares FRET a una distancia apropiada entre sí que permite que suceda FRET. La distancia esperada entre los pares FRET puede ser de menos de aproximadamente o de aproximadamente 2 a 6 nanómetros. La distancia entre los pares FRET puede ser de aproximadamente o hasta aproximadamente 2,72, 3,06, o 3,4 nm. La distancia entre el colorante de referencia e inactivador puede ajustarse seleccionando diferentes cantidades de nucleótidos repetidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos A, C, T, o G repetidos. Pueden usarse otros colorantes de referencia e inactivadores, por ejemplo, los descritos en este documento.

Los colorantes de referencia mencionados anteriormente pueden usarse en una diversidad de reacciones, incluyendo reacciones para PCR cuantitativa a tiempo real. Puede permitir el cálculo a tiempo real de curvas que consideran un colorante de referencia pasivo. El colorante de referencia puede usarse en una diversidad de mezclas, incluyendo mezclas de sonda, mezclas de evagreen, y mezclas de HRM y evagreen. El colorante de referencia puede usarse a una única concentración entre diferentes máquinas de QPCR, por ejemplo, un ABI 7900HT, un AB17500, y un OneStepPlus. La concentración de colorante de referencia puede no tener que ajustarse basándose en la máquina en uso. Sin limitarse a teoría alguna, el colorante de referencia puede usarse a una única concentración entre múltiples máquinas porque el colorante de referencia utiliza el fenómeno FRET.

El colorante de referencia puede tener cualquier secuencia con una temperatura de fusión de aproximadamente hasta aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 °C. El colorante de referencia con nucleótidos repetidos, por ejemplo, nucleótidos timina repetidos, puede ser útil como colorante de referencia porque la secuencia de nucleótidos tiene una baja temperatura de fusión. La baja temperatura de fusión puede reducir la probabilidad de hibridación del colorante de referencia con un resto indeseado. Esto puede reducir la interacción entre oligonucleótidos doblemente marcados y un molde de ADN. Esto también puede reducir la formación de

dímeros.

Los colorantes de referencia pueden mostrar estabilidad a temperatura y pH. Los colorantes de referencia pueden retener aproximadamente o más de aproximadamente el 60, 70, 80, 90, o 100 % de la eficacia después de incubación a aproximadamente, hasta aproximadamente, o más de aproximadamente -80, -60, -40, -30, -20, -10, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 °C durante 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 horas. Los colorantes de referencia puede retener el 60, 70, 80, 90, o 100 % de la eficacia después de incubación a aproximadamente, hasta aproximadamente, o más de aproximadamente pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 durante 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 horas.

Los colorantes de referencia pueden ser resistentes a blanqueo. Los colorantes de referencia puede retener aproximadamente o más de aproximadamente el 50, 60, 70, 80, 90, 100 % de su capacidad de emisión de fluorescencia después de exposición a luz ambiente durante aproximadamente o más de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, o 360 minutos.

Los kits también pueden comprender medios de reacción o tampones. Los medios de reacción o tampones apropiados para kits que comprenden polimerasas permiten la amplificación de ácido nucleico de acuerdo con los métodos de la invención. Dichos medios y condiciones son conocidos para los especialistas en la técnica, y se describen en diversas publicaciones, tales como patentes de Estados Unidos N° 5.554.516; 5.716.785; 5.130.238; 5.194.370; 6.090.591; 5.409.818; 5.554.517; 5.169.766; 5.480.784; 5.399.491; 5.679.512; y Pub. PCT N° WO 99/42618. Por ejemplo, un tampón puede ser tampón Tris, aunque también pueden usarse otros tampones siempre que los componentes del tampón sean no inhibidores de los componentes enzimáticos de los métodos de la invención. El pH es de aproximadamente 5 a aproximadamente 11, pero también puede ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. Pueden usarse tampones más ácidos y alcalinos.

El medio de reacción también puede incluir iones metálicos bivalentes tales como Mg^{2+} o Mn^{2+} , a una concentración final de iones libres que está dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mM, o de aproximadamente 1 a 10 mM. El medio de reacción comprende $MgCl_2$ (por ejemplo, más de 1, 1,5, 2, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o 50 mM de $MgCl_2$).

El medio de reacción también puede incluir otras sales, tales como KCl o NaCl, que contribuyen a la fuerza iónica total del medio. Por ejemplo, el intervalo de una sal tal como KCl es preferiblemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 125 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 100 mM, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 75 mM. El medio de reacción puede incluir adicionalmente aditivos que podrían afectar al rendimiento de las reacciones de amplificación, pero que no son integrales a la actividad de los componentes enzimáticos de los métodos. Dichos aditivos incluyen proteínas tales como BSA, proteínas de unión a hebra sencilla (por ejemplo, proteína 32 del gen T4), y detergentes no iónicos tales como NP40 o Triton. También pueden incluirse reactivos, tales como DTT, que son capaces de mantener las actividades enzimáticas. Dichos reactivos son conocidos en la técnica.

Un tampón puede incluir TRIS 50-80 mM, pH 8,3-9,0 y $(NH_4)_2SO_4$ 10-20 mM o KCl 30-50 mM. El pH del tampón puede ajustarse dependiendo de la polimerasa. Un mayor pH, por ejemplo, un pH de aproximadamente, de menos de aproximadamente, o de más de aproximadamente 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, o 8,9, puede usarse para una polimerasa convencional y un pH inferior, por ejemplo, un pH de aproximadamente, de menos de aproximadamente, o de más de aproximadamente 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, o 8,9, puede usarse para una polimerasa hot start.

Una mezcla de PCR a tiempo real basada en Evagreen puede contener 3 polimerasas. La mezcla puede contener una polimerasa principal. La polimerasa principal puede tener una concentración de aproximadamente, de más de aproximadamente, o de menos de aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, que puede ser % en peso, % en vol, o % en mol, o un porcentaje de la polimerasa total en la mezcla en una base molar, de masa, o volumen. La mezcla puede contener una polimerasa con un dominio de unión a doble hebra integrado entre una marca peptídica de la invención y una secuencia de aminoácidos Taq principal, por ejemplo, una polimerasa principal con un dominio de unión a doble hebra. La concentración de dicha polimerasa puede tener una concentración de aproximadamente, de más de aproximadamente, o de menos de aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 %, que puede ser % en peso, % en vol, o % en mol, o un porcentaje de la polimerasa total en la mezcla en una base molar, de masa, o volumen. La mezcla también puede contener una polimerasa con corrección de errores (que puede estar basada en Tgo), donde la marca peptídica está en el extremo N-terminal y el dominio de unión a doble hebra está en el extremo C-terminal. La concentración de dicha polimerasa puede tener una concentración de aproximadamente, de más de aproximadamente, o de menos de aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, que puede ser % en peso, % en vol, o % en mol, o un porcentaje de la polimerasa total en la mezcla en una base molar, de masa, o volumen. Dichas polimerasas puede tener una marca peptídica sin influencia sobre la actividad 3' a 5' exonucleasa o de corrección de errores de la polimerasa.

Una mezcla de sondas puede tener dos polimerasas. La polimerasa principal puede ser una polimerasa con actividad 5' a 3' exonucleasa. La polimerasa puede tener una marca peptídica que no influye en la actividad 5' a 3' exonucleasa. La marca puede localizarse en el extremo N-terminal. La mezcla de sondas también puede incluir una polimerasa con un dominio de unión a doble hebra. El dominio de unión a doble hebra puede disminuir la actividad 5' a 3' exonucleasa. La reducción en la actividad puede ser de aproximadamente, de menos de aproximadamente, o de más de aproximadamente el 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %.

Una mezcla maestra típica para PCR de punto final puede contener 3 polimerasas, un aditivo (por ejemplo, BSA - albúmina sérica bovina), un colorante de rastreo de ADN (por ejemplo, azul de bromofenol), un componente de carga de muestra de ADN (por ejemplo, glicerol). Las 3 polimerasas pueden tener las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N° 2, SEC ID N° 6 y SEC ID N° 11, respectivamente. La mezcla puede contener una polimerasa principal. La polimerasa principal puede tener una concentración de aproximadamente, de más de aproximadamente, o de menos de aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, que puede ser % en peso, % en vol, o % en mol, o un porcentaje de la polimerasa total en la mezcla en una base molar, de masa, o volumen. La mezcla puede contener una polimerasa con un dominio de unión a doble hebra integrado entre una marca peptídica de la invención y una secuencia de aminoácidos Taq principal, por ejemplo, una polimerasa principal con un dominio de unión a doble hebra. La concentración de dicha polimerasa puede tener una concentración de aproximadamente, de más de aproximadamente, o de menos de aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 %, que puede ser % en peso, % en vol, o % en mol, o un porcentaje de la polimerasa total en la mezcla en una base molar, de masa, o volumen. Dichas polimerasas puede tener una marca peptídica sin influencia sobre actividad 3' a 5' exonucleasa o de corrección de errores de la polimerasa.

Los tampones descritos en este documento pueden incluir una poliacrilamida lineal (LPA). La LPA puede aumentar la especificidad y sensibilidad de una enzima. La LPA puede añadirse a mezclas de tiempo real, incluyendo mezclas de tiempo real que incluyen Evagreen o cualquier sonda, por ejemplo, cualquier sonda descrita en este documento.

Un tampón puede tener una concentración de $MgCl_2$ de 12,5 mM en un tampón de almacenamiento y la concentración de reacción puede ser $MgCl_2$ 2,5 mM. La concentración de reacción de $MgCl_2$ puede ser entre 1,5 y 2,5 mM. La concentración de un molde de ADN puede ser de 1 a 50 ng/microlitro.

En una reacción que usa un colorante Evagreen, la concentración de reacción final de un cebador (directo o inverso) puede ser entre 80 y 250 nM. En una reacción que no usa un colorante Evagreen y que incluye una sonda, la concentración final de un cebador puede ser 200-400 nM y la concentración final de la sonda puede ser 100 a 250 nM.

En una reacción que usa una enzima con corrección de errores, la concentración de $MgCl_2$ puede ser 1,5 mM, la concentración de un cebador (directo o inverso) puede ser 100 a 300 nM, y la concentración de un ADN molde puede ser 5-50 ng/microlitro.

Cuando sea apropiado, también puede incluirse un inhibidor de RNasa (tal como Rnasin) que no inhibe la actividad de la RNasa empleada en el método. Cualquier aspecto de los métodos de la invención puede suceder a la misma o variables temperaturas. Preferiblemente, las reacciones de amplificación (particularmente, extensión de cebador diferente de las etapas de síntesis de ADNc de primera y segunda hebra, y desplazamiento de hebra) se realizan de forma isotérmica, lo que evita el engorroso proceso de termociclado. La reacción de amplificación se realiza a una temperatura que permite la hibridación de los cebadores con el polinucleótido molde y los productos de extensión de cebador, y que no inhibe sustancialmente la actividad de las enzimas empleadas. La temperatura puede estar en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 85 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, o de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 75 °C.

Los componentes oligonucleotídicos de las reacciones de amplificación se proporcionan en este documento generalmente en exceso de la cantidad de secuencia de ácido nucleico diana a amplificar. Pueden proporcionarse a aproximadamente o al menos aproximadamente cualquiera de los siguientes: 10, 102, 104, 106, 108, 1010, 1012 veces la cantidad de ácido nucleico diana.

Los componentes anteriores pueden añadirse simultáneamente al inicio del proceso de amplificación. Como alternativa, los componentes se añaden en cualquier orden antes o después de momentos puntuales apropiados durante el proceso de amplificación, según sea necesario y/o permitido por la reacción de amplificación. Dichos momentos puntuales pueden identificarse fácilmente por un especialista en la técnica. Las enzimas usadas para la

amplificación de ácido nucleico de acuerdo con los métodos de la invención pueden añadirse a la mezcla de reacción antes de la etapa de desnaturalización del ácido nucleico diana, después de la etapa de desnaturalización, o después de la hibridación del cebador con el ARN o ADN diana, según se determine por su estabilidad térmica y/u otras consideraciones conocidas para los especialistas en la técnica.

5 El proceso de amplificación puede detenerse en diversos momentos puntuales, y reiniciarse en un momento posterior. Dichos momentos puntuales puede identificarse fácilmente por los especialistas en la técnica.

10 Las composiciones también pueden comprender dNTP (por ejemplo, dNTP más de 1, 1,5, 2, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o 50 mM). Los dNTP pueden ser dNTP ultrapuros. Los dNTP pueden comprender dATP, dGTP, dCTP, dTTP, dUTP, o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, la composición comprende un colorante (por ejemplo, colorante azul o amarillo). En algunos casos, un tampón comprende un detergente descrito en este documento. En algunos casos, el tampón no comprende un detergente. En algunos casos, el tampón contiene un alto pH. En otras realizaciones, el tampón tiene un pH bajo o neutro. En algunos casos, el tampón contiene (NH₄)₂SO₄.

15 Las composiciones proporcionadas en este documento pueden proporcionarse en una solución. Las soluciones pueden formularse a diferentes concentraciones. Por ejemplo, la solución puede ser 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, o mayor de 15x de concentración. Se proporcionan en este documento descripciones adicionales de formulaciones de las composiciones.

20 Algunos kits comprenden dos polimerasas. Por ejemplo, un kit puede comprender una polimerasa con actividad 5' a 3' exonucleasa (por ejemplo, SEC ID N° 2) a una concentración de aproximadamente el 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,5 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, o 100 % de la concentración de polimerasa total. Dicho kit puede comprender una segunda polimerasa (por ejemplo, una polimerasa marcada con el péptido de la SEC ID N° 10) a una concentración del 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de la concentración de polimerasa total. En una realización preferida, una polimerasa con actividad 5' a 3' exonucleasa (por ejemplo, SEC ID N° 2) (o cualquier polipéptido que comprende la marca peptídica de la SEC ID N° 1) está presente a una concentración de más del 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,5 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % de la concentración total de polimerasa, mientras que la segunda polimerasa está presente a una concentración menos del 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %. Un polipéptido de fusión que comprende la marca peptídica de la SEC ID N° 1 puede estar presente a una concentración de más del 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,5 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % de la concentración total de polimerasa, mientras que el segundo polipéptido es un polipéptido que comprende el péptido DSP (SEC ID N° 10) o dos marcas peptídicas (por ejemplo, SEC ID N° 8 o SEC ID N° 11 (que muestra dos marcas en una polimerasa)) y está presente a una concentración menor del 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %.

45 Algunos kits pueden comprender tres o más polimerasas. Por ejemplo, un kit puede comprender una polimerasa (por ejemplo, SEC ID N° 2 o cualquier polipéptido que comprende la marca peptídica de la SEC ID N° 1) a una concentración de aproximadamente el 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,5 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, o 100 % de la concentración de polimerasa total. Además, dicho kit puede comprender una segunda polimerasa tal como una polimerasa que comprende la marca peptídica de la SEC ID N° 8, 10 o 13. Y además, dichos kit puede comprender un tercer polipéptido tal como una polimerasa con corrección de errores (por ejemplo, polimerasa tgo). Dicha polimerasa con corrección de errores puede comprender la marca peptídica de la SEC ID N° 1, 8, 10 o 13. Por ejemplo, dicha polimerasa con corrección de errores puede ser la ID N° 11 (Figura 12). El segundo y tercer polipéptidos pueden estar cada uno presentes a una concentración de menos del 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %.

50 Las composiciones también pueden usarse en amplificaciones que implican el uso de ADN polimerasas termoestables tales como ADN polimerasas Taq o Tgo, o mutantes, derivados o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5 o SEC ID N° 4 o SEC ID N° 12 se usa en combinación con una polimerasa (por ejemplo, polimerasa Taq) o polimerasa con corrección de errores (por ejemplo, ADN polimerasa Tgo) en una amplificación. En algunos casos, la cantidad de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes, fragmentos, o mutantes de la misma, o SEC ID N° 4 (o SEC ID N° 12), o variantes, fragmentos o mutantes de la misma, es al menos 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 25-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 100-, 250-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000-, 15.000-, 20.000-, 50.000-, 100.000-, 500.000-, 10⁶, 10⁷, 10⁸, o 10⁹ veces menor que la cantidad de una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq o Tgo) usada en la amplificación. Por lo tanto, en algunos casos, una composición descrita en este documento es una mezcla de un polipéptido codificado por la SEC

ID N° 5, o variantes, fragmentos, o mutantes de la misma, o un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, o variantes, fragmentos, o mutantes de la misma, y una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq o Tgo), donde la cantidad de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes, mutantes o fragmentos de la misma, o la SEC ID N° 4, o variantes, mutantes o fragmentos de la misma, es al menos 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 25-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 100-, 250-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000-, 15.000-, 20.000-, 50.000-, 100.000-, 500.000-, 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces menor que la cantidad de la polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq o Tgo). En ciertos ejemplos preferidos, la composición es una mezcla de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, o variantes, mutantes o fragmentos de la misma, y un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes, mutantes o fragmentos de la misma donde la cantidad de polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes de la misma, en la mezcla es al menos 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 25-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 100-, 250-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000-, 15.000-, 20.000-, 50.000-, 100.000-, 500.000-, 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces menor que la cantidad de polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, o variantes de la misma.

En algunos casos, la concentración de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes de la misma, o la SEC ID N° 4, o variantes de la misma, es al menos 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 25-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 100-, 250-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000-, 15.000-, 20.000-, 50.000-, 100.000-, 500.000-, 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces menor que la concentración de una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq o Tgo) usada en la amplificación. Por lo tanto, en algunos casos, una composición descrita en este documento comprende una mezcla de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes de la misma, o un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, o variantes de la misma, y una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq o Tgo), donde la concentración de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o variantes de la misma, o la SEC ID N° 4, o variantes de la misma, es al menos 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 25-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 100-, 250-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000-, 15.000-, 20.000-, 50.000-, 100.000-, 500.000-, 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces menor que la concentración de la polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq o Tgo). Todas las realizaciones descritas en este documento también pueden comprender polipéptidos que comprenden un polipéptido codificado por la SEC ID N° 7, o mutantes, variantes o fragmentos de la misma tales como un fragmento DSP representado en las figuras y/o un polipéptido o polipéptidos que comprenden un polipéptido codificado por la SEC ID N° 3, o fragmentos, mutantes, o variantes de la misma.

En algunos casos, la composición es una mezcla de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o fragmentos, mutantes o variantes de la misma, y un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, o variantes, mutantes o fragmentos de la misma. En algunos casos, dicha mezcla también incluye adicionalmente una enzima con corrección de errores (por ejemplo, ADN polimerasa Tgo). Por lo tanto, en algunos casos la composición comprende una polimerasa con actividad 5' → 3' exonucleasa así como una enzima con actividad 3' → 5' de corrección de errores.

En algunos casos la cantidad de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 5, o mutantes, fragmentos, o variantes de la misma (o de un polipéptido que comprende un polipéptido codificado por la SEC ID N° 7, o fragmento de la misma tal como DSP) en dicha composición es al menos 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 25-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 100-, 250-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000-, 15.000-, 20.000-, 50.000-, 100.000-, 500.000-, 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces menor que la cantidad de un polipéptido codificado por la SEC ID N° 4, o variantes de la misma, y/o de la enzima con corrección de errores.

En algunos casos, un polipéptido se traduce como una forma corta y también como una forma larga. En algunos casos, se usa un factor de inicio de la traducción eucariota para facilitar la traducción de un polipéptido. En algunos casos, la traducción sucede en una bacteria.

Un kit puede comprender una o más composiciones descritas en este documento así como instrucciones que indican el uso de dicha composición. Las instrucciones pueden incluir directrices para formular la muestra de reacción (incluyendo la concentración de polimerasa relevante, molde, cebadores (inverso y directo), dNTP, BSA, y H2O). Las instrucciones también pueden incluir recomendaciones que ejecutan el ciclo de PCR, particularmente las fases de desnaturalización, hibridación, y elongación. Dichas instrucciones pueden incluir las condiciones de temperatura y la cantidad de tiempo, o números de ciclos, para cada etapa. Por ejemplo una recomendación para qPCR puede ser tener una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C 15 min (por ejemplo, para activar la enzima HOT start); seguida de 40 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización 95 °C durante 15 segundos; hibridación 60°-65 °C durante 20 segundos; y elongación 72 °C durante 20 segundos.

Vectores de ácido nucleico/células

Las composiciones descritas en este documento también incluyen ácidos nucleicos y vectores que codifican cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento. Ejemplos no limitantes de dichas construcciones incluyen construcciones que comprenden la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 3, 4, 5, 7, 9, y/o 12. Otros ejemplos más incluyen construcciones que comprenden ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N° 1, 2, 6, 8, 10, 11, y/o 13. Las composiciones también incluyen fragmentos, variantes, y/o mutantes de lo anterior.

Las construcciones de ácido nucleico pueden estar compuestas por ADN monocatenario, ADN bicatenario, ADNc,

ARN, ARNc. Los vectores de ácido nucleico pueden usarse en cualquier sistema de expresión conocido, por ejemplo, eucariota, procariota, in vitro, etc. En realizaciones preferidas, los vectores de ácido nucleico se usan en un sistema procariota (por ejemplo, bacterias *E. coli*) y los vectores de ácido nucleico portan una señal de traducción fuerte eucariota. Por ejemplo, los vectores de ácido nucleico pueden portar una señal de traducción fuerte eucariota tal como una secuencia Kozak GCCGCC(A/G)CCAUGG, como se describe en Nakagawa et al. (2007) Nuc. Acids Res. 1-11, (doi:10.1093/nar/gkm1102). Por ejemplo, los vectores pueden incluir la secuencia GCCGCCACCATGGTC. Los vectores también pueden incluir un sitio de unión al ribosoma (por ejemplo, una secuencia tal como AGGA). La señal de traducción fuerte eucariota puede posibilitar la traducción de múltiples péptidos, empezando en diferentes restos met. Por ejemplo un vector que contiene una señal de traducción eucariota descrita en este documento y una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEC ID N° 1, puede expresar la forma larga del péptido (como se muestra en la Figura 2), así como la forma corta del péptido (Figura 14, SEC ID N° 13). En este ejemplo, la forma corta del péptido empieza en los restos MVDDL de la secuencia original mostrada en la SEC ID N° 1.

La inclusión de una señal eucariota fuerte en un vector de ácido nucleico puede provocar más producción de proteína. Sorprendentemente, esto puede suceder cuando dicho vector se usa en un sistema bacteriano, tal como cuando se expresa en bacterias *E. coli*. Como resultado, el rendimiento de proteína aislada a partir de las bacterias puede aumentarse en más de 1,5-, 2-, 3-, 4-, 5-, 7-, 10-, 15-, 20-, 30-, o 40- veces. Los vectores nucleicos también pueden contener regiones de control de la transcripción conocidas en la técnica (por ejemplo, promotores, potenciadores, operadores, etc.).

Se proporcionan en este documento células que pueden incorporar uno o más de los vectores de la invención. La célula puede ser una célula procariota o una célula eucariota. La célula puede ser una célula bacteriana (por ejemplo, *E. coli*). La célula puede ser una célula eucariota. La célula puede ser una célula de hibridoma de mieloma de ratón. La célula puede ser una célula de ovario de hámster chino (CHO). Puede usarse cualquier técnica adecuada, conocida en la técnica, para incorporar el vector o vectores en la célula. La introducción de un vector nucleico puede ser por, por ejemplo, integración permanente en el ácido nucleico cromosómico, o por, por ejemplo, introducción de un elemento genético episómico.

30 **Métodos**

Las composiciones descritas en este documento pueden usarse en varios métodos. Dados que los muchos péptidos, polipéptidos, polipéptidos de fusión, y composiciones descritos en este documento tienen estabilidad potenciada a temperaturas más calientes, pueden ser particularmente útiles para aplicaciones donde no es posible refrigerar o congelar los reactivos o agentes terapéuticos. Las marcas peptídicas por tanto pueden usarse en terapéutica, reactivos, o diagnóstico, diseñadas para su uso en regiones alejadas sin acceso seguro a la electricidad.

Preferiblemente, las composiciones son polimerasas y pueden usarse en amplificaciones de ácido nucleico, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se muestran procedimientos generales para PCR en las patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 (Mullis) y 4.683.202 (Mullis et al.) y se han descrito en otra parte en este documento. En resumen, la amplificación de ácidos nucleicos por PCR implica ciclos repetidos de desnaturalización por calor del ADN, hibridación de dos cebadores con secuencias que flanquean el segmento de ácido nucleico diana a amplificar, y extensión de los cebadores hibridados con una polimerasa. Los cebadores hibridan con hebras opuestas del ácido nucleico diana y están orientados de modo que la síntesis por la polimerasa progrese a través del segmento entre los cebadores, duplicando de forma eficaz la cantidad del segmento diana. Además, como los productos de extensión también son complementarios a y capaces de unirse a los cebadores, cada ciclo sucesivo esencialmente duplica la cantidad de ácidos nucleicos diana sintetizados en el ciclo previo. Esto provoca la acumulación exponencial de los ácidos nucleicos diana específicos a aproximadamente una velocidad de 2^n , donde n es el número de ciclos.

Un protocolo típico de termociclado convencional por PCR comprende 30 ciclos de (a) desnaturalización a un intervalo de 90 °C a 95 °C durante 0,5 a 1 minuto, (b) hibridación a una temperatura que varía de 50 °C a 65 °C durante 1 a 2 minutos, y (c) extensión a 68 °C a 75 °C durante al menos 1 minuto. Pueden realizarse otros protocolos incluyendo, aunque sin limitación, protocolo universal así como protocolo de ciclado rápido con las presentes sondas también.

Otra variación de la PCR convencional que puede realizarse con las composiciones proporcionadas en este documento es "PCR anidada" usando cebadores anidados. El método se prefiere cuando la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra está extremadamente limitada por ejemplo, cuando se usan muestras de archivo, forenses. En la realización de PCR anidada, el ácido nucleico primero se amplifica con un conjunto externo de cebadores capaces de hibridar con las secuencias que flanquean un segmento más grande del ácido nucleico diana. Esta reacción de amplificación está seguida de una segunda ronda de ciclos de amplificación usando un conjunto interno de cebadores que hibrida con secuencias diana dentro del segmento grande.

Las composiciones descritas en este documento pueden usarse en una reacción de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), en que una transcriptasa inversa primero convierte moléculas de ARN en moléculas de ADNc

bicatenario, que después se emplean como molde para la posterior amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa. En la realización de RT-PCR, la transcriptasa inversa generalmente se añade a la muestra de reacción después de haber desnaturalizado por calor los ácidos nucleicos diana. La reacción después se mantiene a una temperatura adecuada (por ejemplo, 30 °C-45 °C) durante una cantidad suficiente de tiempo (por ejemplo, 5-60 minutos) para generar el molde de ADNc antes de que tengan lugar los ciclos programados de amplificación. Dicha reacción es particularmente útil para detectar la entidad biológica cuya información genética está almacenada en moléculas de ARN.

Las composiciones proporcionadas en este documento también pueden usarse en reacción en cadena de la ligasa en cadena de la polimerasa (LCR-PCR). El método implica ligar los ácidos nucleicos diana a un conjunto de pares de cebadores, teniendo cada uno una parte específica de diana y una corta secuencia de anclaje no relacionada con las secuencias diana. Después se usa un segundo conjunto de cebadores que contienen la secuencia de anclaje para amplificar las secuencias diana unidas con el primer conjunto de cebadores. Los procedimientos para realizar LCR-PCR son bien conocidos para los especialistas en el campo, y por tanto no se detallan en este documento (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.494.810).

Además, los productos de la reacción de la polimerasa pueden analizarse por cualquier otro método conocido en la técnica, por ejemplo, HRM, electroforesis en gel, electroforesis capilar.

20 **qPCR**

Las polimerasas descritas en este documento también pueden usarse en reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR). La qPCR, también llamada PCR a tiempo real, pueden usarse para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADN diana. La qPCR se parece a PCR convencional, excepto que el ADN amplificado se detecta según progresa la reacción a tiempo real, en oposición al final de la reacción. Dos métodos comunes para detección de productos en PCR a tiempo real son: (1) colorantes fluorescentes no específicos que se intercalan con cualquier ADN bicatenario (por ejemplo, EvaGreen y otros colorantes descritos en este documento), y (2) sondas de ADN específicas de secuencia que consisten en oligonucleótidos que están marcados con un indicador fluorescente que permite la detección solamente después de hibridación de la sonda con su diana de ADN complementario DNA. Las sondas TaqMan consisten en un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de la sonda oligonucleotídica y un inactivador en el extremo 3'. Están disponibles varios fluoróforos diferentes (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína, acrónimo: FAM, o tetraclorofluoresceína, acrónimo: TET) e inactivadores (por ejemplo, tetrametilrodamina, acrónimo: TAMRA, o agente de unión al surco menor dihidrociclopirroloindol tripéptido, acrónimo: MGB). La molécula inactivadora inactiva la fluorescencia emitida por el fluoróforo cuando se excita por la fuente de luz del ciclador mediante FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). Siempre que el fluoróforo y el inactivador están en proximidad, la inactivación inhibe cualquier señal de fluorescencia.

La PCR a tiempo real puede combinarse con transcripción inversa para cuantificar el ARN mensajero y ARN no codificante en células o tejidos. También se proporciona evaluación cuantitativa del proceso de amplificación en tiempo real por métodos descritos en este documento. La evaluación de un proceso de amplificación en "tiempo real" implica determinar la cantidad de amplicón en la mezcla de reacción de forma continua o periódica durante la reacción de amplificación, y los valores determinados se usan para calcular la cantidad de secuencia diana inicialmente presente en la muestra. Hay una diversidad de métodos para determinar la cantidad de secuencia diana inicial presente en una muestra basada en amplificación a tiempo real. Éstos incluyen aquellos descritos por Wittwer et al., "Method for Quantification of an Analyte", patente de Estados Unidos 6.303.305, y Yokoyama et al., "Method for Assaying Nucleic Acid", patente de Estados Unidos 6.541.205. Otro método para determinar la cantidad de secuencia diana inicialmente presente en una muestra, pero que no se basa en amplificación a tiempo real, se describe por Ryder et al., "Method for Determining Pre-Amplification Levels of a Nucleic Acid Target Sequence from Post-Amplification Levels of Product", patente de Estados Unidos 5.710.029. La presente invención es particularmente adecuada para evaluación a tiempo real, porque la producción de productos secundarios está rebajada, disminuida, o sustancialmente eliminada.

Los productos de amplificación pueden detectarse en tiempo real a través del uso de diversas sondas de auto-hibridación, la mayoría de las cuales tienen una estructura tronco-bucle. Dichas sondas de auto-hibridación se marcan de modo que emitan señales diferentemente detectables, dependiendo de si las sondas están en un estado auto-hibridado o un estado alterado a través de hibridación con una secuencia diana.

Otro ejemplo de una sonda de detección que tiene auto-complementariedad es una "baliza molecular". Las balizas moleculares incluyen moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia complementaria diana, un par de afinidad (o brazos de ácido nucleico) que alojan la sonda en una conformación cerrada en ausencia de una secuencia diana presente en un producto de amplificación, y un par marcador que interacciona cuando la sonda está en una conformación cerrada. La hibridación de la secuencia diana y la secuencia complementaria diana separa los miembros del par de afinidad, cambiando de este modo la sonda a una conformación abierta. El cambio a la conformación abierta es detectable debido a la interacción reducida del par marcador, que puede ser, por ejemplo, un fluoróforo y un inactivador (por ejemplo, DABCYL y EDANS). Las balizas moleculares se describen por Tyagi et al., "Detectably Labeled Dual Confirmation Oligonucleotide Probes, Assays and Kits," patente de Estados Unidos

5.925.517, y Tyagi et al., "Nucleic Acid Detection Probes Having Non-FRET Fluorescence Quenching and Kits and Assays Including Such Probes," patente de Estados Unidos 6.150.097.

5 Otras sondas de auto-hibridación para su uso en los métodos descritos en este documento son bien conocidas para los especialistas en la técnica. A modo de ejemplo, pueden adaptarse pares de unión a sonda que tienen marcadores de interacción, tales como los descritos por Morrison, "Competitive Homogenous Assay," patente de Estados Unidos 5.928.862 para su uso en la presente invención. Los sistemas de sonda usados para detectar polimorfismos de un único nucleótido (snp) también podrían utilizarse en la presente invención. Sistemas adicionales de detección incluyen "conmutadores moleculares", como se describe por Arnold et al., "Oligonucleotides Comprising a Molecular Switch," solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/467.517, que posee propiedad común con la presente solicitud. Y otras sondas, tales como las que comprenden colorantes intercalantes y/o fluorocromos, podrían ser útiles para la detección de productos de amplificación en la presente invención. Véase, por ejemplo, Ishiguro et al., "Method of Detecting Specific Nucleic Acid Sequences," patente de Estados Unidos 5.814.447.

15 Las señales producidas en las reacciones de qPCR descritas en este documento pueden detectarse en una diversidad de modos. Generalmente, puede detectarse un cambio de intensidad de señal por cualquier método conocido en la técnica y generalmente es dependiente de la elección del grupo fluorescente usado. Puede realizarse con la ayuda de un sistema óptico. Dicho sistema normalmente comprende al menos dos elementos, concretamente una fuente de excitación y un detector de fotones. Están disponibles en la técnica numerosos ejemplos de estos elementos. Una fuente de excitación ejemplar es un láser, tal como un láser polarizado. La elección de la luz láser dependerá del grupo fluorescente unido a la sonda. Para la mayoría de los grupos fluorescentes, la luz de excitación requerida está dentro del intervalo de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 1200 nm, o más comúnmente de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 900 nm. Como alternativa, los compuestos de la invención pueden excitarse usando una longitud de onda de excitación de aproximadamente 300 a aproximadamente 350 nm, de 350 a 400 nm, de 400 a 450 nm, de 450 a 500 nm, de 500 a 550 nm, de 550 a 600 nm, de 600 a 650 nm, de 650 a 700 nm, de 750 nm a 800 nm, o de 800 nm a 850 nm, simplemente a modo de ejemplo. Los especialistas en la técnica pueden averiguar fácilmente la longitud de onda de excitación apropiada para excitar un fluoróforo dado por experimentación rutinaria (véase, por ejemplo, The Handbook - 'A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Décima Edición (2005) (disponible en Invitrogen, Inc./Molecular Probes)). Cuando se desea, uno puede emplear otros sistemas ópticos. Estos sistemas ópticos pueden comprender elementos tales como lector óptico, sistema de detección de fotones de alta eficacia, tubo foto multiplicador, FET sensible a desconexión periódica, FET de nanotubo, fotodiodo (por ejemplo, fotodiodos de avalancha (APD)), cámara, dispositivo de acoplamiento de carga (CCD), dispositivo de acoplamiento de carga multiplicador de electrones (EMCCD), dispositivo de acoplamiento de carga intensificado (ICCD), y microscopio confocal. Estos sistemas ópticos también pueden comprender elementos de transmisión óptica tales como fibras ópticas, conmutadores ópticos, espejos, lentes (incluyendo microlentes y nanolentes), colimadores. Otros ejemplos incluyen atenuadores ópticos, filtros de polarización (por ejemplo, filtro dicróico), filtros de longitud de onda (paso bajo, paso banda, o paso alto), placas de onda, y líneas de retardo. En algunas realizaciones, el elemento de transmisión óptica puede ser guíaondas planos en comunicación óptica con los límites ópticos en serie. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 7.292.742, 7.181.122, 7.013.054, 6.917.726, 7.267.673, y 7.170.050. Estos y otros componentes ópticos conocidos en la técnica pueden combinarse y ensamblarse en una diversidad de modos para realizar la detección de señales distinguibles.

45 También puede usarse análisis de fusión de alta resolución (HRM) para detectar y cuantificar ADN amplificado después de reacción de PCR usando cualquiera de las polimerasas descritas en este documento. Ejemplos no limitantes de usos para HRM incluyen: tipado de SNP/detección de mutaciones puntuales; ensayo de cigosidad en una locus particular, y análisis del estado de metilación de ADN.

50 Las polimerasas y otras composiciones descritas en este documento pueden usarse en una amplia diversidad de aplicaciones de biología molecular. Ejemplos no limitantes incluyen: reacciones de secuenciación; clonación; mutagénesis; detección de genes; detección de mutaciones puntuales; hibridación sustractiva, y microseries.

Métodos para la fabricación o síntesis de péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión

55 Los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión proporcionados en este documento pueden prepararse usando técnicas recombinantes o sintéticas bien conocidas en la técnica. En particular, la síntesis de proteínas en fase sólida es muy adecuada para la longitud relativamente corta de los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión y puede proporcionar mayores rendimientos con resultados más consistentes. Además, la síntesis de proteínas en fase sólida puede proporcionar flexibilidad adicional respecto a la fabricación de los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión. Por ejemplo, pueden incorporarse modificaciones químicas deseadas en los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión en la fase de síntesis: podría usar homocitrulina en la síntesis del péptido en oposición a lisina, obviando de este modo la necesidad de carbamilar el péptido después de la síntesis.

Síntesis

65 En la síntesis en fase sólida de un péptido se inmoviliza un aminoácido con protección tanto de grupo alfa-amino

como de cadena lateral en una resina. Véase, por ejemplo, Nilsson, B., Soellner, M., y Raines, R. *Chemical Synthesis of Proteins*, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2005, 34:91-118; Meldal M. 1997, Properties of solid supports. *Methods Enzymol.* 289:83-104; y Songster M F, Barany G. 1997, Handles for solid-phase peptide synthesis, *Methods Enzymol.* 289:126-74. Normalmente, se usan dos tipos de grupos protectores alfa-amino: un grupo terc-butoxicarbonilo (Boc) sensible a ácido o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) sensible a base. Wellings D A, Atherton E. 1997. Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol.* 289:44-67. Después de la rápida y completa retirada de estos grupos protectores alfa-amino puede entonces acoplarse otro aminoácido protegido con un grupo carboxilo activado, a la amina unida a la resina no protegida. Mediante el uso de un exceso de aminoácido soluble activado, re fuerza a que las reacciones de acoplamiento se completen. El ciclo de desprotección y acoplamiento se repite hasta completar la secuencia. Con desprotección de cadena lateral y escisión, la resina produce el péptido deseado. Guy C A, Fields G B. 1997, Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry, *Methods Enzymol.* 289:67-83, y Stewart J M. 1997, Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis, *Methods Enzymol.* 289:29-44. Se describen métodos adicionales para realizar síntesis de proteínas en fase sólida en Bang, D. y Kent, S., 2004, A One-Pot Total Synthesis of Crambin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:2534-2538; Bang, D., Chopra, N., y Kent, S. 2004, Total Chemical Synthesis of Crambin., *J. Am. Chem. Soc.* 126:1377-1383; Dawson, P. et al., 1994, Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science*, 266:776-779; Kochendoerfer et al., 2003, Design and Chemical Synthesis of a Homogenous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein, *Science*, 299: 884-887.

Si fuera necesario, pueden combinarse péptidos más pequeños derivados de síntesis peptídica en fase sólida a través de ligamientos de péptidos tales como ligamiento químico nativo. En este proceso, el tiolato de un resto N-terminal de cisteína de un péptido ataca el tioéster C-terminal de un segundo péptido para afectar a la transtioesterificación. Se forma un enlace amida después de rápida transferencia de S.fwdarw.N acilo. Véase Dawson, P. et al. 1994, Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science*, 266:776-779.

Además, los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión proporcionados en este documento pueden abarcar peptidomiméticos, péptidos que incluyen aminoácidos tanto de origen natural como de origen no natural, tales como peptoides. Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas, ácido glicólico, tiopronina, sarcosina, y tiorfano. Estas estructuras tienden a tener una estructura general de $-(C=O)-CH_2-NR-$ actuando el grupo R como cadena lateral. Dichos peptoides pueden sintetizarse usando síntesis en fase sólida de acuerdo con los protocolos de Simon et al., Peptoids: A molecular approach to drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:9367-9371 (1992); y Li et al., Photolithographic Synthesis of Peptoids, *J. AM. CHEM. SOC.* 2004, 126, 4088-4089. Además, se proporcionan en este documento usos de peptidomiméticos o miméticos de péptidos, fármacos no peptídicos con propiedades análogas a aquellas del péptido molde. (Fauchere, J. (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber y Friedinger (1985) *TINS* p. 32; y Evans et al. (1987) *J. Med. Chem* 30:1229). La síntesis de diversos tipos de peptidomiméticos se ha revisado por ejemplo en: *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics-Workbench Edition Volumen E22c (Redactor jefe Goodman M.) 2004.

Técnicas recombinantes

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión en hospedador para producir los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión proporcionados en este documento. Dichos sistemas de expresión en hospedador representan vehículos por los cuales pueden producirse los péptidos, polipéptidos, o polipéptidos de fusión de interés y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden mostrar, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes apropiadas de nucleótidos, el producto génico modificado in situ. Éstos incluyen aunque sin limitación, bacterias, insectos, plantas, mamíferos, incluyendo sistemas hospedadores humanos tales como, aunque sin limitación, sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes de péptido, polipéptido, o polipéptido de fusión; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes; o sistemas de células de mamífero, incluyendo sistemas de células humanas, por ejemplo, HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3, que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero, por ejemplo, promotor de la metalotioneína, o de virus de mamífero, por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia.

Además, puede elegirse una cepa celular hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones y procesamiento de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos específicos para el procesamiento post-traduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, la glucosilación, y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero, incluyendo células hospedadoras humanas, incluyen aunque sin limitación HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, y W138.

Para producción de alto rendimiento a largo plazo de péptidos recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería líneas celulares que expresan de forma estable el producto génico de molécula relacionada con citoquina protectora tisular recombinante. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados, por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, y similares, y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN foráneo, las células modificadas por ingeniería pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar por ingeniería líneas celulares que expresen el producto protector de tejido. Dichas líneas celulares modificadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena del producto génico.

15 **Síntesis de polinucleótidos**

Puede usarse cualquier método conocido para sintetizar polinucleótidos. Puede usarse la síntesis en fase sólida descrita por Caruthers et al. en la patente de Estados Unidos 4.458.066. En esta técnica, la cadena de ADN en crecimiento se une a un soporte insoluble mediante un enlazador orgánico largo que permite que la cadena de ADN en crecimiento se solubilice en el disolvente en que está colocado el soporte. La cadena de ADN solubilizada, aún inmovilizada se deja de este modo reaccionar con reactivos en el disolvente adyacente y permite el fácil lavado de los reactivos del soporte sólido al cual está unido el oligonucleótido.

Existen varios sitios en los nucleósidos de naturaleza química similar, por ejemplo los grupos -OH o hidroxilo. Sin embargo, durante la síntesis de oligonucleótidos, las subunidades monoméricas deben unirse a la molécula oligonucleotídica en crecimiento de un modo específico de sitio. Esto requiere funcionalizar un sitio en la cadena en crecimiento o en la base entrante para la unión del bloque de construcción monomérico a la cadena en crecimiento. Para evitar que el monómero entrante se une al sitio incorrecto, los sitios incorrectos deben bloquearse mientras que el sitio correcto se deja abierto a reacción. Esto requiere el uso de grupos protectores, que son compuestos unidos temporalmente a un sitio potencialmente reactivo de modo que se evita que reaccione. El grupo protector debe ser estable durante dichas reacciones y también debe retirarse finalmente para producir el sitio original. La síntesis de oligonucleótidos requiere la protección de varios sitios y sitios particulares deben desprotegerse mientras otros permanecen protegidos. Estos grupos protectores agrupados juntos como un conjunto se llaman grupos protectores ortogonales.

Los protocolos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida normalmente usan un grupo protector dimetoxitritilo para el 5' hidroxilo de nucleósidos. Se utiliza una funcionalidad fosforamidita en la posición 3' hidroxilo. La síntesis generalmente progresa desde 3' hasta 5' del componente de azúcar ribosa o desoxirribosa del nucleósido fosforamidita en un ciclo de síntesis que añade un nucleótido cada vez a la cadena oligonucleotídica en crecimiento. Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859. En la primera etapa del ciclo de síntesis, la etapa de "acoplamiento", el extremo 5' de la cadena en crecimiento se acopla con la 3' fosforamidita del monómero entrante para formar un intermedio fosfita triéster (el 5' hidroxilo del monómero añadido tiene un grupo protector de modo que solamente un nuevo monómero se añade a la cadena en crecimiento por ciclo). Matteucci et al. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103:3185. Después, se usa una "reacción de protección con capuchón" opcional para detener la síntesis en cualquier cadena que tenga un 5' hidroxilo sin reaccionar, que sería un nucleótido al final de la síntesis. El intermedio fosfita triéster se somete a oxidación (la etapa de "oxidación") después de cada reacción de acoplamiento para producir un intermedio fosfo-triéster más estable. Sin oxidación, el enlace fosfita triéster inestable se escindiría en las condiciones ácidas de etapas posteriores de síntesis. Letsinger et al. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98:3655. La retirada del grupo protector 5' del monómero recién añadido (la etapa de "desprotección") se consigue normalmente por reacción con solución ácida para producir un grupo hidroxilo 5' libre, que puede acoplarse al siguiente nucleósido fosforamidita protegido. Este proceso se repite para cada monómero añadido hasta que se sintetiza la secuencia deseada.

De acuerdo con algunos protocolos, el ciclo de síntesis de acoplamiento, protección, oxidación, y desprotección se acorta omitiendo la etapa de protección con capuchón o sacando la etapa de oxidación 'fuera' del ciclo y realizando una única reacción de oxidación sobre la cadena completada. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos de acuerdo con protocolos de H-fosfonato permitirá una única etapa de oxidación a la conclusión de los ciclos de síntesis. Sin embargo, los rendimientos de acoplamiento son menos eficaces que aquellos para química de fosforamidita y la oxidación requiere tiempos más largos y reactivos más severos que la química de amidita.

El grupo químico convencionalmente usado para la protección de 5'-hidroxilos de nucleósido es dimetoxitritilo ("DMT"), que se puede retirar con ácido. Khorana (1968) Pure Appl. Chem. 17:349; Smith et al. (1962) J. Am. Chem. Soc. 84:430. Este grupo protector inestable en ácido proporciona varias ventajas para trabajar tanto con nucleósidos como con oligonucleótidos. Por ejemplo, el grupo DMT puede introducirse en un nucleósido de forma regioselectiva y en alto rendimiento. Brown et al. (1979) Methods in Enzymol. 68:19. Además, la lipofilicidad del grupo DMT aumenta enormemente la solubilidad de los nucleósidos en disolventes orgánicos, y el carbocación resultante de la

desprotección ácida da un cromóforo fuerte, que puede usarse para controlar indirectamente la eficacia de acoplamiento. Matteucci et al. (1980) Tetrahedron Lett. 21:719. Además, la hidrofobicidad del grupo puede usarse para ayudar a la separación en HPLC de fase inversa. Becker et al. (1985) J. Chromatogr. 326:219.

Métodos relacionados con el tratamiento, prevención o diagnóstico de enfermedad

5 Las polimerasas descritas en este documento pueden usarse en numerosas aplicaciones, incluyendo el perfilado de la expresión génica, la identificación de variaciones de secuencia, la detección de microbios, y la determinación de carga viral. Dado que son estables a temperaturas más calientes, pueden ser particularmente útiles en kits diseñados para diagnosticar enfermedades en climas más cálidos. Las polimerasas pueden usarse para evaluar patologías infecciosas (por ejemplo, VIH-1, VIH-2, virus de hepatitis (por ejemplo, hep a, hep b, hep c), malaria) de un sujeto. Las polimerasas descritas en este documento pueden usarse en kits para detectar dichos patógenos así como kits diseñados para identificar la carga viral. En otros casos, las polimerasas pueden usarse para diagnosticar, tratar, o proporcionar un pronóstico para enfermedades genéticas (por ejemplo, cánceres, enfermedades

15 Las polimerasas pueden usarse para evaluar, tratar, diagnosticar infecciones causadas por numerosos virus incluyendo: virus de la leucemia de Abelson, virus de la leucemia murina de Abelson, virus de Abelson, virus de la laringotraqueobronquitis aguda, virus de Adelaide River, grupos de virus Adeno asociados, Adenovirus, virus de la enfermedad equina africana, virus de la fiebre porcina africana, virus del SIDA, parvovirus de la enfermedad del visón Aleutian, Alfa-retrovirus, Alfavirus, virus relacionado con ALV, virus Amapari, Aftovirus, Aquareovirus, Arbovirus, Arbovirus C, grupo A de arbovirus, grupo B de arbovirus, grupo de Arenavirus, virus de la fiebre hemorrágica argentina, Arterivirus, Astrovirus, grupos de herpesvirus Ateline, virus de la enfermedad de Aujeszky, virus Aura, virus de la enfermedad de Ausduk, lisavirus del murciélago australiano, Aviadenovirus, virus de eritroblastosis aviar, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la leucemia aviar, virus de la leucosis aviar, virus de la linfomatosis aviar, virus de la mieloblastosis aviar, paramixovirus aviar, virus de la pneumoencefalitis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, virus del sarcoma aviar, grupo de retrovirus tipo C aviar, Avihepadnavirus, Avipoxvirus, virus B, virus B 19, virus Babanki, herpesvirus de babuino, baculovirus, virus Barmah Forest, virus Bebaru, virus Berrimah, Betaretrovirus, Birnavirus, virus Bittner, virus BK, virus Black Creek Canal, virus de la fiebre catarral, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la enfermedad de Boma, virus de la enfermedad límita de

20 ovejás, virus boma, alfaherpesvirus 1 bovino, alfaherpesvirus 2 bovino, coronavirus bovino, virus de la fiebre efímera bovina, virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de la leucemia bovina, virus de la leucosis bovina, virus de la mamilitis bovina, papilomavirus bovino, virus de la estomatitis papular bovina, parvovirus bovino, virus sincitial bovino, oncovirus bovino tipo C, virus de la diarrea vírica bovina, virus Buggy Creek, grupo de virus con forma de bala, supergrupo de virus Bunyamwera, Bunyavirus, virus del linfoma de Burkitt, fiebre Bwamba, virus CA, Calicivirus, virus de la encefalitis de California, virus de la viruela de camélidos, virus de la viruela del canario, herpesvirus de cánidos, coronavirus canino, virus del moquillo canino, herpesvirus canino, virus de minuto canino, parvovirus canino, virus Cano Delgadito, virus de la artritis caprina, virus de la encefalitis caprina, Herpesvirus caprino, virus de la viruela caprina, Cardiovirus, herpesvirus 1 caviid, herpesvirus 1 Cercopitecid, herpesvirus 1 cercopitecina, herpesvirus 2 Cercopitecina, virus Chandipura, virus Changuinola, virus de pez gato, virus Charleville,

35 virus de la viruela del pollo, virus Chikungunya, herpesvirus de chimpancé, reovirus de verdel, virus de salmón chum, virus Cocal, reovirus de salmón Coho, virus de exantema coital, virus de la fiebre por garrapatas de Colorado, Coltivirus, virus Columbia SK, virus del catarro común, virus de ectima contagioso, virus de dermatitis pustular contagiosa, Coronavirus, virus Corripata, virus coryza, virus de la viruela bovina, virus coxsackie, CPV (virus de la polihedrosis citoplásmica), virus de la parálisis del grillo, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus asociado a crup, Criptovirus, Cipovirus, Citomegalovirus, grupo de citomegalovirus, virus de la polihedrosis citoplásmica, papilomavirus del ciervo, deltaretrovirus, virus dengue, Densovirus, Dependovirus, virus Dhorí, virus diploma, virus de Drosophila C, virus de la hepatitis B del pato, virus 1 de la hepatitis del pato, virus 2 de la hepatitis del pato, duovirus, virus Duvenhage, virus de alas deformadas DWV, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis quina oriental, virus EB, virus Ebola, virus tipo Ebola, echo virus, echovirus, echovirus 10, echovirus 28, echovirus 9, virus de ectromelia, virus EEE, virus EIA, virus EIA, virus de encefalitis, virus del grupo de encefalomiocarditis, virus de encefalomiocarditis, Enterovirus, virus de elevación enzimática, virus de elevación enzimática (LDH), virus de la fiebre hemorrágica epidémica, virus de la enfermedad hemorrágica epizootica, virus Epstein-Barr, alfaherpesvirus 1 de équidos, alfaherpesvirus 4 de équidos, herpesvirus 2 de équidos, virus del aborto equino, virus de la arteritis equina, virus de la encefalosis equina, virus de la anemia infecciosa equina, morbilivirus equino, virus de la rinopneumonitis equina, rinovirus equino, virus Eubenangu, papilomavirus del alce europeo, virus de la fiebre porcina europea, virus Everglades, virus Eyach, herpesvirus 1 de félidos, calicivirus felino, virus de fibrosarcoma felino, herpesvirus felino, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de leucemia/sarcoma felino, virus de leucemia felina, virus de panleucopenia felina, parvovirus felino, virus de sarcoma felino, virus sincitial felino, Filovirus, virus Flanders, Flavivirus, virus de la enfermedad pie y boca, virus Fort Morgan, hantavirus Four Corners, adenovirus 1 de aves de corral, virus de la viruela de aves de corral, virus Friend, Gamma-retrovirus, virus de hepatitis GB, virus GB, virus del sarampión alemán, virus Getah, virus de la leucemia del gibón, virus de la fiebre glandular, virus de la viruela caprina, virus golden shinner, virus Gonometá, parvovirus del ganso, virus de granulosis, virus de Gross, virus de la hepatitis B de la marmota, arbovirus grupo A, virus Guanarito, citomegalovirus de cobaya, virus de cobaya tipo C, virus Hantaan, Hantavirus, reovirus de almejón, virus de fibroma de la liebre, HCMV (citomegalovirus humano), virus 2 de hemadsorción, virus de hemaglutinación de Japón, virus de la fiebre hemorrágica, virus hendra, Henipavirus, Hepadnavirus, virus de hepatitis A, grupo de virus de hepatitis B,

virus de hepatitis C, virus de hepatitis D, virus de hepatitis delta, virus de hepatitis E, virus de hepatitis F, virus de hepatitis G, virus de hepatitis no A no B, virus de hepatitis, virus de hepatitis (no humana), reovirus 3 de hepatoencefalomielitis, Hepatovirus, virus de hepatitis B de la garza, virus de herpes B, virus del herpes simple, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, herpesvirus, herpesvirus 7, Herpesvirus ateles, Herpesvirus hominis,

 5 infección por Herpesvirus, Herpesvirus saimiri, Herpesvirus suis, Herpesvirus varicellae, virus Highlands J, rabdovirus Hirame, virus del cólera del cerdo, adenovirus 2 humano, alfa herpesvirus 1 humano, alfa herpesvirus 2 humano, alfa herpesvirus 3 humano, virus linfotrópico B humano, beta herpesvirus 5 humano, coronavirus humano, grupo de citomegalovirus humano, virus espumoso humano, gamma herpesvirus 4 humano, gamma herpesvirus 6 humano, virus de la hepatitis A humana, grupos de herpesvirus 1 humano, grupo de herpesvirus 2 humano, grupo de

 10 herpesvirus 3 humano, grupo de herpesvirus 4 humano, herpesvirus 6 humano, herpesvirus 8 humano, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia humana 1, virus de la inmunodeficiencia humana 2, papilomavirus humano, virus de leucemia de células T humana, virus de leucemia de células T humana I, virus de leucemia de células T humana II, virus de leucemia de células T humana III, virus de linfoma de células T humana I, virus de linfoma de células T humana II, virus de linfoma de células T humanas tipo I, virus linfotrópico de células T humanas tipo 2, virus linfotrópico T humano I, virus linfotrópico T humano II, virus linfotrópico T humano III,

 15 Ichnovirus, virus de gastroenteritis infantil, virus de rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de necrosis haematopoyetica infecciosa, virus de necrosis pancreática infecciosa, virus A de influenza, virus B de influenza, virus C de influenza, virus D de influenza, virus pr8 de influenza, virus iridescente de insectos, virus de insectos, iridovirus, virus japonés B virus, virus de la encefalitis japonesa, virus JC, virus Junin, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi, virus Kemerovo, virus de rata de Kilham, virus Klamath, virus Kolongo, virus de la fiebre hemorrágica coreana, virus kumba, virus de la enfermedad forestal Kysanur, virus Kyzylagach, virus La Crosse, virus que eleva la láctico deshidrogenasa, virus de láctico deshidrogenasa, virus del murciélago Lagos, virus Langur, parvovirus lapine, virus de fiebre Lassa, virus Lassa, virus de rata latente, virus LCM, virus Leaky, Lentivirus, Leporipoxvirus, virus de leucemia, leucovirus, virus de enfermedad cutánea grumosa, virus asociado a linfadenopatía, Linfocriptovirus, virus de coriomeningitis linfocítica, grupo de virus linfoproliferativo, virus Machupo, virus de prurito insorportable, grupo de oncovirus de mamífero tipo B, retrovirus de mamífero tipo B, grupo de retrovirus de mamífero tipo C, retrovirus de mamífero tipo D, virus de tumor mamario, virus Mapuera, virus Marburg, virus tipo Marburg, virus del mono de Mason Pfizer, Mastadenovirus, virus Mayaro, virus ME, virus del sarampión, virus Menangle, virus Mengo, Mengovirus, virus Middelburg, virus de nódulo de leche, virus de la enteritis del visón, virus minuto de ratones, virus relacionado con MLV, virus MM, virus Mokola, Moluscipoxvirus, virus contagioso de molusco, virus de mono B, virus de la viruela del mono, Mononegavirales, Morbilivirus, virus del murciélago de Mount Elgon, citomegalovirus de ratón, virus de la encefalomielitis de ratón, virus de la hepatitis de ratón, virus de ratón K, virus de la leucemia de ratón, virus de tumor mamario de ratón, virus minuto de ratón, virus de la neumonía de ratón, virus de la poliomieltitis de ratón, poliomavirus de ratón, virus de sarcoma de ratón, virus de la viruela del ratón, virus Mozambique, virus Mucambo, virus de la enfermedad mucosa, virus de las paperas, beta herpesvirus 1 de múridos, citomegalovirus 2 de múridos, grupo de citomegalovirus murino, virus de la encefalomielitis murina, virus de la hepatitis murina, virus de la leucemia murina, virus que induce nódulos murinos, poliomavirus murino, virus de sarcoma murino, Muromegalovirus, virus de la encefalitis de Murray Valley, virus de mixoma, Mixovirus, Mixovirus multiforme, Mixovirus parotitidis, virus de la enfermedad de ovejas de Nairobi, Nairovirus, Nanirnavirus, virus Nariva, virus Ndumo, virus Neethling, virus Nelson Bay, virus neurotrópico, Arenavirus del nuevo mundo, virus de pneumonitis del recién nacido, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Nipah, virus no citopatogénico, virus Norwalk, virus de la polihedrosis nuclear (NPV), virus del cuello del pezón, virus O'nyong'nyong, virus Ockelbo, virus oncogénico, partícula tipo virus oncogénico, oncornavirus, Orbivirus, virus Orf, virus Oropouche, Ortohepadnavirus, Ortomixovirus, Ortopoxvirus, Ortoreovirus, Orungo, papilomavirus ovino, virus de la fiebre catarral ovina, herpesvirus del mono búho, virus Palyam, Papilomavirus, Papilomavirus sylvilagi, Papovavirus, virus de parainfluenza, virus de parainfluenza tipo 1, virus de parainfluenza tipo 2, virus de parainfluenza tipo 3, virus de parainfluenza tipo 4, Paramixovirus, Parapoxvirus, virus paravaccinia, Parvovirus, Parvovirus B19, grupo de parvovirus, Pestivirus, Plebovirus, virus del moquillo de las focas, Picodnavirus, Picornavirus, citomegalovirus del cerdo - virus de la viruela de la paloma, virus Piry, virus Pixuna, virus de la neumonía del ratón, Pneumovirus, virus de la poliomieltitis, poliovirus, Polidnavirus, virus poliédrico, polioma virus, Poliomasvirus, Poliomasvirus bovis, Poliomasvirus cercopithecii, Poliomasvirus hominis 2, Poliomasvirus maccacae 1, Poliomasvirus muris 1, Poliomasvirus muris 2, Poliomasvirus papionis 1, Poliomasvirus papionis 2, Poliomasvirus sylvilagi, herpesvirus 1 Pongine, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de encefalomielitis hemaglutinante porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus porcino tipo C, pox virus, poxvirus, poxvirus variolae, virus Prospect Hill, Provirus, virus de la pseudoviruela bovina, virus de la pseudorrabia, virus de la viruela de psitácidas, virus de la viruela de codornices, virus de fibroma de conejo, virus vacuolante renal del conejo, papilomavirus de conejo, virus de la rabia, parvovirus de mapache, virus de la viruela del mapache, virus Ranikhet, citomegalovirus de rata, parvovirus de rata, virus de rata, virus de Rauscher, virus vaccinia recombinante, virus recombinante, reovirus, reovirus 1, reovirus 2, reovirus 3, virus reptiliano tipo C, virus de infección respiratoria, virus sincitial respiratorio, virus respiratorio, virus de reticuloendoteliosis, Rabdovirus, Rabdovirus carpia, Radinivirus, Rinovirus, Rizidiovirus, virus de la fiebre de Rift Valley, virus de Riley, virus de la peste bovina, virus tumoral ARN, virus Ross River, Rotavirus, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous, virus de la rubéola, virus del sarampión, Rubivirus, virus de la encefalitis otoñal rusa, virus de simio SA 11, virus SA2, virus Sabia, virus Sagiyama, herpesvirus 1 Saimirine, virus de las glándulas salivares, grupo del virus de la fiebre por flebotomo, virus Sandjimba, virus SARS, SDAV (virus de sialodacrioadenitis), virus de la viruela de la foca, Virus Semliki Forest, virus Seoul, virus de la viruela de la oveja, virus del fibroma de Shope, papiloma virus de Shope, virus espumoso de simio, virus de hepatitis A de simio, virus

de la inmunodeficiencia humana de simio, virus de la inmunodeficiencia del simio, virus de parainfluenza de simio, virus linfotrófico de células T de simio, virus de simio, virus 40 de simio, Simplexvirus, Sin Nombre virus, virus Sindbis, virus de la viruela, virus de fiebres hemorrágicas de América del Sur, virus de la viruela del gorrión, Spumavirus, virus de fibroma de la ardilla, retrovirus de mono ardilla, grupo de virus SSV 1, STLV (virus linfotrófico T de simio) tipo I, STLV (virus linfotrófico T de simio) tipo II, STLV (virus linfotrófico T de simio) tipo III, virus de la estomatitis papulosa, virus submaxilar, alfaherpesvirus 1 suid, herpesvirus 2 suid, Suipoxvirus, virus de la fiebre del pantano, virus de la viruela porcina, virus de la leucemia de ratones Swiss, virus TAC, virus Tacaribe complex, virus Tacaribe, virus Tanapox, virus Taterapox, reovirus Tench, virus de encefalomiелitis de Theiler, virus de Theiler, virus Thogoto, virus Thottapalayam, virus de la encefalitis contagiada por garrapatas, virus Tioman, Togavirus, Torovirus, virus tumorales, virus Tupaia, virus de la rinotraqueítis del pavo, virus de la viruela del pavo, retrovirus tipo C, oncovirus tipo D, grupo de retrovirus tipo D, rabdovirus de enfermedad ulcerativa, virus Una, grupo de virus Uukuniemi, virus vaccinia, virus vacuolante, virus varicella zoster, Varicelovirus, xvirus varicella zoster, virus variola mayor, virus variola, virus de la enfermedad de Vasin Gishu, virus VEE, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la estomatitis vesicular, Vesiculovirus, virus Vilyuisk, retrovirus de víbora, virus de septicemia hemorrágica vírica, virus Visna Maedi, virus Visna, virus de la viruela del musgano, VSV (virus de la estomatitis vesicular), virus Wallal, virus Warrego, virus de verrugas, virus WEE, virus West Nile, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalomiелitis equina occidental, virus Whataroa, virus del vómito invernal, virus de la hepatitis B de la marmota, virus del sarcoma del mono lanudo, virus tumoral lesional, virus WRSV, virus tumoral de mono Yaba, virus Yaba, Yatapoxvirus, virus de la fiebre amarilla, y el virus Yug Bogdanovac.

Ejemplos

Ejemplo 1: Amplificación de ADN genómico de cebada

La Figura 15 muestra los resultados de la amplificación de ADN genómico de cebada usando marca peptídica-polimerasa (una forma modificada con aldehído de la SEC ID N°2) en comparación con dos polimerasas disponibles en el mercado (ABI Gold™ y Roche FastStart™).

El ADN genómico de cebada se obtuvo de 5 genomas diferentes. El carril 7 muestra una escala de 100 pb.

A continuación se da una descripción de los carriles:

Carriles 1-3 - marca peptídica-polimerasa a 2,5 U/100 µl de reacción de PCR, dilución de factor 10x de marca peptídica-polimerasa partiendo de 1 ng/µl
 Carriles 4-6 - marca peptídica-polimerasa a 4 U/100 µl
 Carriles 8-10 - ABI Gold™ a 2,5 U/100 µl de reacción de PCR, dilución de factor 10x de ABI Gold™ partiendo de 1 ng/µl;
 Carriles 11-13 - ABI Gold™ a 4 U/100 µl
 Carriles 14-16 - Roche FastStart™ a 2,5 U/100 µl de reacción de PCR, dilución de factor 10x de ABI Gold™ partiendo de 1 ng/µl
 Carriles 17-19 - Roche FastStart™ a 4 U/100 µl
 Carriles 1-3 (marca peptídica-polimerasa) 2,5 U solamente - muestra amplificación de ADN
 Carril 8 (ABI) muestra pequeño producto no específico (difuminado)
 Carriles 14-16 - (Roche) no muestra producto en 2,5 U

Ejemplo 2: Amplificación de ADN genómico de ratón usando mezclas de marca peptídica-polimerasa

La Figura 26 muestra los resultados de la amplificación de ADN genómico de ratón usando una diversidad de mezclas de polimerasa. El carril 1 muestra una escala de ADN de 1 kb. Los carriles 2-10 muestran la amplificación de ADN genómico de ratón, 1 ng/µl en 1x PCR. Todas las mezclas produjeron la longitud correcta de producto de PCR de 3838 pb. Los carriles 11-19 corresponden a las mismas mezclas que en los carriles 2-10 pero usando ADN molde plasmídico. El producto de PCR esperado fue de ~8,6 kb y solamente una mezcla de marca peptídica-polimerasa MgCl₂ 1,5 mM (carril 17) produjo el producto correcto. La mezcla de marca peptídica-polimerasa contiene formas modificadas con aldehído de la SEC ID N° 2, SEC ID N° 6 y SEC ID N° 11. Los carriles 20 y 21 muestran PCR de marca peptídica-polimerasa solamente, que no produjo producto. Se da a continuación una descripción de los carriles:

Carril 1- escala de ADN de 1 kb.
 Carril 2- mezcla de marca peptídica-polimerasa con albúmina sérica bovina (BSA) lista para cargar (MgCl₂ 1,5 mM)
 Carril 3- mezcla de marca peptídica-polimerasa con BSA lista para cargar (MgCl₂ 2,0 mM)
 Carril 4- mezcla de marca peptídica-polimerasa con BSA lista para cargar (MgCl₂ 2,5 mM)
 Carril 5- mezcla de marca peptídica-polimerasa con BSA (MgCl₂ 1,5 mM)
 Carril 6- mezcla de marca peptídica-polimerasa con BSA (MgCl₂ 2,0 mM)

- Carril 7- mezcla de marca peptídica-polimerasa con BSA (MgCl₂ 2,5 mM)
- Carril 8- mezcla de marca peptídica-polimerasa MgCl₂ 1,5 mM
- Carril 9- mezcla de marca peptídica-polimerasa MgCl₂ 2,0 mM
- Carril 10- mezcla de marca peptídica-polimerasa MgCl₂ 2,5 mM
- 5 Carril 20- marca peptídica-polimerasa (MgCl₂ 1,5 mM) DNA genómico de ratón, 1 ng/μl en 1x PCR.
- Carril 21- marca peptídica-polimerasa (MgCl₂ 1,5 mM) ADN plasmídico.

10 Aunque se han mostrado y descrito en este documento realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los especialistas en la técnica que dichas realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solamente. Ahora se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios, y sustituciones a los especialistas en la técnica sin alejarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descrita en este documento al ponerse en práctica la invención.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Solis BioDyne Kahre, olev Artma, Kadri Kahre, Tiina
- <120> Composiciones para aumentar la estabilidad y actividad de polipéptidos, y métodos relacionados
- 20 <130> SMK/FP6734677
- <140> A asignar
- <141> 19-11-2010
- 25 <150> 61/390.857
- <151> 07-10-2010
- <150> 61/356.541
- <151> 18-06-2010
- 30 <150> 61/350.457
- <151> 01-06-2010
- <150> 61/262.919
- 35 <151> 19-11-2009
- <160> 23
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 42
- <212> PRT
- <213> Polipéptido sintético
- 45 <400> 1

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Thr Met Val Asp Asp Leu
1 5 10 15

Gln Arg Pro His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp
20 25 30

Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser Gly Trp
35 40

- 50 <210> 2
- <211> 870
- <212> PRT
- <213> Polipéptido sintético
- 55 <400> 2

ES 2 533 536 T3

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Thr Met Val Asp Asp Leu
1 5 10 15

Gln Arg Pro His His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp
20 25 30

Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser Gly Trp Leu Pro Leu Phe Glu Pro
35 40 45

ES 2 533 536 T3

Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr
 50 55 60
 Phe His Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp
 85 90 95
 Gly Asp Ala Val Ile Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg
 100 105 110
 His Glu Ala Tyr Gly Gly Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu
 115 120 125
 Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu
 130 135 140
 Gly Leu Ala Arg Leu Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu
 145 150 155 160
 Ala Ser Leu Ala Lys Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile
 165 170 175
 Leu Thr Ala Asp Lys Asp Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His
 180 185 190
 Val Leu His Pro Glu Gly Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu
 195 200 205
 Lys Tyr Gly Leu Arg Pro Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr
 210 215 220
 Gly Asp Glu Ser Asp Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys
 225 230 235 240
 Thr Ala Arg Lys Leu Leu Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu
 245 250 255
 Lys Asn Leu Asp Arg Leu Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala
 260 265 270
 His Met Asp Asp Leu Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr
 275 280 285
 Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg
 290 295 300
 Glu Arg Leu Arg Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu
 305 310 315 320

His Glu Phe Gly Leu Leu Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro
 325 330 335
 Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys
 340 345 350
 Glu Pro Met Trp Ala Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly
 355 360 365
 Arg Val His Arg Ala Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys
 370 375 380
 Glu Ala Arg Gly Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg
 385 390 395 400
 Glu Gly Leu Gly Leu Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr
 405 410 415
 Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr
 420 425 430
 Gly Gly Glu Trp Thr Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu
 435 440 445
 Arg Leu Phe Ala Asn Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu
 450 455 460
 Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala
 465 470 475 480
 His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala
 485 490 495
 Leu Ser Leu Glu Val Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val
 500 505 510
 Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu
 515 520 525
 Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr
 530 535 540
 Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu
 545 550 555 560
 Arg Glu Ala His Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu
 565 570 575
 Thr Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His
 580 585 590

Pro Arg Thr Gly Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala
 595 600 605

Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val
 610 615 620

Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu
 625 630 635 640

Gly Trp Leu Leu Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val
 645 650 655

Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu
 660 665 670

Gly Arg Asp Ile His Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro
 675 680 685

Arg Glu Ala Val Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn
 690 695 700

Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu
 705 710 715 720

Ala Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln
 725 730 735

Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly
 740 745 750

Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val
 755 760 765

Pro Asp Leu Glu Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg
 770 775 780

Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys
 785 790 795 800

Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg
 805 810 815

Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu
 820 825 830

Arg Ala Glu Ala Val Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val
 835 840 845

Tyr Pro Leu Ala Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp
 850 855 860

ES 2 533 536 T3

Trp Leu Ser Ala Lys Glu
865 870

5 <210> 3
 <211> 141
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético
 <400> 3

acacaggaaa cagc gatgat cgacctgcag cggccatccg ccgccaccat ggtcgcacgac 60
 ctgcagcggc cgcaccatca ccatcaccat ccatgggatt acaaggacga cgatgacaag 120
 ccgcggtgga attcgggggtg g 141

15 <210> 4
 <211> 2637
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético
 <400> 4

acacaggaaa cagc gatgat cgacctgcag cggccatccg ccgccaccat ggtcgcacgac 60
 ctgcagcggc cgcaccatca ccatcaccat ccatgggatt acaaggacga cgatgacaag 120
 ccgcggtgga attcgggggtg gctgccccctc tttgagccca agggccgggt cctcctgggtg 180
 gacggccacc acctggccta ccgcaccttc cacgccctga agggcctcac caccagccgg 240
 ggggagccgg tgcaggcgggt ctacggcttc gccaaagagcc tcctcaaggc cctcaaggag 300
 gacggggacg cggatgatcgt ggtctttgac gccaaaggccc cctccttccg ccacgaggcc 360
 tacgggggggt acaaggcggg ccgggcccc acgccggagg actttccccg gcaactcgcc 420
 ctcatcaagg agctggtgga cctcctgggg ctggcgcgcc tcgaggctcc gggctacgag 480
 gcggacgacg tcctggccag cctggccaag aaggcggaaa aggagggcta cgaggctccg 540
 atcctcaccg ccgacaaaga cctttaccag ctcccttccg accgcatcca cgtcctccac 600
 cccgaggggt acctcatcac cccggcctgg ctttgggaaa agtacggcct gaggcccgcac 660
 cagtgggccg actaccgggc cctgaccggg gacgagtccg acaaccttc cggggtcaag 720
 ggcacgcggg agaagacggc gaggaagctt ctggaggagt gggggagcct ggaagccctc 780
 ctcaagaacc tggaccggct gaagcccgcc atccgggaga agatcctggc ccacatggac 840
 gatctgaagc tctcctggga cctggccaag gtgctgcaccg acctgcccct ggagggtggac 900
 ttgcgcaaaa ggcgggagcc cgaccgggag aggcttaggg cctttctgga gaggcttgag 960
 tttggcagcc tcctccacga gttcggcctt ctggaaagcc ccaaggccct ggaggaggcc 1020
 ccctggcccc cgccggaagg ggccttcgtg ggctttgtgc tttcccgcaa ggagcccacg 1080
 tgggccgatc ttctggccct ggccgccgcc agggggggcc gggccaccg ggcccccgag 1140
 ccttataaag ccctcagggc cctgaaggag gcgcgggggc ttctcgcaa agacctgagc 1200
 gttctggccc tgagggaagg ccttggcctc ccgcccggcg acgaccccat gctcctcgcc 1260
 tacctcctgg acccttccaa caccacccc gaggggggtg cccggcgcta cggcggggag 1320

ES 2 533 536 T3

tggacggagg aggc9999ga gc999ccgcc ctttccgaga ggctcttcgc caacctgtgg 1380
 gggaggcttg agggggagga gaggctcctt tggctttacc gggagggtga gaggcccctt 1440
 tccgctgtcc tggcccacat ggaggccacg ggggtgcgcc tggacgtggc ctatctcagg 1500
 gccttgtccc tggagggtggc cgaggagatc gcccgcctcg aggccgaggt cttccgcctg 1560
 gccggccacc ccttcaacct caactcccgg gaccagctgg aaagggtcct ctttgacgag 1620
 ctagggttc cgcctatcgg caagacggag aagaccggca agcgcctccac cagcgcgcc 1680
 gtctctggagg ccttccgca ggcccacccc atcgtggaga agatcctgca gtaccgggag 1740
 ctcaccaagc tgaagagcac ctacattgac cccttgccgg acctcatcca ccccaggacg 1800
 ggccgcctcc acaccgctt caaccagacg gccacggcca cgggcaggct aagtagctcc 1860
 gatccaacc tccagaacat ccccgctccg accccgcttg ggcagaggat ccgccgggcc 1920
 ttcctcgcgg aggggggggtg gctattgggtg gccctggact atagccagat agagctcagg 1980
 gtgctggccc acctctccgg cgacgagaac ctgatccggg tcttccagga ggggcgggac 2040
 atccacacgg agaccgccag ctggatgttc ggcgtcccc gggaggccgt ggaccccctg 2100
 atgcgccggg cggccaagac catcaacttc ggggtcctct acggcatgtc ggcccaccgc 2160
 ctctcccagg agctagccat cccttacgag gaggcccagg ccttcattga gcgctacttt 2220
 cagagcttcc ccaagggtgcg ggcctggatt gagaagacc tggaggaggg caggaggcgg 2280
 gggtagctgg agaccctctt cggccgccgc cgctacgtgc cagacctaga ggcccgggtg 2340
 aagagcgtgc gggaggcggc cgagcgcctg gccttaaca tgcccgtcca gggcaccgcc 2400
 gccgacctca tgaagctggc tatggtgaag ctcttcccc ggctggagga aatgggggcc 2460
 aggatgtctc ttcagggtcca cgacgagctg gtctctgagg ccccaaaaga gaggggcggag 2520
 gccgtggccc ggctggccaa ggaggctatg gagggggtgt atcccctggc cgtgcccctg 2580
 gaggtggagg tggggatagg ggaggactgg ctctccgcca aggagtgata gatctga 2637

<210> 5
 <211> 2829
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético

5

<400> 5

acacaggaaa cagcgtatgat cgacctgcag cggccgcagg ccgccaccat ggactctaga 60
 caccatcacc atcaccaccc atgggattac aaggacgacg atgacaagcc gcggtggaat 120
 tcgagcgcaa ccgtaaagtt caagtacaaa ggcgaagaaa aagaggtaga catctccaag 180
 atcaagaaa tatggcgtgt gggcaagatg atctccttca cctacgacga gggcgggtggc 240
 aagaccggcc gcggtgcggt aagcgaaaag gacgcgccga aggagctgct gcagatgctg 300
 gagaagcaga aaaagattaa gaattcgggt aacctgcccc tctttgagcc caagggccgg 360
 gtctctctgg tggacggcca ccacctggcc taccgcacct tccacgccct gaagggcctc 420
 accaccagcc ggggggagcc ggtgcaggcg gtctacggct tcgccaagag cctcctcaag 480
 gccctcaagg aggacgggga cgcggtgatc gtggtctttg acgccaaggc cccctccttc 540

10

ES 2 533 536 T3

cgccacgagg cctacggggg gtacaaggcg ggccgggccc ccacaccgga ggactttccc 600
 cggcaactcg cccatcaaa ggagctggtg gacctcctgg ggctggcgcg cctcgaggtc 660
 ccgggctacg aggcggacga cgtcctggcc agcctggcca agaaggcggg aaaggagggc 720
 tacgaggtcc gcacccctac cgcggacaaa gacctttacc agctccttcc cgaccgcatc 780
 cacgtcctcc accccgaggg gtacctcatc accccggcct ggctttggga aaagtacggc 840
 ctgaggcccc accagtgggc cgactaccgg gccctgaccg gggacgagtc cgacaacctt 900
 cccggggtca agggcatcgg ggagaagacg gcgaggaagc ttctggagga gtgggggagc 960
 ctggaagccc tcctcaagaa cctggaccgg ctgaagcccc ccatccggga gaagatcctg 1020
 gccacatgg acgatctgaa gctcctctgg gacctggcca aggtgcgcac cgacctgccc 1080
 ctggaggtgg acttcgcaa aaggcgggag cccgaccggg agaggcttag ggcctttctg 1140
 gagaggtctg agtttgagc cctcctccac gagttcggcc ttctggaaag ccccaaggcc 1200
 ctggaggagg cccctggcc cccgcccggg ggggcccctg tgggctttgt gctttcccgc 1260
 aaggagccca tgtgggccga tcttctggcc ctggcccggc ccaggggggg ccgggtccac 1320
 cgggcccccg agccttataa agcctcagg gacctgaagg aggcgcgggg gcttctcggc 1380
 aaagacctga gcgttctggc cctgagggaa ggccttggcc tcccggccgg cgacgacccc 1440
 atgctcctcg cctacctct ggacccttcc aacaccacc ccgagggggg ggcccggcgc 1500
 tacggcgggg agtggacgga ggaggcgggg gagcgggccc ccctttccga gaggtcttcc 1560
 gccaacctgt gggggaggct tgagggggag gagaggctcc tttggcttta ccgggaggtg 1620
 gagaggcccc tttccgctgt cctggcccac atggaggcca cgggggtgcg cctggacgtg 1680
 gcctatctca gggccttgtc cctggaggtg gccgaggaga tcgcccgcct cgaggccgag 1740
 gtcttccgcc tggccggcca ccccttcaac ctcaactccc gggaccagct ggaaagggtc 1800
 ctctttgacg agctagggct tcccgccatc ggcaagacgg agaagaccgg caagcgtccc 1860
 accagcggc cgcctctgga ggccctccgc gaggcccacc ccatcgtgga gaagatcctg 1920
 cagtaccggg agctcaccaa gctgaagagc acctacattg accccttggc ggacctcatc 1980
 caccagga cgggcccct ccacaccgc ttcaaccaga cggccacggc cacgggcagg 2040
 ctaagtagct ccgatcccaa cctccagaac atccccgtcc gcaccccgtc tgggcagagg 2100
 atccgcccgg ccttcatcgc cgaggagggg tggctattgg tggccctgga ctatagccag 2160
 atagagctca gggtgctggc ccacctctcc ggcgacgaga acctgatccg ggtcttccag 2220
 gaggggcggg acatccacac ggagaccgcc agctggatgt tcggcgtccc ccgggagggc 2280
 gtggaccccc tgatgcccgc ggcggccaag accatcaact tcggggtcct ctacggcatg 2340
 tcggcccacc gcctctccca ggagctagcc atcccttacg aggaggcca ggccttcatt 2400
 gagcgtact ttcagagctt cccaagggtg cgggcccggg ttgagaagac cctggaggag 2460
 ggcaggaggc gggggtacgt ggagaccctc ttcggcccgc gccgtacgt gccagaccta 2520
 gagggcccgg tgaagagcgt gcgggagggc gccgagcgca tggccttcaa catgcccgtc 2580

ES 2 533 536 T3

cagggcaccg ccgccgacct catgaagctg gctatgggta agctcttccc caggctggag 2640
 gaaatggggg ccaggatgct ccttcaggtc cacgacgagc tggtcctcga ggccccaaaa 2700
 gagagggcgg aggccgtggc ccggctggcc aaggagggtca tggagggggt gtatcccctg 2760
 gccgtgcccc tggaggtgga ggtggggata ggggaggact ggctctccgc caaggagtga 2820
 tagatctga 2829

<210> 6
 <211> 935
 <212> PRT
 <213> Polipéptido sintético

5

<400> 6

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

10

ES 2 533 536 T3

195						200						205	--		
Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Val	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu
210						215					220				
Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile
225					230					235					240
Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Arg	Ile	His
				245					250					255	
Val	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ile	Thr	Pro	Ala	Trp	Leu	Trp	Glu
			260					265					270		
Lys	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Asp	Gln	Trp	Ala	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr
		275					280					285			
Gly	Asp	Glu	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys
	290					295					300				
Thr	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu
305					310					315					320
Lys	Asn	Leu	Asp	Arg	Leu	Lys	Pro	Ala	Ile	Arg	Glu	Lys	Ile	Leu	Ala
				325					330					335	
His	Met	Asp	Asp	Leu	Lys	Leu	Ser	Trp	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Arg	Thr
			340					345					350		
Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg
		355					360					365			
Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu
	370					375					380				
His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Glu	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro
385					390					395					400
Trp	Pro	Pro	Pro	Glu	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg	Lys
				405					410					415	
Glu	Pro	Met	Trp	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly
			420					425					430		
Arg	Val	His	Arg	Ala	Pro	Glu	Pro	Tyr	Lys	Ala	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys
		435					440					445			
Glu	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Leu	Arg
	450					455					460				
Glu	Gly	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr

ES 2 533 536 T3

465					470						475				480
Leu	Leu	Asp	Pro	Ser 485	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu 490	Gly	Val	Ala	Arg	Arg 495	Tyr
Gly	Gly	Glu	Trp 500	Thr	Glu	Glu	Ala	Gly 505	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu 510	Ser	Glu
Arg	Leu	Phe 515	Ala	Asn	Leu	Trp	Gly 520	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu 525	Glu	Arg	Leu
Leu	Trp 530	Leu	Tyr	Arg	Glu	Val 535	Glu	Arg	Pro	Leu	Ser 540	Ala	Val	Leu	Ala
His 545	Met	Glu	Ala	Thr	Gly 550	Val	Arg	Leu	Asp	Val 555	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala 560
Leu	Ser	Leu	Glu	Val 565	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala 570	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu 575	Val
Phe	Arg	Leu	Ala 580	Gly	His	Pro	Phe	Asn 585	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp 590	Gln	Leu
Glu	Arg	Val 595	Leu	Phe	Asp	Glu	Leu 600	Gly	Leu	Pro	Ala	Ile 605	Gly	Lys	Thr
Glu 610	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser 615	Thr	Ser	Ala	Ala	Val 620	Leu	Glu	Ala	Leu
Arg 625	Glu	Ala	His	Pro	Ile 630	Val	Glu	Lys	Ile	Leu 635	Gln	Tyr	Arg	Glu	Leu 640
Thr	Lys	Leu	Lys	Ser 645	Thr	Tyr	Ile	Asp	Pro 650	Leu	Pro	Asp	Leu	Ile 655	His
Pro	Arg	Thr	Gly 660	Arg	Leu	His	Thr	Arg 665	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala 670	Thr	Ala
Thr	Gly	Arg 675	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp 680	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn 685	Ile	Pro	Val
Arg 690	Thr	Pro	Leu	Gly	Gln	Arg 695	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe 700	Ile	Ala	Glu	Glu
Gly 705	Trp	Leu	Leu	Val	Ala 710	Leu	Asp	Tyr	Ser	Gln 715	Ile	Glu	Leu	Arg	Val 720
Leu	Ala	His	Leu	Ser 725	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu 730	Ile	Arg	Val	Phe	Gln 735	Glu
Gly	Arg	Asp	Ile	His	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Trp	Met	Phe	Gly	Val	Pro

	740		745		750											
Arg	Glu	Ala	Val	Asp	Pro	Leu	Met	Arg	Arg	Ala	Ala	Lys	Thr	Ile	Asn	
		755					760					765				
Phe	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Met	Ser	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	
	770					775					780					
Ala	Ile	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Gln	Ala	Phe	Ile	Glu	Arg	Tyr	Phe	Gln	
	785				790					795					800	
Ser	Phe	Pro	Lys	Val	Arg	Ala	Trp	Ile	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	
				805					810					815		
Arg	Arg	Arg	Gly	Tyr	Val	Glu	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Val	
			820					825						830		
Pro	Asp	Leu	Glu	Ala	Arg	Val	Lys	Ser	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	
		835					840					845				
Met	Ala	Phe	Asn	Met	Pro	Val	Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Leu	Met	Lys	
	850					855					860					
Leu	Ala	Met	Val	Lys	Leu	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu	Glu	Met	Gly	Ala	Arg	
	865				870					875					880	
Met	Leu	Leu	Gln	Val	His	Asp	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Ala	Pro	Lys	Glu	
				885					890					895		
Arg	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ala	Lys	Glu	Val	Met	Glu	Gly	Val	
			900					905					910			
Tyr	Pro	Leu	Ala	Val	Pro	Leu	Glu	Val	Glu	Val	Gly	Ile	Gly	Glu	Asp	
		915					920					925				
Trp	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Ile										
	930					935										

5
 <210> 7
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético
 <400> 7

ES 2 533 536 T3

```

atgatcgacc tgcagcggcc gcaggccgcc accatggact ctagacacca tcaccatcac      60
cacccatggg attacaagga cgacgatgac aagcccgggg ggaattcgag cgcaaccgta      120
aagttcaagt acaaaggcga agaaaaagag gtagacatct ccaagatcaa gaaagtatgg      180
cgtgtgggca agatgatctc cttcacctac gacgagggcg gtggcaagac cggcccgggg      240
gcggtaaagc aaaaggacgc gccgaaggag ctgctgcaga tgctggagaa gcagaaaaag      300
attaagaatt cgggtaacct gcccc                                           325

```

5 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético
 <400> 8

```

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Gln Ala Ala Thr Met Asp Ser Arg His
1           5           10
His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Pro
20          25          30
Arg Trp Asn Ser Ser Ala Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu
35          40          45
Lys Glu Val Asp Ile Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys
50          55          60
Met Ile Ser Phe Thr Tyr Asp Glu Gly Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly
65          70          75          80
Ala Val Ser Glu Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu
85          90          95
Lys Gln Lys Lys Ile Lys Asn Ser Gly Asn
100         105

```

10 <210> 9
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético
 15 <400> 9

```

agcgcgaaccg taaagttcaa gtacaaaggc gaagaaaaag aggtagacat ctccaagatc      60
aagaaagtat ggcgtgtggg caagatgatc tccttcacct acgacgaggg cggtggcaag      120
accggccgcg gtgctgtaag cgaaaaggac gcgccgaagg agctgctgca gatgctggag      180
aagcagaaaa agattaagaa ttcg                                           204

```

20 <210> 10
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Polipéptido sintético
 25 <400> 10

ES 2 533 536 T3

Ser Ala Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp
1 5 10 15

Ile Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe
20 25 30

Thr Tyr Asp Glu Gly Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu

35

40

45

Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Gln Lys Lys
50 55 60

Ile Lys Asn Ser
65

5

<210> 11
<211> 876
<212> PRT
<213> Polipéptido sintético

<400> 11

ES 2 533 536 T3

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Gln Ala Ala Thr Met Asp Ser Arg His
1 5 10 15

His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Pro
20 25 30

Arg Trp Asn Ser Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys
35 40 45

Pro Val Ile Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Asp
50 55 60

Tyr Asp Arg Asn Phe Glu Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp
65 70 75 80

Ser Ala Ile Glu Asp Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr
85 90 95

Thr Val Arg Val Val Arg Ala Glu Lys Val Lys Lys Lys Phe Leu Gly
100 105 110

Arg Pro Ile Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val
115 120 125

Pro Ala Ile Arg Asp Lys Ile Lys Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile
130 135 140

Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly
145 150 155 160

Leu Ile Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp
165 170 175

Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile
180 185 190

Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp
195 200 205

Lys Asn Ile Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu
 210 215 220
 Met Ile Lys Arg Phe Leu Lys Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val
 225 230 235 240
 Leu Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys
 245 250 255
 Arg Ser Glu Lys Leu Gly Val Lys Phe Ile Leu Gly Arg Glu Gly Ser
 260 265 270
 Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys
 275 280 285
 Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn
 290 295 300
 Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Gln
 305 310 315 320
 Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Thr
 325 330 335
 Gly Glu Gly Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys
 340 345 350
 Val Thr Tyr Glu Leu Gly Lys Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu
 355 360 365
 Ser Arg Leu Val Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr
 370 375 380
 Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg
 405 410 415
 Glu Ser Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp
 420 425 430
 Glu Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile
 435 440 445
 Ile Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Glu
 450 455 460
 Glu Tyr Asp Val Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe
 465 470 475 480

Pro Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln
 485 490 495
 Lys Val Lys Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Lys Lys
 500 505 510
 Leu Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe
 515 520 525
 Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys
 530 535 540
 Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Gln Tyr Ile Glu Thr Thr Ile
 545 550 555 560
 Arg Glu Ile Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr
 565 570 575
 Asp Gly Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys
 580 585 590
 Lys Lys Ala Lys Glu Phe Leu Asp Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly
 595 600 605
 Leu Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val
 610 615 620
 Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Asp Lys Ile Thr Thr
 625 630 635 640
 Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu
 645 650 655
 Thr Gln Ala Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu
 660 665 670
 Glu Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr
 675 680 685
 Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Asp
 690 695 700
 Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg
 705 710 715 720
 Leu Ala Ala Arg Gly Ile Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr
 725 730 735
 Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe
 740 745 750

Asp Glu Phe Asp Pro Ala Lys His Lys Tyr Asn Ala Glu Tyr Tyr Ile
 755 760 765

Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly
 770 775 780

Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu
 785 790 795 800

Gly Ala Trp Leu Lys Pro Lys Thr Ser Trp Ile Cys Ala Thr Val Lys
 805 810 815

Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp Ile Ser Lys Ile Lys
 820 825 830

Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe Thr Tyr Asp Glu Gly
 835 840 845

Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu Lys Asp Ala Pro Lys
 850 855 860

Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Gln Lys Lys Ile
 865 870 875

<210> 12
 <211> 2634
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético

<400> 12

5

```

atgatcgacc tgcagcggcc gcaggccgcc accatggact ctagacacca tcaccatcac      60
cacccatggg attacaagga cgacgatgac aagccgcggt ggaattccat cctcgataca      120
gactacataa ctgaggatgg aaagcccgtc atcaggatct tcaagaagga gaacggcgag      180
ttcaaaatag actacgacag aaactttgag ccatacatct acgcgctctt gaaggacgac      240
tctgcgattg aggacgtcaa gaagataact gccgagaggc acggcactac cgttagggtt      300
gtcagggccg agaaagtgaa gaagaagttc ctaggcaggc cgatagaggt ctggaagctc      360
tacttcactc acccccagga cgttcccgca atcagggaca agataaagga gcatcctgcc      420
gttgtggaca tctacgagta cgacatcccc ttcgcaagc gctacctcat agacaaggc      480
ttaatcccga tggagggcga cgaggaactt aagatgctcg cttcgacat cgagacgctc      540
tatcacgagg gcgaggagtt cgccgaaggg cctatcctga tgataagcta cgccgacgag      600
gaagggggcg gcggtattac ctggaagaat atcgacctc cctatgtcga cgtcgtttcc      660
accgagaagg agatgataaa gcgcttcctc aaggctcgtca aggaaaagga tcccgacgct      720
ctcataacct acaacggcga caacttcgac ttcgcctacc tcaagaagcg ctccgagaag      780
ctcggagtca agttcatcct cggaagggaa gggagcgagc cgaaaatcca gcgcatgggc      840
    
```

10

ES 2 533 536 T3

gatcgctttg cggtaggagt caaggggaagg attcacttcg acctctaccc cgtcattagg 900
agaacgatta acctccccac ttacaccett gaggcagtat atgaagccat ctttgacag 960
ccgaaggaga aggtctacgc tgaggagata gcgcaggcct gggaaacggg cgagggatta 1020
gaaagggtag cccgctactc gatggaggac gcaaaggtaa cctatgaact cggaaaagag 1080
ttcttcctta tggaagccca gctctcgcgc ctctgtaggc agagcctctg ggatgtatct 1140
cgctcgagta ccggaacact cgctcagtagg tttttgctga ggaaggccta cgagaggaat 1200
gaacttgac caacaagcc ggacgagagg gagctggcaa gaagaagga gagctacgcg 1260
ggtggatacg tcaaggagcc cgaaagggga ctgtgggaga acatcgtgta tctggacttc 1320
cgctccctgt atccttcgat aataatcacc cataacgtct cccctgatac actcaacagg 1380
gagggttgtg aggagtacga cgtggctcct caggtaggcc ataagttctg caaggacttc 1440
cccggcttca tcccaagcct cctcggggac ctcttgagg agagacagaa ggtaaagaag 1500
aagatgaagg ccactataga cccaatcgag aagaaactcc tcgattacag gcagcgagca 1560
atcaaaatcc ttgctaatag cttctacggt tactacggct atgcaaaggc ccgctggtac 1620
tgcaaggagt gcgccgagag cgttaccgct tggggcaggc agtacatcga gaccacgata 1680
agggaaatag aggagaaatt tggctttaa gtcctctacg cggacacaga tggatttttc 1740
gcaacaatac ctggagcggg cggcgaacc gtcaaaaaga aggcaaagga gttcctggac 1800
tacatcaacg ccaaactgcc cggcctgctc gaactcgaat acgagggctt ctacaagcgc 1860
ggcttcttcg tgacgaagaa gaagtacgcg gttatagacg aggaggacaa gataacgacg 1920
cgcgggcttg aatagttag gcgtgactgg agcgagatag cgaaggagac gcaggcgagg 1980
gttcttgagg cgatactaaa gcacggtgac gttgaagaag cggtaaggat tgtcaagag 2040
gttacggaga agctgagcaa gtacgaggtt ccaccggaga agctggtcat ctacgagcag 2100
ataaccgcg acctgaagga ctacaaggcc accgggccc atgtggctgt tgcaaacgc 2160
ctcggcga gggggataaa aatccggccc ggaacggtca taagctacat cgtgctcaaa 2220
ggctcgggaa ggattgggga cagggtata cccttgacg aatttgacc ggcaaagcac 2280
aagtacaatg cagaatacta catcgagaac caggttcttc cagctgtgga gaggattctg 2340
agggcctttg gttaccgtaa agaagattta aggtatcaga aaacgcggca ggttgcttg 2400
ggggcgtggc taaaacctaa gacaagctgg atctgcgcaa ccgtaaagtt caagtacaaa 2460
ggcgaagaaa aagaggtaga catctccaag atcaagaaag tatggcgtgt gggcaagatg 2520
atctccttca cctacgacga gggcggtagc aagaccggcc gcggtgcggt aagcgaagag 2580
gacgcgccga aggagctgct gcagatgctg gagaagcaga aaaagattta gtgg 2634

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> Polipéptido sintético

<400> 13

5

ES 2 533 536 T3

Met Val Asp Asp Leu Gln Arg Pro His His His His His His Pro Trp
 1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser Gly Trp
 20 25 30

5 <210> 14
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Polipéptido sintético
 <400> 14

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Gln Ala Ala Thr Met Asp Ser Arg His
 1 5 10 15

His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Pro
 20 25 30

Arg Trp Asn Ser
 35

10 <210> 15
 <211> 108
 <212> ADN
 15 <213> Polinucleótido sintético
 <400> 15

atgatcgacc tgcagcggcc gcaggccgcc accatggact ctagacacca tcaccatcac 60
 cacccatggg attacaagga cgacgatgac aagccgcggt ggaattcc 108

20 <210> 16
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Polipéptido sintético
 25 <400> 16

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Thr Met Val Asp Asp Leu
 1 5 10 15

Gln Arg Pro His His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp
 20 25 30

Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser
 35 40

30 <210> 17
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido sintético
 35 <400> 17

atgatcgacc tgcagcggcc atccgccgcc accatggctc acgacctgca gcggccgcac 60
 catcaccatc accatccatg ggattacaag gacgacgatg acaagccgcg gtggaattcg 120

ES 2 533 536 T3

5 <210> 18
<211> 29
<212> PRT
<213> Polipéptido sintético

<400> 18

Met Val Asp Asp Leu Gln Arg Pro His His His His His His Pro Trp
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser
20 25

10 <210> 19
<211> 87
<212> ADN
<213> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

15 <400> 19

atggtcgacg acctgcagcg gccgcacat caccatcacc atccatggga ttacaaggac 60
gacgatgaca agccgcggtg gaattcg 87

20 <210> 20
<211> 207
<212> PRT
<213> Polipéptido sintético

25 <400> 20

ES 2 533 536 T3

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Thr Met Val Asp Asp Leu
1 5 10 15

Gln Arg Pro His His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp
20 25 30

Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys
35 40 45

Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu
85 90 95

Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser
100 105 110

Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro
115 120 125

Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg
130 135 140

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

Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala
165 170 175

Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly
180 185 190

Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
195 200 205

<210> 21
<211> 621
<212> ADN
<213> Polinucleótido sintético
<400> 21

5

ES 2 533 536 T3

```

atgatcgacc tgcagcggcc atccgccgcc accatggctg acgacctgca gcggccgcac      60
catcaccatc accatccatg ggattacaag gacgacgatg acaagccgcg gtggaattcg      120
ggggccccac cacgcctcat ctgtgacagc cgagtcctgg agaggtacct cttggaggcc      180
aaggaggccg agaatatcac gacgggctgt gctgaacact gcagcttгаа tgagaatatc      240
actgtcccag acaccaaagt taatttctat gcctggaaga ggatggaggt cgggcagcag      300
gccgtagaag tctggcaggg cctggccctg ctgtcggaag ctgtcctgcg gggccaggcc      360
ctgttggctca actcttccca gccgtgggag cccctgcagc tgcattgгга taaagccgtc      420
agtgcccttc gcagcctcac cactctgctt cgggctctgg gagcccagaa ggaagccatc      480
tccctccag atgcggctc agctgtcca ctccgaacaa tcactgctga cactttccgc      540
aaactcttcc gagtctactc caatttctc cggggaaagc tgaagctgta cacaggggag      600
gcctgcagga caggggacag a                                             621

```

5 <210> 22
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Polipéptido sintético
 <400> 22

```

Met Ile Asp Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Thr Met Val Asp Asp Leu
 1           5           10           15
Gln Arg Pro His His His His His His Pro Trp Asp Tyr Lys Asp Asp
          20           25           30
Asp Asp Lys Pro Arg Trp Asn Ser Lys Val Leu Ala Ala Gly Val Val
      35           40           45
Pro Leu Leu Leu Val Leu His Trp Lys His Gly Ala Gly Ser Pro Leu
 50           55           60

```

10

ES 2 533 536 T3

Pro Ile Thr Pro Val Asn Ala Thr Cys Ala Ile Arg His Pro Cys His
 65 70 75 80

Asn Asn Leu Met Asn Gln Ile Arg Ser Gln Leu Ala Gln Leu Asn Gly
 85 90 95

Ser Ala Asn Ala Leu Phe Ile Leu Tyr Tyr Thr Ala Gln Gly Glu Pro
 100 105 110

Phe Pro Asn Asn Leu Asp Lys Leu Cys Gly Pro Asn Val Thr Asp Phe
 115 120 125

Pro Pro Phe His Ala Asn Gly Thr Glu Lys Ala Lys Leu Val Glu Leu
 130 135 140

Tyr Arg Ile Val Val Tyr Leu Gly Thr Ser Leu Gly Asn Ile Thr Arg
 145 150 155 160

Asp Gln Lys Ile Leu Asn Pro Ser Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Leu
 165 170 175

Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu Arg Gly Leu Leu Ser Asn Val Leu Cys
 180 185 190

Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His Val Gly His Val Asp Val Thr Tyr Gly
 195 200 205

Pro Asp Thr Ser Gly Lys Asp Val Phe Gln Lys Lys Lys Leu Gly Cys
 210 215 220

Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys Gln Ile Ile Ala Val Leu Ala Gln Ala
 225 230 235 240

Phe

- <210> 23
- <211> 723
- <212> ADN
- <213> Polinucleótido sintético
- <400> 23

ES 2 533 536 T3

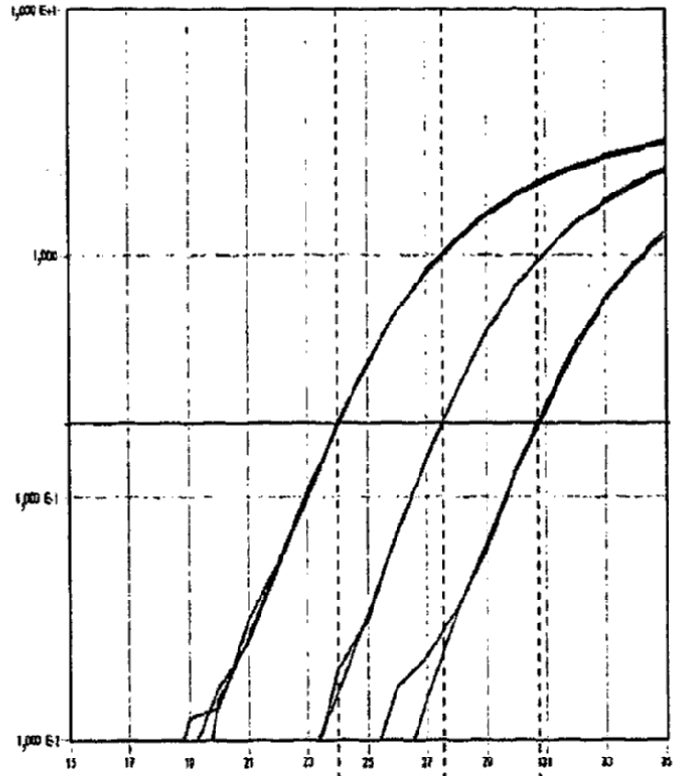
atgatcgacc	tgcagcggcc	atccgccgcc	accatggctg	acgacctgca	gcggccgcac	60
catcaccatc	accatccatg	ggattacaag	gacgacgatg	acaagccgcg	gtggaattcg	120
aaagtgctgg	cggcgggcgt	ggtgccgctg	ctgctggtgc	tgcattggaa	acatggcgcg	180
ggcagccccg	tgccgattac	cccggtgaac	gcgacctgcg	cgattcgcca	tccgtgccat	240
aacaacctga	tgaaccagat	tcgcagccag	ctggcgcagc	tgaacggcag	cgcgaacgcg	300
ctgtttattc	tgtattatac	cgcgcagggc	gaaccgtttc	cgaacaacct	ggataaactg	360
tgcggccccg	acgtgaccga	ttttccgccg	tttcatgcga	acggcaccga	aaaagcgaaa	420
ctggtggaac	tgtatcgcat	tgtggtgtat	ctgggcacca	gcctgggcaa	cattacccgc	480
gatcagaaaa	ttctgaacct	gagcgcgctg	agcctgcata	gcaaaactgaa	cgcgaccgcg	540
gatattctgc	gcggcctgct	gagcaacgtg	ctgtgccgcc	tgtgcagcaa	atatcatgtg	600
ggccatgtgg	atgtgacct	tggcccggat	accagcggca	aagatgtggt	tcagaaaaaa	660
aaactgggct	gccagctgct	gggcaaatat	aaacagatta	ttgcggtgct	ggcgcagggc	720
ttt						723

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la estabilidad de un polipéptido, que comprende unir dicho polipéptido a una marca peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEC ID N° 1.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, o SEC ID N° 18; o la marca peptídica está codificada por una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 3, SEC ID N° 15, SEC ID N° 17, o SEC ID N° 19.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica comprende al menos uno a seis restos de histidina.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica comprende un sitio de escisión por proteasa, opcionalmente en el que el sitio de escisión por proteasa comprende la secuencia de aminoácidos DDDDK.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica inhibe la degradación o la desnaturalización o la pérdida de la función proteica del polipéptido a una temperatura de entre -20 °C y 50 °C, opcionalmente en el que la función proteica del polipéptido después de exposición a dicha temperatura es al menos el 50 % de la función proteica del polipéptido antes de su exposición a dicha temperatura.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica mantiene la estabilidad del polipéptido durante al menos un día en una temperatura de entre -20 °C y 50 °C.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica se une covalentemente o no covalentemente al polipéptido.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la marca peptídica se une al extremo amino o al extremo carboxi del polipéptido.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia humana (hLIF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), insulina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), leptina o bevacizumab, opcionalmente en el que el polipéptido comprende al menos una mutación.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el polipéptido unido a la marca peptídica tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 11, SEC ID N° 20, o SEC ID N° 22; o el polipéptido unido a la marca peptídica está codificado por una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 5, SEC ID N° 7, SEC ID N° 12, SEC ID N° 21, o SEC ID N° 23.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una proteína o una enzima termoestables, opcionalmente en el que:
- (i) dicha proteína termoestable es un péptido o un polipéptido cosméticos; o
 - (ii) dicha enzima es una polimerasa, transcriptasa inversa, nucleasa, pirofosfatasa, desaminasa o proteasa, opcionalmente en el que:
- (1) la polimerasa es una ADN polimerasa I, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), o ADN polimerasa ZO5, o
 - (2) la pirofosfatasa es una pirofosfatasa de *Thermoplasma acidophilum* (TAPP), o
 - (3) la desaminasa es una dCTP desaminasa de *Pirococcus horikoshii*.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la enzima es una polimerasa útil en amplificación de ácidos nucleicos.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la polimerasa muestra una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de entre -20 °C y 50 °C.
14. El método de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente una segunda polimerasa, opcionalmente en el que dicha segunda polimerasa se une a una secuencia peptídica que es al menos un 70 % homóloga a la SEC ID N° 1, SEC ID N° 8, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, o SEC ID N° 18.
15. El método de la reivindicación 12, en el que la polimerasa muestra una actividad enzimática después de su exposición a una temperatura de entre 20 °C y 30 °C durante al menos un día, opcionalmente en el que la actividad enzimática es al menos el 50 % de la actividad enzimática de la polimerasa antes de su exposición a dicha temperatura durante al menos un día.

FIGURA 1

Polimerasa almacenada a
-20 °C



Polimerasa
almacenada a +35 °C
durante 4 semanas

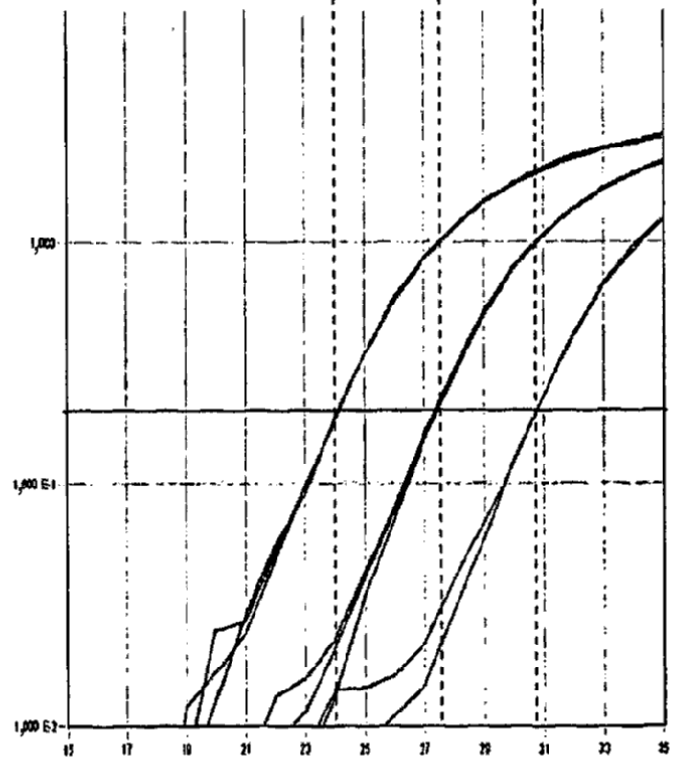


FIGURA 2
Secuencia de aminoácidos de péptido
(SEC ID N° 1)

MIDLQRPSAA TMVDDLQRPH HHHHPWDYK DDDKPRWNS GW

FIGURA 3
Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión péptido-Taq
(SEC ID N°: 2)

```

1  MIDLQRPSAA  TMVDDLQRPH  HHHHPWDYK  DDDDKPRWNS  GWLPLFEPKG  RVLLVDGHHL
61  AYRTFHALKG  LTTSRGEPVQ  AVYGFAKSLL  KALKEDGDAV  IVVFDAKAPS  FRHEAYGGYK
121  AGRAPTPEDF  PRQLALIKEL  VDLLGLARLE  VPGYEADDVL  ASLAKKAEKE  GYEVRILTAD
181  KDLYQLLSDR  IHVLHPEGYL  ITPAWLWEKY  GLRPDQWADY  RALTGDESDN  LPGVKGIGEK
241  TARKLLEEWG  SLEALLKNLD  RLKPAIREKI  LAHMDDLKLS  WDLAKVRTDL  PLEVDFAKRR
301  EPDRERLRAF  LERLEFGSLL  HEFGLLESPK  ALEEAPWPPP  EGAFVGFVLS  RKEPMWADLL
361  ALAAARGGRV  HRAPEPYKAL  RDLKEARGLL  AKDLSVLALR  EGLGLPPGDD  PMLLAYLLDP
421  SNTTPEGVAR  RYGGEWTEEA  GERAALSERL  FANLWGRLEG  EERLLWLYRE  VERPLSAVLA
481  HMEATGVRLD  VAYLRALSLE  VAEEIARLEA  EVFRLAGHPF  NLNSRDQLER  VLFDELGLPA
541  IGKTEKTGKR  STSAAVLEAL  REAHPIVEKI  LQYRELTKLK  STYIDPLPDL  IHPRTGRLHT
601  RFNQTATATG  RLSSSDPNLQ  NIPVRTPLGQ  RIRRAFIAEE  GWLLVALDYS  QIELRVLAHL
661  SGDENLIRVF  QEGRDIHTET  ASWMFGVPRE  AVDPLMRRAA  KTINFGVLYG  MSAHRLSQEL
721  AIPYEEAQAF  IERYFQSFPK  VRAWIEKTLE  EGRRRGYVET  LFGRRRYVPD  LEARVKSVRE
781  AAERMAFNMP  VQGTADLMK  LAMVKLFPRL  EEMGARMLLQ  VHDELVLEAP  KERAEAVARL
841  AKEVMEGVYP  LAVPLEVEVG  IGEDWLSAKE

```


FIGURA 4
Secuencia de nucleótidos de péptido
(SEC ID N°: 3)

1 acacaggaaa cagcgatgat cgacctgcag cggccatccg ccgccaccat ggtcgacgac
61 ctgcagcggc cgcaccatca ccatcaccat ccatgggatt acaaggacga cgatgacaag
121 ccgcggtgga attcggggtg g

FIGURA 5
Secuencia de nucleótidos de proteína de fusión péptido-Taq
(SEC ID N°: 4)

1 acacaggaaa cagcgatgat cgacctgcag cggccatccg ccgccaccat ggtcgaagac
 61 ctgcagcggc cgcaccatca ccatcaccat ccatgggatt acaaggacga cgatgacaag
 121 ccgcgggtga attcgggggtg gctgcccctc tttagagccca agggccgggt cctcctgggtg
 181 gacggccacc acctggccta ccgcacctc cacgcctga agggcctcac caccagccgg
 241 ggggagccgg tgcaggcggg ctacggcttc gccaaagacc tctcaaggc tctcaaggag
 301 gacggggacg cggatgatcgt ggtccttgac gccaaaggcc cctcctccg ccacgaggcc
 361 tacgggggggt acaaggcggg ccggggcccc acgccggagg actttcccg gcaactcgcc
 421 ctcatcaagg agctggtgga cctcctgggg ctggcgccc tcgaggctcc gggctacgag
 481 gcggacgacg tcctggccag cctggccaag aaggcggaaa aggagggcta cgaggctcgc
 541 atcctcaccg ccgacaaaga cctttaccag ctcccttccg accgcatcca cgtcctccac
 601 cccgaggggt acctcatcac cccggcctgg ctttgggaaa agtacggcct gaggcccgac
 661 cagtgggccc actaccggg cctgaccggg gacgagtccg acaaccttc cggggctcaag
 721 ggcatcgggg agaagacggc gaggaagctt ctggaggagt gggggagcct ggaagccctc
 781 ctcaagaacc tggaccggct gaagcccgc atccgggaga agatcctggc ccacatggac
 841 gatctgaagc tctcctggga cctggccaag gtgcgaccg acctgccctt ggaggtggac
 901 ttcgccaaaa ggccggagcc cgaccgggag aggcttaggg cctttctgga gaggcttgag
 961 tttggcagcc tctccaaga gttcggcctt ctggaaagcc ccaaggccct ggaggaggcc
 1021 ccctggcccc cgccggaagg ggctctcgtg ggctttgtgc ttcccgcga ggagcccatg
 1081 tgggcccgat ttctggccct ggccgcccag agggggggcc gggctccacc ggcccccgag
 1141 ccttataaa cctcagggg cctgaaggag gcgcgggggc ttctgccea agactcgagc
 1201 gttctgccc tgagggaagg ccttggcctc ccgcccggcg acgacccat gtcctcgcc
 1261 tacctcctgg acccttccaa caccaccccc gaggggggtg cccggegcta cggcggggag
 1321 tggacggagg agggggggga gcgggcccct ctttccgaga ggctcttcgc caacctgtgg
 1381 gggaggcttg agggggaggga gaggctcctt tggtttacc gggagggtgga gaggccctt
 1441 tccgctgtcc tggcccacat ggaggccacg ggggtgcgcc tggacgtggc ctatctcagg
 1501 gccttgtccc tggagggtggc cgaggagatc gcccgctcag aggccgaggt cttccgctg
 1561 gccggccacc ccttcaacct caactcccgg gaccagctgg aaagggtcct ctttgacgag
 1621 ctagggtctc ccgccatcgg caagacggag aagaccggca agcgtccac cagcgcgcc
 1681 gtcttgagg cctccgcga ggcccacccc atcgtggaga agatcctgca gtaccgggag
 1741 ctaccaagc tgaagagcac ctacattgac cccttgccg acctcatcca ccccaggacg
 1801 ggccgctcc acaccgctt caaccagacg gccacggcca cgggagggct aagtagctcc
 1861 gatcccaacc tccagaacat ccccgctccg acccgcttg ggcagaggat ccgcccggcc
 1921 ttcctcggcc aggaggggtg gctattggtg gcctggact atagccagat agagctcagg
 1981 gtgctggccc acctctccg cgacgagaac ctgatccgg tcttccagga gggcggggac
 2041 atccacacgg agaccgccag ctggatgttc ggctccccc gggaggccgt ggacccctg
 2101 atgcgcccgg cggccaagac catcaacttc ggggtcctct acggcatgtc ggccaccgc
 2161 ctctcccagg agctagccat cccttacgag gaggcccagg ccttcattga gcgctaactt
 2221 cagagcttcc ccaaggtgcg ggctggatt gagaagacc tggaggaggg caggaggcgg
 2281 gggtagctgg agacctctt cggccgccc cgctacgtgc cagacctaga ggcccgggtg
 2341 aagagcgtgc gggaggcggc cgagcgcag gccttcaaca tgcccgtcca gggcaccgcc
 2401 gccgacctca tgaagctggc tatggtgaag ctcttccca ggctggagga aatggggggc
 2461 aggatgctcc ttcagggtcca cgacgagctg gtcctcgagg ccccaaaaga gaggggcggg
 2521 gccgtggccc ggctggccaa ggaggtcatg gagggggtgt atcccctggc cgtgcccctg
 2581 gagggtggagg tggggatagg ggaggactgg ctctccgcca aggagtgata gatctga

FIGURA 6
Secuencia de nucleótidos de proteína de fusión péptido-DSP-Taq
(SEC ID N°: 5)

```

1 ACACAGGAAA CAGCGATGAT CGACCTGCAG CGGCCGCAGG CCGCCACCAT GGACTCTAGA
61 CACCATCACC ATCACCACCC ATGGGATTAC AAGGACGACG ATGACAAGCC GCGGTGGAAT
121 TCGAGCGCAA CCGTAAAGTT CAAGTACAAA GGCGAAGAAA AAGAGGTAGA CATCTCCAAG
181 ATCAAGAAAG TATGGCGTGT GGGCAAGATG ATCTCCTTCA CCTACGACGA GGGCGGTGGC
241 AAGACCGGCC GCGGTGCGGT AAGCGAAAAG GACGCGCCGA AGGAGCTGCT GCAGATGCTG
301 GAGAAGCAGA AAAAGATTAA GAATTCGGGT AACCTGCCCC TCTTTGAGCC CAAGGGCCGG
361 GTCCTCCTGG TGGACGGCCA CCACCTGGCC TACCGCACCT TCCACGCCCT GAAGGGCCTC
421 ACCACCAGCC GGGGGGAGCC GGTGCAGGCG GTCTACGGCT TCGCCAAGAG CCTCCTCAAG
481 GCCCTCAAGG AGGACGGGGA CGCGGTGATC GTGGTCTTTG ACGCCAAGGC CCCCTCCTTC
541 CGCCACGAGG CCTACGGGGG GTACAAGGCG GGCCGGGCCC CCACACCGGA GGACTTTCCC
601 CGGCAACTCG CCCTCATCAA GGAGCTGGTG GACCTCCTGG GGCTGGCGCG CCTCGAGGTC
661 CCGGGCTACG AGGCGGACGA CGTCTGGCC AGCCTGGCCA AGAAGGCGGA AAAGGAGGGC
721 TACGAGGTCC GCATCCTCAC CGCCGACAAA GACCTTTACC AGCTCCTTTC CGACCGCATC
781 CACGTCTTCC ACCCCGAGGG GTACCTCATC ACCCCGGCCT GGCTTTGGGA AAAGTACGGC
841 CTGAGGCCCG ACCAGTGGGC GACTACCGG GCCCTGACCG GGGACGAGTC CGACAACCTT
901 CCCGGGGTCA AGGGCATCGG GGAGAAGACG GCGAGGAAGC TTCTGGAGGA GTGGGGGAGC
961 CTGGAAGCCC TCCTCAAGAA CCTGGACCGG CTGAAGCCCG CCATCCGGGA GAAGATCCTG
1021 GCCCACATGG ACGATCTGAA GCTCTCCTGG GACCTGGCCA AGGTGCGCAC CGACCTGCCC
1081 CTGGAGGTGG ACTTCGCCAA AAGGCGGGAG CCCGACCGGG AGAGGCTTAG GGCTTTCTG
1141 GAGAGGCTTG AGTTTGGCAG CCTCCTCCAC GAGTTCGGCC TTCTGGAAAG CCCCAAGGCC
1201 CTGGAGGAGG CCCCCTGGCC CCCCGGAA GGGGCCTTCG TGGGCTTTGT GCTTTCCCGC
1261 AAGGACCCCA TGTGGGCCGA TCTTCTGGCC CTGGCCCGCC CCAGGGGGG CCGGTCTCAC
1321 CGGGCCCCCG AGCCTTATAA AGCCCTCAGG GACCTGAAGG AGGCGCGGGG GCTTCTCGCC
1381 AAAGACCTGA GCGTTCTGGC CCTGAGGGAA GGCCTTGGCC TCCCGCCCCG CGACGACCCC
1441 ATGCTCCTCG CCTACCTCCT GGACCCTTCC AACACCACCC CCGAGGGGGT GGCCCGGCGC
1501 TACGGCGGGG AGTGGACGGA GGAGGCGGGG GAGCGGGCCG CCCTTTCCGA GAGGCTCTTC
1561 GCCAACCTGT GGGGGAGGCT TGAGGGGGAG GAGAGGCTCC TTTGGCTTTA CCGGGAGGTG
1621 GAGAGGCCCC TTTCCGCTGT CCTGGCCAC ATGGAGGCCA CGGGGGTGCG CCTGGACGTG
1681 GCCTATCTCA GGGCCTTGTC CCTGGAGGTG GCCGAGGAGA TCGCCCGCCT CGAGGCCGAG
1741 GTCTTCCGCC TGGCCGGCCA CCCCTTCAAC CTCAACTCCC GGGACCAGCT GGAAAGGTC
1801 CTCTTTGACG AGCTAGGGCT TCCCGCCATC GGCAAGACGG AGAAGACCGG CAAGCGCTCC
1861 ACCAGCGCCG CCGTCTGGA GGCCCTCCGC GAGGCCACC CCATCGTGGA GAAGATCCTG
1921 CAGTACCGGG AGCTCACCAA GCTGAAGAGC ACCTACATTG ACCCCTTGCC GGACCTCATC
1981 CACCCAGGA CGGGCCGCCT CCACACCCGC TTCAACCAGA CGGCCACGGC CACGGGCAGG
2041 CTAAGTAGCT CCGATCCCAA CCTCCAGAAC ATCCCCGTCC GCACCCCGCT TGGGCAGAGG
2101 ATCCGCCGGG CCTTCATCGC CGAGGAGGGG TGGCTATTGG TGGCCCTGGA CTATAGCCAG
2161 ATAGAGCTCA GGGTGTGTC CCACCTTCC GGCACGAGA ACCTGATCCG GGTCTTCCAG
2221 GAGGGGCGGG ACATCCACAC GGAGACCCGC AGCTGGATGT TCGGCGTCCC CCGGAGGCC
2281 GTGGACCCCA TGATGCGCCG GCGGCCAAG ACCATCAACT TCGGGGTCCCT CTACGGCATG
2341 TCGGCCACC GCCTCTCCA GGAGCTAGCC ATCCCTTACG AGGAGGCCCA GGCCTTCATT
2401 GAGCGCTACT TTCAGAGCTT CCCCAGGTG CGGGCCTGGA TTGAGAAGAC CCTGGAGGAG
2461 GGCAGGAGGC GGGGGTACGT GGAGACCCTC TTCGGCCGCC GCCGCTACGT GCCAGACCTA
2521 GAGGCCCGGG TGAAGAGCGT GCGGGAGGCG GCCGAGCGCA TGGCCTTCAA CATGCCCGTC
2581 CAGGGCACCG CCGCCGACCT CATGAAGCTG GCTATGGTGA AGCTCTTCCC CAGGCTGGAG
2641 GAAATGGGGG CCAGGATGCT CCTTCAGGTC CACGACGAGC TGGTCTCGA GGCCCCAAA
2701 GAGAGGGCGG AGGCCGTGGC CCGGCTGGCC AAGGAGGTCA TGGAGGGGGT GTATCCCCTG
2761 GCCGTGCCCC TGGAGGTGGA GGTGGGGATA GGGGAGGACT GGCTCTCCSC CAAGGAGTGA
2821 TAGATCTGA

```

FIGURA 7
Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión péptido-DSP-Taq
(SEC ID N°: 6)

```

1  MIDLQRPQAA  TMSRHHHHH  HPWDYKDDDD  KPRWNSSATV  KFKYKGEEKE  VDISKIKKVV
61  RVGKMISFTY  DEGGGKTGRG  AVSEKDAPKE  LLQMLEKQKK  IKNSGNLPLF  EPKGRVLLVD
121 GHHLAYRTFH  ALKGLTTSRG  EPVQAVYGFA  KSLLKALKED  GDAVIVVFDA  KAPSRHEAY
181 GGYKAGRAPT  PEDFPRQLAL  IKELVDLLGL  ARLEVPGYEA  DDVLASLAKK  AEKEGYEVRI
241 LTADKDLYQL  LSDRIHVLHP  EGYLITPAWL  WEKYGLRPDQ  WADYRALTGD  ESDNLPGVKG
301 IGEKTARKLL  EEWGSLEALL  KNLDRLKPAI  REKILAHMDD  LKLSWDLAKV  RTDLPLEVDF
361 AKRREPDRE  LRAFLELLEF  GLLHEFGLL  ESPKALEEAP  WPPPEGAFVG  FVLSRKEPMW
421 ADLLALAAAR  GGRVHRAPEP  YKALRDLKEA  RGLLAKDLSV  LALREGLGLP  PGDDPMLLAY
481 LLDPSNTTPE  GVARRYGGEW  TEEAGERAAL  SERLFANLWG  RLEGEERLLW  LYREVERPLS
541 AVLAHMEATG  VRLDVAYLRA  LSLEVAEEIA  RLEAEVFRLA  GHPPFNLSRD  QLERVLFDEL
601 GLPAIGKTEK  TGKRSTSAAV  LEALREAHPI  VEKILQYREL  TKLKSTYIDP  LPDLIHPRTG
661 RLHTRFNQTA  TATGRLSSSD  PNLQNI PVRT  PLGQRIRRAF  IAEEGWLLVA  LDYSQIELRV
721 LAHLSGDENL  IRVFQGRDI  HTETASWMFG  VPRAVDPLM  RRAAKTINFG  VLYGMSAHLR
781 SQELAIPYEE  AQAFIERYFQ  SFPKVRWIE  KTL EEGRRRG  YVETLFGRRR  YVPDLEARVK
841 SVREAAERMA  FNMPVQGTAA  DLMKLAMVKL  FPRLEEMGAR  MLLQVHDELV  LEAPKERAEA
901 VARLAKEVME  GYPLAVPLE  VEVGIGEDWL  SAKE**I*

```

FIGURA 8
Secuencia de nucleótidos de péptido-marca DSP
(SEC ID N°: 7)

1 ATGATCGACC TGCAGCGGCC GCAGGCCGCC ACCATGGACT CTAGACACCA TCACCATCAC
61 CACCCATGGG ATTACAAGGA CGACGATGAC AAGCCGCGGT GGAATTCGAG CGCAACCGTA
121 AAGTTCAAGT ACAAAGGCGA AGAAAAAGAG GTAGACATCT CCAAGATCAA GAAAGTATGG
181 CGTGTGGGCA AGATGATCTC CTTACCTAC GACGAGGGCG GTGGCAAGAC CGGCCGCGGT
241 GCGGTAAGCG AAAAGGACGC GCCGAAGGAG CTGCTGCAGA TGCTGGAGAA GCAGAAAAG
301 ATTAAGAATT CGGGTAACCT GCCCC

FIGURA 9
Secuencia de aminoácidos de péptido-marca DSP
(SEC ID N°: 8)

1 MIDLQRPQAA TMSRHHHHH HPWDYKDDDD KPRWNSSATV KFKYKGEEKE VDISKIKKVV
61 RVGKMISFTY DEGGGKTGRG AVSEKDAPKE LLQMLEKQKK IKNSGN

Figura 10
Secuencia de nucleótidos de marca DSP
(SEC ID N°: 9)

1 AGCGCAACCG TAAAGTTCAA GTACAAAGGC GAAGAAAAAG AGGTAGACAT CTCCAAGATC
61 AAGAAAGTAT GGCGTGTTGG CAAGATGATC TCCTTCACCT ACGACGAGGG CGGTGGCAAG
121 ACCGGCCGCG GTGCGGTAAG CGAAAAGGAC GCGCCGAAGG AGCTGCTGCA GATGCTGGAG
181 AAGCAGAAAA AGATTAAGAA TTCG

FIGURA 11
Secuencia de aminoácidos de marca DSP
(SEC ID N°: 10)

1 SATVKFKYKG EEKEVDISKI KKVWRVGKMI SFTYDEGGGK TGRGAVSEKD APKELLQMLE
61 KQKKIKNS

FIGURA 12
Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión péptido-TGO-DSP
(SEC ID N°: 11)

```

1  MIDLQRPQAA TMDSRHHHHH HPWDYKDDDD KPRWNSILDT DYITEDGKPV IRIFKKENGE
61  FKIDYDRNFE PYIYALLKDD SAIEDVKKIT AERHGTTVRV VRAEKVKKKF LGRPIEVWKL
121 YFTHPQDVPA IRDKIKEHPA VVDIYEYDIP FAKRYLIDKG LIPMEGDEEL KMLAFDIETL
181 YHEGEEFAEG PILMISYADE EGARVITWKN IDLPYVDVVS TEKEMIKRFL KVVKEKDPDV
241 LITYNGDNFD FAYLKKRSEK LGVKFILGRE GSEPKIQRMG DRFAVEVKGR IHFDLYPVIR
301 RTINLPTYTL EAVYEAIFGQ PKEKVYAEI AQAWETGEGE ERVARYSMED AKVTYELGKE
361 FFPMEAQLSR LVGQSLWDVS RSSTGNLVEW FLLRKAYERN ELAPNKPDER ELARRRESYA
421 GGYVKEPERG LWENIVYLDF RSLYPSIIIT HNVSPDTLNR EGCEEYDVAP QVGHKFCKDF
481 PGFIPSLGDL LLEERQKVKK KMKATIDPIE KKLLDYRQRA IKILANSFYG YGYAKARWY
541 CKECAESVTA WGRQYIETTI REIEEKFGFK VLYADTDGFF ATIPGADAET VKKKAKEFLD
601 YINAKLPGLL ELEYEGFYKR GFFVTKKKYA VIDEEDKITT RGLEIVRRDW SEIAKETQAR
661 VLEAILKHGD VEEAVRIVKE VTEKLSKYEV PPEKLVIEQ ITRDLKDYKA TGPHVAVAKR
721 LAARGIKIRP GTVISYIVLK GSGRIGDRAI PFDEFDPAKH KYNAEYYIEN QVLPAPERIL
781 RAFGYRKEDL RYQKTRQVGL GAWLKPKTSW ICATVKFKYK GEEKEVDISK IKKVWRVGKM
841 ISFTYDEGGG KTGRGAVSEK DAPKELLQML EKQKKI

```

Figura 13
Secuencia de ácido nucleico de proteína de fusión péptido-TGO-DSP
(SEC ID N°: 12)

```

1  ATGATCGACC TGCAGCGGCC GCAGGCCGCC ACCATGGACT CTAGACACCA TCACCATCAC
61 CACCCATGGG ATTACAAGGA CGACGATGAC AAGCCGCGGT GGAATTCAT CCTCGATACA
121 GACTACATAA CTGAGGATGG AAAGCCCCTC ATCAGGATCT TCAAGAAGGA GAACGGCGAG
181 TTCAAAATAG ACTACGACAG AAACCTTGAG CCATACATCT ACGCGCTCTT GAAGGACGAC
241 TCTGCGATTG AGGACGTCAA GAAGATAACT GCCGAGAGGC ACGGCACTAC CGTTAGGGTT
301 GTCAGGGCCG AGAAAGTGAA GAAGAAGTTC CTAGGCAGGC CGATAGAGGT CTGGAAGCTC
361 TACTTCACTC ACCCCCAGGA CGTTCCCGCA ATCAGGGACA AGATAAAGGA GCATCCTGCC
421 GTTGTGGACA TCTACGAGTA CGACATCCCC TTCGCGAAGC GCTACCTCAT AGACAAAGGC
481 TTAATCCCGA TGGAGGGCGA CGAGGAACTT AAGATGCTCG CCTTCGACAT CGAGACGCTC
541 TATCACGAGG GCGAGGAGTT CGCCGAAGGG CCTATCCTGA TGATAAGCTA CGCCGACGAG
601 GAAGGGGCGC GCGTTATTAC CTGGAAGAAT ATCGACCTTC CCTATGTCTA CGTCTTTTCC
661 ACCGAGAAGG AGATGATAAA GCGCTTCCTC AAGGTCGTCA AGGAAAAGGA TCCCGACGTC
721 CTCATAACCT ACAACGGCGA CAACTTCGAC TTCGCCTACC TCAAGAAGCG CTCCGAGAAG
781 CTCGGAGTCA AGTTCATCCT CGGAAGGGAA GGGAGCGAGC CGAAAATCCA GCGCATGGGC
841 GATCGCTTTG CGGTGGAGGT CAAGGGAAGG ATTCACTTCG ACCTCTACCC CGTCATTAGG
901 AGAACGATTA ACCTCCCCAC TTACACCCTT GAGGCAGTAT ATGAAGCCAT CTTTGGACAG
961 CCGAAGGAGA AGGTCTACGC TGAGGAGATA GCGCAGGCCT GGGAAACGGG CGAGGGATTA
1021 GAAAGGGTGG CCCGCTACTC GATGGAGGAC GCAAAGGTAA CCTATGAACT CGGAAAAGAG
1081 TTCTTCCCTA TGGAAAGCCCA GCTCTCGCGC CTCGTAGGCC AGAGCCTCTG GGATGTATCT
1141 CGCTCGAGTA CCGGAAACCT CGTCAAGTGG TTTTGTCTGA GGAAGCCCTA CGAGAGGAAT
1201 GAACTTGAC CAAACAAGCC GGACGAGAGG GAGCTGGCAA GAAGAAGGGA GAGCTACGCG
1261 GGTGGATACG TCAAGGAGCC CGAAAGGGGA CTGTGGGAGA ACATCGTGTA TCTGGACTTC
1321 CGCTCCCTGT ATCCTTCGAT AATAATCACC CATAACGTCT CCCCTGATAC ACTCAACAGG
1381 GAGGGTTGTG AGGAGTACGA CGTGGCTCCT CAGGTAGGCC ATAAGTTCTG CAAGGACTTC
1441 CCCGGCTTCA TCCCAAGCCT CCTCGGGGAC CTCTTGAGG AGAGACAGAA GGTAAAGAAG
1501 AAGATGAAGG CCACTATAGA CCCAATCGAG AAGAAACTCC TCGATTACAG GCAGCGAGCA
1561 ATCAAAATCC TTGCTAATAG CTTCTACGGT TACTACGGCT ATGCAAAGGC CCGCTGGTAC
1621 TGCAAGGAGT GCGCCGAGAG CGTTACCGCT TGGGGCAGGC AGTACATCGA GACCACGATA
1681 AGGGAAATAG AGGAGAAATT TGGCTTTAAA GTCCTCTACG CGGACACAGA TGGATTTTTT
1741 GCAACAATAC CTGGAGCGGA CGCCGAAACC GTCAAAAAGA AGGCAAAGGA GTTCCTGGAC
1801 TACATCAACG CCAAAGTCC CGGCCTGCTC GAACTCGAAT ACGAGGGCTT CTACAAGCGC
1861 GGCTTCTTCG TGACGAAGAA GAAGTACGCG GTTATAGACG AGGAGGACAA GATAACGACG
1921 CGCGGGCTTG AAATAGTTAG GCCTGACTGG AGCGAGATAG CGAAGGAGAC GCAGGCGAGG
1981 GTTCTTGAGG CGATACTAAA GCACGGTGAC GTTGAAGAAG CGGTAAGGAT TGTCAAAGAG
2041 GTTACGGAGA AGCTGAGCAA GTACGAGGTT CCACCGGAGA AGCTGGTCAT CTACGAGCAG
2101 ATAACCCGCG ACCTGAAGGA CTACAAGGCC ACCGGGCCGC ATGTGGCTGT TGCAAAACGC
2161 CTCGCCGCAA GGGGGATAAA AATCCGGCCC GGAACGGTCA TAAGCTACAT CGTGCTCAA
2221 GGCTCGGGAA GGATTGGGGA CAGGGCTATA CCCTTGACG AATTTGACCC GGCAAAGCAC
2281 AAGTACAATG CAGAATACTA CATCGAGAAC CAGGTTCTTC CAGCTGTGGA GAGGATTCTG
2341 AGGGCCTTTG GTTACCGTAA AGAAGATTTA AGGTATCAGA AAACGCGGCA GGTGGCTTG
2401 GGGCGTGGC TAAAACCTAA GACAAGCTGG ATCTGCGCAA CCGTAAAGTT CAAGTACAAA
2461 GGCGAAGAAA AAGAGGTAGA CATCTCCAAG ATCAAGAAAG TATGGCGTGT GGGCAAGATG
2521 ATCTCCTTCA CCTACGACGA GGGCGGTGGC AAGACCGGCC GCGGTGCGGT AAGCGAAAAG
2581 GACGCGCCGA AGGAGCTGCT GCAGATGCTG GAGAAGCAGA AAAAGATTTA GTGG

```

FIGURA 14
Secuencia de aminoácido de péptido corto
(SEC ID N°: 13)

MVDDLQRPH HHHHPWDYK DDDDKPRWNS GW

FIGURA 15

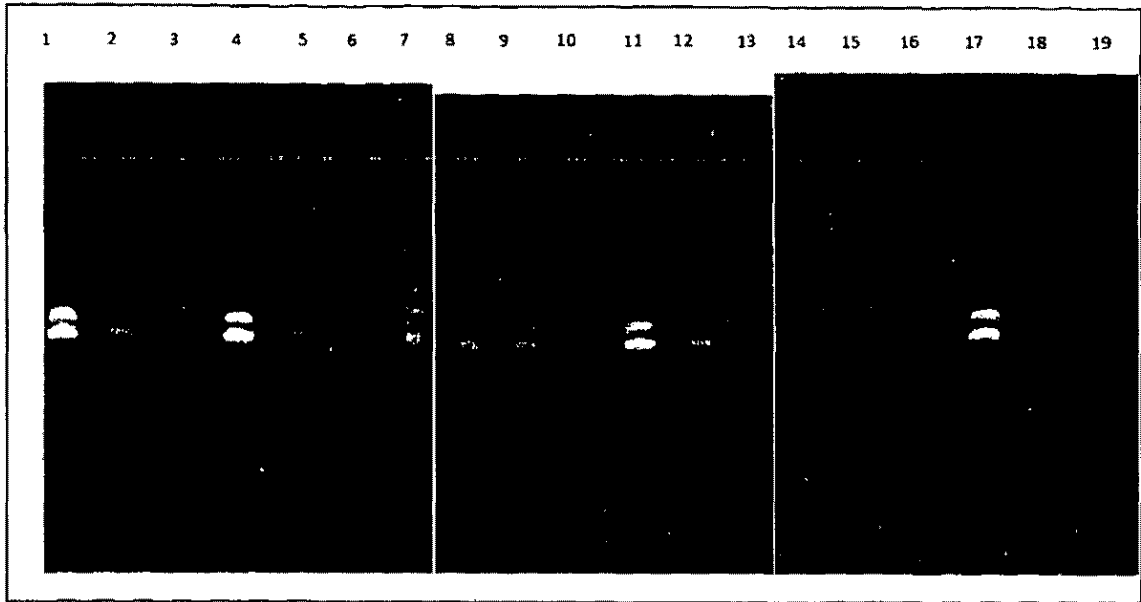


FIGURA 16
Secuencia de aminoácidos de marca peptídica
(SEC ID N°: 14)

1 MIDLQRPQAA TMSRHHHHH HPWDYKDDDD KPRWNS

FIGURA 17
Secuencia de ácido nucleico que codifica marca peptídica
(SEC ID N°: 15)

1 ATGATCGACC TGCAGCGGCC GCAGGCCGCC ACCATGGACT CTAGACACCA TCACCATCAC
61 CACCCATGGG ATTACAAGGA CGACGATGAC AAGCCGCGGT GGAATTCC

FIGURA 18
Secuencia de aminoácidos de marca peptídica
(SEC ID N°: 16)

1 MIDLQRP SAA TMVDDLQRP HHHHPWDYK DDDKPRWNS

FIGURA 19
Secuencia de ácido nucleico que codifica marca peptídica
(SEC ID N°: 17)

1 ATGATCGACC TGCAGCGGCC ATCCGCCGCC ACCATGGTCG ACGACCTGCA GCGGCCGCAC
61 CATCACCATC ACCATCCATG GGATTACAAG GACGACGATG ACAAGCCGCG GTGGAATTCG

FIGURA 20
Secuencia de aminoácidos de marca peptídica
(SEC ID N°: 18)

1 MVDDLQRPHE HHHHPWDYKD DDDKPRWNS

FIGURA 21
Secuencia de ácido nucleico que codifica marca peptídica
(SEC ID N°: 19)

1 ATGGTCGACG ACCTGCAGCG GCCGCACCAT CACCATCACC ATCCATGGGA TTACAAGGAC
61 GACGATGACA AGCCGCGGTG GAATTCG

FIGURA 22

**Secuencia de aminoácidos de marca peptídica-hEPO (eritropoyetina humana)
(SEC ID N°: 20)**

1 MIDLQRPSAA TMVDDLQRP HHHHPWDYK DDDKPRWNS GAPRLICDS RVLERYLLEA
61 KEAENITTC AEHCSLNENI TVPDTKVNFI AWKRMEVGQQ AVEVWQGLAL LSEAVLRGQA
121 LLVNSSQPWE PLQLHVDKAV SGLRSLTLL RALGAQKEAI SPPDAASAAP LRTITADTFR
181 KLFRVYSNFL RGKLYTGE ACRTGDR

FIGURA 23
Secuencia de ácido nucleico que codifica marca peptídica-hEPO
(SEC ID N°: 21)

1 ATGATCGACC TGCAGCGGCC ATCCGCCGCC ACCATGGTCG ACGACCTGCA GCGGCCGCAC
 61 CATCACCATC ACCATCCATG GGATTACAAG GACGACGATG ACAAGCCGCG GTGGAATTCG
 121 GGGGCCCCAC CACGCCTCAT CTGTGACAGC CGAGTCCTGG AGAGGTACCT CTTGGAGGCC
 181 AAGGAGGCCG AGAATATCAC GACGGGCTGT GCTGAACACT GCAGCTTGAA TGAGAATATC
 241 ACTGTCCCAG ACACCAAAGT TAATTTCTAT GCCTGGAAGA GGATGGAGGT CGGGCAGCAG
 301 GCCGTAGAAG TCTGGCAGGG CCTGGCCCTG CTGTCGGAAG CTGTCCTGCG GGGCCAGGCC
 361 CTGTTGGTCA ACTCTTCCA GCCGTGGGAG CCCCTGCAGC TGCATGTGGA TAAAGCCGTC
 421 AGTGGCCTTC GCAGCCTCAC CACTCTGCTT CGGGCTCTGG GAGCCAGAA GGAAGCCATC
 481 TCCCCTCCAG ATGCGGCCTC AGCTGCTCCA CTCCGAACAA TCACTGCTGA CACTTTCGCG
 541 AAACTCTTCC GAGTCTACTC CAATTTCTC CGGGGAAAGC TGAAGCTGTA CACAGGGGAG
 601 GCCTGCAGGA CAGGGGACAG A

Figura 24
Secuencia de aminoácidos de marca peptídica-hLIF (factor inhibidor de
leucemia humana)
(SEC ID N°: 22)

1 MIDLQRPSAA TMVDDLQRP HHHHPWDYK DDDKPRWNS KVLAAGVVPL LLVLHWKHGA
61 GSPLPITFVN ATCAIRHPCH NNLMNQIRSQ LAQLNGSANA LFILYYTAQG EFPNNLDKL
121 CGPNVTDPPP FHANGTEKAK LVELYRIVVY LGTSLGNITR DQKILNPSAL SLHSKLNATA
181 DILRGLLSNV LCRLCSRYHV GHVDVTYGPD TSGKDVFOKK KLGQQLLGKY KQIIAVLAQA
241 F

Figura 25
Secuencia de ácido nucleico que codifica marca peptídica- hLIF
(SEC ID N°: 23)

```

1 ATGATCGACC TGCAGCGGCC ATCCGCCGCC ACCATGGTCG ACGACCTGCA GCGGCCGCAC
61 CATCACCATC ACCATCCATG GGATTACAAG GACGACGATG ACAAGCCGCG GTGGAATTTCG
121 AAAGTGCTGG CGGCGGGCGT GGTGCCGCTG CTGCTGGTGC TGCATTGGAA ACATGGCGCG
181 GGCAGCCCGC TGCCGATTAC CCCGGTGAAC GCGACCTGCG CGATTCGCCA TCCGTGCCAT
241 AACCAACCTGA TGAACCAGAT TCGCAGCCAG CTGGCGCAGC TGAACGGCAG CGCGAACGCG
301 CTGTTTATTC TGTATTATAC CGCGCAGGGC GAACCGTTTC CGAACAACCT GGATAAACTG
361 TGCGGCCCGA ACGTGACCGA TTTTCCGCCG TTTCATGCGA ACGGCACCGA AAAAGCGAAA
421 CTGGTGGAAC TGTATCGCAT TGTGGTGTAT CTGGGCACCA GCCTGGGCAA CATTACCCGC
481 GATCAGAAAA TTCTGAACCC GAGCGCGCTG AGCCTGCATA GCAAACCTGAA CGCGACCCGG
541 GATATTCTGC GCGGCCTGCT GAGCAACGTG CTGTGCCGCC TGTGCAGCAA ATATCATGTG
601 GGCCATGTGG ATGTGACCTA TGGCCCGGAT ACCAGCGGCA AAGATGTGTT TCAGAAAAAA
661 AAATGGGCT GCCAGCTGCT GGGCAAATAT AAACAGATTA TTGCGGTGCT GCGCGAGGCG
721 TTT

```

FIGURA 26

