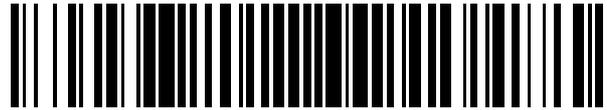


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 893**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/12**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08855304 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2215222**

54 Título: **ADN polimerasas mutantes con capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP)**

30 Prioridad:

**28.11.2007 US 990847 P**

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

**14.12.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAUER, KEITH A. y  
GELFAND, DAVID HARROW**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 553 893 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**

ADN polimerasas mutantes con capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP)

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las ADN polimerasas y a su utilización en diversas aplicaciones, incluyendo la polimerización activada por pirofosforolisis.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) es un método de PCR en el que el extremo del cebador o cebadores en un terminador de extensión debe eliminarse mediante pirofosforolisis antes de que el cebador o cebadores puedan extenderse. La "pirofosforolisis" es simplemente la inversa de la extensión de un molde cebado por parte de la ADN polimerasa (es decir, la adición de un residuo de dNMP a la cadena del cebador). En la reacción "directa" (es decir, la extensión de un molde cebado), se genera pirofosfato y se consumen dNTP, al añadirse dNMP al extremo 3' del cebador. En la reacción "inversa" (es decir, la pirofosforolisis), se genera pirofosfato y se generan dNTP, al escindirse dNMP del extremo 3' de la cadena de cebador. Los moldes cebador que terminan en un residuo que no puede extenderse (un "terminador") se espera que estén expuestos a pirofosforolisis en el caso de que la polimerasa sea capaz de incorporar el terminador y en el caso de que se encuentre presente pirofosfato. En la PAP, la utilización de dichos cebadores bloqueados permite la detección de alelos raros debido a que la pirofosforolisis requiere un complejo de cebador-molde perfectamente correspondiente para que la tasa de eliminación de terminador sea máxima.

25 BREVE DESCRIPCION RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ADN polimerasas que presentan una capacidad de polimerización activada por pirofosforolisis mejorada respecto a las ADN polimerasas no modificadas correspondientes. Las ADN polimerasas descritas en la presente memoria resultan útiles en la transcripción inversa o amplificación de moldes polinucleótidos utilizando cebadores que comprenden un nucleótido terminador en el extremo 3'. Las polimerasas de la presente invención presentan utilidad en, por ejemplo, estudios de ADN recombinante y el diagnóstico médico de enfermedades que implican la detección de alelos raros. La ADN polimerasa de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos R-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-K-L-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-Y-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>, en la que X<sub>1</sub> es (E), (Q), (G), (K), o (T); X<sub>2</sub> es (L), (I), o (Y); X<sub>3</sub> es (T), (M), (D), (S), (G), (A), (Q), o (L); X<sub>4</sub> es (K), (R), o (Q); X<sub>5</sub> es (N), (S), o (G); X<sub>6</sub> es S; X<sub>7</sub> es (V), (I), (L), (A), o (T); X<sub>8</sub> es (D) o (E); X<sub>9</sub> es (P), (A), (G), (K), (T), o (S); X<sub>10</sub> es (L) o (I) and X<sub>11</sub> es (P) o (L)

Se dan a conocer además ADN polimerasas que comprenden la secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-K-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (SEC ID n° 2), en la que X<sub>1</sub>-X<sub>9</sub> y X<sub>11</sub>-X<sub>16</sub> son cualquier aminoácido y X<sub>10</sub> no es T o A. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es R o L, X<sub>3</sub> es L, I o Y, X<sub>5</sub> es R o L, X<sub>6</sub> es I o se encuentra ausente, X<sub>7</sub> es G o se encuentra ausente, X<sub>8</sub> es K, R o Q, X<sub>9</sub> es N, S o G, X<sub>10</sub> es cualquier aminoácido excepto T o A, X<sub>11</sub> es Y o E, X<sub>13</sub> es D o E, X<sub>15</sub> es L, I o A, y X<sub>16</sub> es P, L o W (SEC ID n° 40) En algunas realizaciones, la polimerasa presenta una tasa de extensión de ácidos nucleicos mejorada de un cebador bloqueado respecto a una ADN polimerasa de otro modo idéntica en la que X<sub>10</sub> es T o A. En algunas realizaciones, X<sub>2</sub> es (E), (Q), (G), (K), (T) o (M), X<sub>4</sub> es (T), (M), (D), (S), (G), (A), (Q) o (L), y X<sub>12</sub> es (V), (I), (L), (A), (T) o (G), y X<sub>14</sub> es (P), (A), (G), (K), (T) o (S) (SEC ID n° 41) En algunas realizaciones, X<sub>10</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de (G), (L), (M), (F), (W), (K), (Q), (E), (S), (P), (V), (I), (C), (Y), (H), (R), (N) y (D) (SEC ID n° 42). En realizaciones preferentes según la invención, X<sub>10</sub> es S (SEC ID n° 43).

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la presente invención son versiones modificadas de una polimerasa no modificada. En su forma no modificada, la polimerasa generalmente presenta la capacidad de PAP de extender un cebador bloqueado que presenta un nucleótido terminador en el extremo 3' cuando es perfectamente correspondiente con un ADN molde.

La forma modificada de la polimerasa se caracteriza adicionalmente porque incluye una sustitución de aminoácidos respecto a su forma no modificada, por lo menos en la posición X<sub>6</sub> y presenta una tasa de extensión de ácidos nucleicos mejorada de un cebador bloqueado respecto a su forma no modificada. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es (E), (Q), (G), (K) o (T), X<sub>3</sub> es (T), (M), (D), (S), (G), (A), (Q) o (L), X<sub>7</sub> es (V), (I), (L), (A) o (T), y X<sub>9</sub> es (P), (A), (G), (K), (T) o (S) (SEC ID n° 45). En otras realizaciones también dadas a conocer, el aminoácido en la posición X<sub>6</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de (G), (A), (L), (M), (F), (W), (K), (Q), (E), (S), (P), (V), (I), (C), (Y), (H), (R), (N) y (D) (SEC ID n° 46). En otras realizaciones, el aminoácido en la posición X<sub>6</sub> es (S) (SEC ID n° 47).

En algunas realizaciones también dadas a conocer, en las que las ADN polimerasas en su forma no modificada incluyen una secuencia de aminoácidos que presenta el motivo siguiente: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-K-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>12</sub>-

X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (SEC ID nº 25), en la que X<sub>1</sub>-X<sub>9</sub> y X<sub>11</sub>-X<sub>16</sub> son cualquier aminoácido y X<sub>10</sub> es T o A. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es R o L, X<sub>3</sub> es L, I o Y, X<sub>5</sub> es R o L, X<sub>6</sub> es I o se encuentra ausente, X<sub>7</sub> es G o se encuentra ausente, X<sub>8</sub> es K, R o Q, X<sub>9</sub> es N, S o G, X<sub>10</sub> es T o A, X<sub>11</sub> es Y o E, X<sub>13</sub> es D o E, X<sub>15</sub> es L, I o A, y X<sub>16</sub> es P, L o W (SEC ID nº 47).

La forma modificada de la polimerasa se caracteriza adicionalmente porque incluye una sustitución de aminoácidos respecto a su forma no modificada, por lo menos en la posición X<sub>10</sub> y en el que la forma modificada de la polimerasa presenta una tasa de extensión de ácidos nucleicos mejorada de un cebador bloqueado respecto a su forma no modificada.

Diversas ADN polimerasas pueden mutarse según la presente invención. Resultan particularmente adecuadas las ADN polimerasas termoestables, incluyendo las polimerasas termoestables de tipo salvaje o naturales de diversas especies de bacterias termofílicas, así como polimerasas termoestables sintéticas derivadas de dichos enzimas de tipo salvaje o naturales mediante sustitución, inserción, delección y otra modificación de aminoácidos. Entre las formas no modificadas ejemplares de polimerasas se incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa CS5 o CS6, o una ADN polimerasa que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90% respecto a las mismas. Entre otras polimerasas no modificadas se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de cualquiera de las especies de bacterias termofílicas siguientes (o de una ADN polimerasa funcional que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a dicha polimerasa): *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus* sp. Z05, *Thermus aquaticus*, *Thernaats flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus* sp. sps17, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosipho africanus*. Entre las polimerasas adicionales que resultan adecuadas para la mutación en la práctica de la invención se incluyen polimerasas que presentan actividad de transcriptasa inversa o cualquier polimerasa que presente capacidad de PAP.

En algunas realizaciones, la forma no modificada de la polimerasa comprende una polimerasa quimérica. En una realización, por ejemplo, la forma no modificada de la polimerasa quimérica es la ADN polimerasa CS5 (SEC ID nº 20) o una polimerasa que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90% respecto a la ADN polimerasa CS5. En variaciones específicas, la forma no modificada de la polimerasa quimérica incluye una o más sustituciones de aminoácidos respecto a SEC ID nº 20 que se seleccionan de entre G46E, L329A y E678G. Por ejemplo, la forma no modificada de la polimerasa mutante puede ser G46E, G46E L329A, G46E E678G, G46E L329A E678G. En realizaciones ejemplares, dichas formas no modificadas se sustituyen proporcionando una polimerasa mutante con una sustitución T606S. Por ejemplo, la ADN polimerasa quimérica mutante puede ser cualquier de entre las siguientes: G46E T606S, G46E L329A T606S, G46E T606S E678G, G46E L329A T606S E678G o similares.

En diversos otros aspectos, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante codificante de una ADN polimerasa tal como se describe en la presente memoria, un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y/o una célula huésped transformada con el vector. En determinadas realizaciones el vector es un vector de expresión. Las células huésped que comprenden dichos vectores de expresión resultan útiles en métodos de la invención para producir la polimerasa mediante el cultivo de las células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante.

En todavía otro aspecto, se proporciona un método para llevar a cabo la extensión de cebadores utilizando un cebador bloqueado. El método incluye generalmente poner en contacto una ADN polimerasa de la invención con un cebador que presenta un nucleótido terminador en el extremo 3', un molde polinucleótido, pirofosfato (PPi) y nucleótidos libres bajo condiciones adecuadas para la eliminación del nucleótido terminador, y la extensión del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido mediante polimerización activada por pirofosforólisis (PAP). Entre los nucleótidos libres pueden incluirse nucleótidos no convencionales, tales como, por ejemplo, ribonucleótidos y/o nucleótidos marcados. Además, el cebador y/o molde puede incluir uno o más análogos de nucleótido. En algunas variaciones, el método de extensión de cebadores es un método para la amplificación de polinucleótidos que incluye poner en contacto la ADN polimerasa de la invención con una pareja de cebadores, el molde polinucleótido y los nucleósidos libres bajo condiciones adecuadas para la amplificación del polinucleótido.

La presente invención proporciona además un kit útil para llevar a cabo un método de PAP. Generalmente, el kit incluye por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de la invención tal como se indica en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el kit incluye además uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, en variaciones específicas, el recipiente o recipientes adicionales proporcionan nucleótidos libres, un tampón adecuado para la PAPA y/o un cebador hibridable, bajo condiciones de PAP, a un molde polinucleótido predeterminado. En algunas realizaciones, el cebador presenta un nucleótido terminador no extensible en el extremo 3'-terminal.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del dominio de polimerasa de ADN polimerasas termoestables ejemplares de diversas especies de bacterias termofílicas y el bacteriófago T7: *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID nº 3), *Thermus caldophilus* (Tca) (SEC ID nº 4), *Thermus sp. Z05* (Z05) (SEC ID nº 5), *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID nº 6), *Thermus flavus* (Tfl) (SEC ID nº 7), *Thermus filiformis* (Tfi) (SEC ID nº 8), *Thermus sp. sps17* (Sps17) (SEC ID nº 9), *Deinococcus radiodurans* (Dra) (SEC ID nº 10), *Hot Spring family B1clon 7* (HspB7) (SEC ID nº 11), *Bacillus stearrowthermophilus* (Bst) (SEC ID nº 12), *Bacillus caldotenax* (Bca) (SEC ID nº 13), *Escherichia coli* (Eco) (SEC ID nº 14), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID nº 15), *Thermotoga neapolitana* (Tne) (SEC ID nº 16), *Thermosiphon africanus* (Taf) (SEC ID nº 17), *Hot Spring family A* (HspA) (SEC ID nº 18), ADN polimerasa termoestable quimérica CS5 (SEC ID nº 28), ADN polimerasa termoestable quimérica CS6 (SEC ID nº 29) y el bacteriófago T7 (T7) (SEC ID nº 19). Además, una secuencia que muestra residuos aminoácidos de consenso entre dichas secuencias ejemplares (SEC ID nº 30) también se encuentra incluida. Se observa que el residuo subrayado en la secuencia de consenso se encuentra conservado en cada una de las especies bacterianas, así como el bacteriófago T7, mientras que los residuos restantes en la secuencia de consenso (es decir, los no subrayados) se encuentran conservados en las especies bacterianas, pero no en el bacteriófago T7. Estos motivos se subrayan en negrita para la secuencia de la polimerasa CS5. Las posiciones de aminoácido que pueden mutar según la presente invención se indican con un asterisco (\*).

La figura 2A presenta la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa termoestable quimérica CS5 (SEC ID nº 20).

La figura 2B presenta una secuencia de aminoácidos codificante de la ADN polimerasa termoestable quimérica CS5 (SEC ID nº 22).

La figura 3A presenta la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa termoestable quimérica CS6 (SEC ID nº 21).

La figura 3B presenta una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la ADN polimerasa termoestable quimérica CS6 (SEC ID nº 23).

La figura 4 muestra los resultados de la extensión de cebadores de un molde M13 con un oligo dúplex bloqueado.

La figura 5 muestra que la polimerasa mutante puede activar el cebador bloqueado más rápidamente que el tipo salvaje parental.

La figura 6 muestra que las mutaciones no presentaron un efecto adverso sobre la capacidad de la polimerasa de extender un cebador no bloqueado.

La figura 7 muestra que la mutación T606 era responsable de la activación mejorada del cebador bloqueado en el clon 1000-G2.

La figura 8 muestra que el mutante GLTDSE es más rápido que sus clones parentales en la activación de un cebador bloqueado.

## DEFINICIONES

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, sólo se describen métodos y materiales ejemplares. Para los fines de la presente invención se definen a continuación los términos siguientes.

Las formas singulares, tales como "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "pirofosforólisis" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la eliminación de uno o más nucleótidos del extremo 3' de un ácido nucleico en presencia de pirofosfato (PPi) para generar uno o más nucleótidos trifosfato.

La expresión "polimerización activada por pirofosforólisis" o "PAP", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un método que comprende un cebador que presenta un nucleótido terminado no extensible en el extremo

3'. En presencia de pirofosfato (PPi) y con la hibridación del cebador bloqueado con un molde perfectamente correspondiente, las ADN polimerasas de la presente invención eliminarán el nucleótido terminador no extensible en el extremo 3' del cebador. A continuación, la polimerasa extenderá el cebador a lo largo del molde del extremo 3' recién creado tras la eliminación del nucleótido terminador no extensible. Las ADN polimerasas de la presente invención se consideran que presentan una "capacidad de PAP mejorada" en el caso de que la tasa de extensión de un cebador bloqueado con una polimerasa modificada o mutante de la invención sea estadísticamente más rápida que la tasa de extensión de una polimerasa que no presenta la mutación o modificación, bajo las mismas condiciones de reacción. En algunas realizaciones, una polimerasa que presenta una capacidad de PAP mejorada presentará un incremento de por lo menos 20% de la tasa de extensión de un cebador bloqueado en comparación con una polimerasa que no presenta la mutación o modificación. En algunas realizaciones, las polimerasas de la invención mostrarán un incremento de por lo menos 50% de la tasa de extensión de un cebador bloqueado. En algunas realizaciones, las polimerasas de la invención mostrarán un incremento de por lo menos 100%, o más, de la tasa de extensión de un cebador bloqueado en comparación con la misma polimerasa sin la modificación o mutación, bajo las mismas condiciones de reacción.

Un "aminoácido" se refiere a cualquier unidad monomérica que puede incorporarse en un péptido, polipéptido o proteína. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye los veinte alfa-aminoácidos naturales o genéticamente codificados: alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), glutamina (Gln o Q), ácido glutámico (Glu o E), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V). Las estructuras de estos veinte aminoácidos naturales se muestran en, por ejemplo, Stryer *et al.*, *Biochemistry*, 5a ed., Freeman and Company, 2002. Algunos aminoácidos adicionales, tales como la selenocisteína y la pirrolisina, también pueden encontrarse codificados genéticamente (Stadtman, "Selenocysteine", *Annu. Rev. Biochem.* 65:83-100, 1996, e Ibbá *et al.*, "Genetic code: introducing pyrrolysine", *Curr. Biol.* 12(13):R464-R466, 1996). El término "aminoácido" incluye además aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados (por ejemplo que presentan cadenas laterales y/o esqueletos modificados) y análogos de aminoácidos. Ver, por ejemplo, Zhang *et al.*, "Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(24):8882-8887, 2004; Anderson *et al.*, "An expanded genetic code with a functional quadruplet codon", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(20):7566-7571, 2004; Ikeda *et al.*, "Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein *in vivo*", *Protein Eng. Des. Sel.* 16(9):699-706, 2003; Chin *et al.*, "An Expanded Eukaryotic Genetic Code", *Science* 301(5635):964-967, 2003; James *et al.*, "Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues", *Protein Eng. Des. Sel.* 14(12):983-991, 2001; Kohrer *et al.*, "Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(25):14310-14315, 2001; Bacher *et al.*, "Selection and Characterization of *Escherichia coli* Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue", *J. Bacteriol.* 183(18):5414-5425, 2001; Hamano-Takaku *et al.*, "A Mutant *Escherichia coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine", *J. Biol. Chem.* 275(51):40324-40328, 2000, y Budisa *et al.*, "Proteins with  $\beta$ -(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids", *Protein Sci.* 10(7):1281-1292, 2001.

A título ilustrativo adicional, un aminoácido es típicamente un ácido orgánico que incluye un grupo amino sustituido o no sustituido, un grupo carboxi sustituido o no sustituido, y una o más cadenas laterales o grupos, o análogos de cualquiera de dichos grupos. Entre las cadenas laterales ejemplares se incluyen, por ejemplo, tiol, seleno, sulfonilo, alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alqueno, alquino, éter, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina o cualquier combinación de dichos grupos. Entre otros aminoácidos representativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aminoácidos que comprenden entrecruzantes fotoactivables, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos de espín marcado, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que contienen metal, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interactúan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoenjaulados y/o fotoisomerizables, aminoácidos radioactivos, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente cortables y/o fotocortables, aminoácidos que contienen azúcares unidos mediante carbonos, aminoácidos redox activos, aminoácidos que contienen aminotioácido y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

El término "mutante", en el contexto de las ADN polimerasas de la presente invención, se refiere a un polipéptido, típicamente recombinante, que comprende una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos respecto a una forma no modificada correspondiente de la ADN polimerasa.

La expresión "forma modificada" o "mutante modificada" en el contexto de una ADN polimerasa de la invención se refiere a una ADN polimerasa funcional en la que por lo menos el residuo en la posición X<sub>6</sub>, por ejemplo en SEC ID

nº 24, no es T, o X<sub>10</sub> en SEC ID nº 25 no es T o A, y en el que la polimerasa muestra una capacidad de PAP mejorada en comparación con una forma no modificada de la polimerasa.

La expresión "forma no modificada" o "mutante no modificada" en el contexto de una ADN polimerasa de la presente invención se refiere a una ADN polimerasa funcional en la que por lo menos el residuo en la posición X<sub>6</sub>, por ejemplo en SEC ID nº 24, es T, o la posición X<sub>10</sub> en SEC ID nº 25 es T o A, y en el que la forma no modificada de una ADN polimerasa de la invención puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa de tipo salvaje y/o natural. Una forma no modificada de una ADN polimerasa también puede ser una proteína mutante que ha sido deliberadamente mutada en una posición que no es X<sub>6</sub> en SEC ID nº 24 o X<sub>10</sub> en SEC ID nº 25, proporcionando la funcionalidad deseada, por ejemplo la incorporación mejorada de dideoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, análogos de ribonucleótidos, nucleótidos marcados con pigmento, la modulación de la actividad de 5'-nucleasa, la modulación de la actividad de 3'-nucleasa (o de corrección de errores), o similar. Una forma no modificada de la polimerasa preferentemente es una ADN polimerasa termoestable, tal como las ADN polimerasas de diversas bacterias termófilas, así como variantes funcionales de las mismas que presentan identidad de secuencias sustancial respecto a una polimerasa termoestable de tipo salvaje o natural. Entre dichas variantes pueden incluirse, por ejemplo, ADN polimerasas quiméricas tales como, por ejemplo, las ADN polimerasas quiméricas indicadas en la patente US nº 6.228.628 y en la solicitud publicada de patente US nº 2004/0005599. En determinadas realizaciones, la forma no modificada de una polimerasa presenta actividad de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP).

La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a un enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad para llevar a cabo reacciones posteriores de extensión de cebador y no resulta irreversiblemente desnaturada (inactivada) tras someterla a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturar ácidos nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturación de los ácidos nucleicos son bien conocidas de la técnica y se ejemplifican en, por ejemplo, las patentes US nº 4.683.202, nº 4.683.195 y nº 4.965.188. Tal como se utiliza en la presente memoria, una polimerasa termoestable resulta adecuada para la utilización en una reacción de ciclado térmico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La expresión "desnaturación irreversible" para los fines de la presente memoria se refiere a una pérdida permanente y completa de la actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, "actividad enzimática" se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de la manera correcta para formar productos de extensión de cebador que son complementarios a una cadena molde de ácidos nucleicos. Entre las ADN polimerasas termoestables ejemplares no limitativas procedentes de bacterias termófilas se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus* especie Sps17, *Thermus* especies Z05, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosipho africanus*.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una proteína "quimérica" se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos representa un producto de fusión de subsecuencias de las secuencias de aminoácidos de por lo menos dos proteínas diferentes. Una proteína quimérica típicamente no se produce mediante manipulación directa de las secuencias de aminoácidos sino que, por el contrario, se expresa a partir de un gen "quimérico" que codifica la secuencia de aminoácidos quimérica. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una forma no modificada de una ADN polimerasa mutante de la presente invención es una proteína quimérica que consiste de una región aminoterminal (N-terminal) derivada de una ADN polimerasa de una especie de *Thermus* y una región carboxiterminal (C-terminal) derivada de la ADN polimerasa Tma. La región N-terminal se refiere a una región que se extiende entre el extremo N-terminal (posición aminoácida 1) y un aminoácido interno. De manera similar, la región C-terminal se refiere a una región que se extiende desde un aminoácido interno y el extremo C-terminal.

En el contexto de las ADN polimerasas mutantes, "correspondencia" con otra secuencia (por ejemplo regiones, fragmentos, posiciones de nucleótidos o aminoácidos, o similares) se basa en la convención de numerar las posiciones de los nucleótidos o aminoácidos y posteriormente alinear las secuencias de manera que se maximice el porcentaje de identidad de las secuencias. Debido a que no todas las posiciones dentro de una "región correspondiente" dada necesitan ser idénticas, las posiciones no correspondientes dentro de una región correspondiente pueden considerarse "posiciones correspondientes". De acuerdo con lo anteriormente expuesto, tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a una "posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido [X]" de una ADN polimerasa especificada se refiere a una colección de posiciones equivalentes en otras ADN polimerasas y homólogos y familias estructurales reconocidas. En realizaciones típicas de la presente invención, la "correspondencia" de posiciones de aminoácidos se determina con respecto a una región de la polimerasa que comprende el motivo de una secuencia de consenso (por ejemplo SEC ID nº 1), tal como se comenta en mayor detalle en la presente memoria.

El término "recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que ha sido modificada deliberadamente mediante métodos recombinantes. La expresión "ácido nucleico recombinante" en la presente memoria se refiere a un ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de un ácido nucleico por parte de endonucleasas, para

producir una forma no observada normalmente en la naturaleza. De esta manera, un ácido nucleico aislado de ADN polimerasa mutante, en una forma lineal, o un vector de expresión formando *in vitro* mediante el ligamiento de moléculas de ADN que normalmente no se encuentran unidas, se consideran ambas recombinantes para los fines de la presente invención. Se entiende que una vez se ha preparado un ácido nucleico recombinante y se ha reintroducido en una célula huésped, se replicará de manera no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped y no mediante manipulaciones *in vitro*; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez se han producido recombinantemente, aunque posteriormente se repliquen no recombinantemente, todavía se consideran recombinantes para los fines de la invención. Una "proteína recombinante" es una proteína generada utilizando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se ha ilustrado anteriormente. Una proteína recombinante se distingue típicamente de la proteína natural en por lo menos una característica.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a nucleótidos (por ejemplo ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos 2'-terminadores, dideoxinucleótidos, etc.) y polímeros (por ejemplo que comprenden ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, genes, ADNc, aptámeros, ácidos nucleicos antisentido, ARN interfirientes (ARNi), balizas moleculares, sondas de ácidos nucleicos, ácidos péptido-nucleicos (APN), conjugados APN-ADN, conjugados APN-ARN, etc.) que comprenden dichos nucleótidos unidos entre sí covalentemente, de manera lineal o ramificada.

Un ácido nucleico es típicamente de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, tal como se indica de manera genérica en la presente memoria, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage *et al.*, *Tetrahedron* 49(10):1925, 1993) y referencias citadas en la misma, Letsinger, J. *Org. Chem.* 35:3800, 1970; Sprinzl *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 81, 579, 1977; Letsinger *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14: 3487, 1986; Sawai *et al.*, *Chem. Lett.* 805, 1984; Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470, 1988; y Pauwels *et al.*, *Chemica Scripta* 26: 1419, 1986), fosforotioato (Mag *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:1437, 1991, y la patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321, 1989), enlaces O-metilfosforoamidita (ver Eckstein, *Oligonucleotides and Analogue: A Practical Approach*, Oxford University Press, 1992), y esqueletos y enlaces de ácido péptido-nucleico (ver Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895, 1992; Meier *et al.*, *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008, 1992; Nielsen, *Nature* 365:566, 1993; Carlsson *et al.*, *Nature* 380:207, 1996). Entre otros análogos de ácidos nucleicos se incluyen aquellos con esqueletos cargados positivamente (Denpcy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097, 1995), esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863; *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30: 423, 1991; Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470, 1988; Letsinger *et al.*, *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597, 1994; capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395, 1994; Jeffs *et al.*, *J. Biomolecular NMR* 34:17, 1994; *Tetrahedron Lett.* 37:743, 1996) y esqueletos no ribosídicos, incluyendo los indicados en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ed. Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos en la definición de ácidos nucleicos (ver Jenkins *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, páginas 169 a 176, 1995). También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls C. y E. *News*, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden llevarse a cabo para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como marcajes, o para alterar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en medios fisiológicos.

Además, de dichas bases heterocíclicas naturales que se observan típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), entre los análogos de ácidos nucleicos también se incluyen los que presentan bases heterocíclicas no naturales, muchas de las cuales se indican, o se hace referencia a ellas de otra manera, en la presente memoria. En particular, se describen en mayor detalle muchas bases no naturales en, por ejemplo, Seela *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 74:1790, 1991; Grein *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, 1994; y Seela *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 82:1640, 1999. A título ilustrativo adicional, se incluyen opcionalmente determinadas bases utilizadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión ( $T_f$ ). Por ejemplo, entre algunas de ellas se incluyen las 7-deazapurinas (por ejemplo 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.990.303. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina, derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina, 6-azacitosina, 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina, 5-yodocitosina, 5-bromocitosina, 5-metilcitosina, 5-propinilcitosina, 5-bromoviniluracilo, 5-fluorouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-bromouracilo, 5-trifluorometiluracilo, 5-metoximetiluracilo, 5-etiniluracilo, 5-propiniluracilo y similares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de identidad de secuencias" se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que la parte de la

secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa una base de ácidos nucleicos o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

Las expresiones "idénticas" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que presentan un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales (por ejemplo una identidad de 60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en una región especificada), al compararse y alinearse para la máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designada según se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí en el caso de que sean por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50% o por lo menos 55% idénticas. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos, o más típicamente en una región de 100 o 500 o 1.000 o más nucleótidos de longitud.

Las expresiones "similitud" o "porcentaje de similitud" en el contexto de dos o más secuencias de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que presentan un porcentaje especificado de residuos aminoácidos que son iguales o similares según definen las sustituciones conservadoras de aminoácidos (por ejemplo una similitud de 60%, opcionalmente similares al 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en una región especificada), al compararse y alinearse para la máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designada según se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguiente, o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí en el caso de que sean por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50% o por lo menos 55% similares entre sí. Opcionalmente, esta similitud existe en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos, o más típicamente en una región de por lo menos aproximadamente 100 a 500 o 1.000 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación entre secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con las que se comparan las secuencias de ensayo. Al utilizar un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se fijan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se fijan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Habitualmente se utilizan los parámetros por defecto del programa, o pueden fijarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades o similitudes de secuencia para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera de entre varias posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo que consiste de entre 20 y 600, habitualmente de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200, más habitualmente de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras la alineación óptima de las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1970), mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988), mediante implementaciones informatizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que resulta adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales han sido descritos en Altschul *et al.* (Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977), y en Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990), respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST se encuentra disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar las parejas de secuencias de alta puntuación (PSAP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta que corresponden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo estando alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos resultados iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas de PAP más largas que las contengan. Los resultados de palabras se extienden en

ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de premio para una pareja de residuos correspondientes, siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no correspondientes, siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene en el caso de que: la puntuación acumulada de alineación caiga en una cantidad X respecto al valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada vaya a cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuaciones negativas, o se alcance el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra de 3 y un valor esperado (E) de 10, y la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) alineaciones (B) de 50, valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza además un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produzca por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia en el caso de que la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo y el ácido nucleico de referencia sea inferior a aproximadamente 0,2, típicamente inferior a aproximadamente 0,01, y más típicamente inferior a aproximadamente 0,001.

Un "nucleósido" se refiere a un componente de los ácidos nucleicos que comprende una base o grupo básico (por ejemplo que comprende por lo menos un anillo homocíclico, por lo menos un anillo heterocíclico, por lo menos un grupo arilo y/o similar) unido covalentemente a una fracción sacárida (por ejemplo un azúcar ribosa, etc.), un derivado de una fracción sacárida, o un equivalente funcional de una fracción sacárida (por ejemplo un análogo tal como un anillo carbocíclico). Por ejemplo, en el caso de que un nucleósido incluya una fracción sacárida, la base típicamente se une a una posición 1' de dicha fracción sacárida. Tal como se ha indicado anteriormente, una base puede ser natural (por ejemplo una base purina, tal como adenina (A) o guanina (G), una base pirimidina, tal como timina (T), citosina (C) o uracilo (U)) o no natural (por ejemplo una base 7-deazapurina, una base pirazolo[3,4-d]pirimidina, una base propinil-dN, etc.). Entre los nucleósidos ejemplares se incluyen ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos, dideoxirribonucleósidos, nucleósidos carbocíclicos, etc.).

Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo un éster de fosfato de un nucleósido. Por ejemplo, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3 o más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de una fracción sacárida del nucleósido.

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos nucleótidos, típicamente más de tres nucleótidos, y más típicamente más de diez nucleótidos. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende generalmente de muchos factores, incluyendo la función última o utilización del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método tal como el método de fosfotriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; el método de triéster de Matteucci *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981; los métodos de síntesis automatizada, o el método de soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, u otros métodos conocidos de la técnica.

Un "ácido nucleico cebador" típicamente es un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico molde y permitir la extensión o elongación de cadena utilizando, por ejemplo, un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa termoestable, bajo condiciones de reacción apropiadas. Un ácido nucleico cebador típicamente es un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla, etc.). Aunque se utilizan opcionalmente otras longitudes de ácido nucleico cebador, típicamente presentan longitudes de entre 15 y 35 nucleótidos. Los ácidos nucleicos de cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos de molde. Un ácido nucleico cebador que es por lo menos parcialmente complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico molde típicamente resulta suficiente para hibridarse con el ácido nucleico molde para que pueda producirse la extensión. Un ácido nucleico cebador puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. A título ilustrativo, entre los marcajes se incluyen isótopos radioactivos, pigmentos fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (tales como los utilizados comúnmente en los ensayos de ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se

dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. Se describen adicionalmente en la presente memoria muchos de estos marcajes y otros marcajes y/o son conocidos de la técnica. Además, un ácido nucleico cebador puede proporcionar simplemente un sustrato para un biocatalizador incorporador de nucleótidos de una manera independiente del molde.

5 Un "ácido nucleico cebador extendido" se refiere a un ácido nucleico cebador al que se han añadido, o incorporado de otra manera (por ejemplo unido mediante enlace covalente), uno o más nucleótidos adicionales.

10 Un "ácido nucleico molde" se refiere a un ácido nucleico con el que puede hibridarse un ácido nucleico molde y extenderse. De acuerdo con lo anterior, entre los ácidos nucleicos molde se incluyen subsecuencias que son por lo menos parcialmente complementarias a los ácidos nucleicos cebadores. Los ácidos nucleicos molde pueden derivarse de esencialmente cualquier fuente. A título ilustrativo, los ácidos nucleicos molde se derivan o se aíslan opcionalmente a partir de, por ejemplo, microorganismos en cultivo, microorganismos no en cultivo, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, sueros agrupados o tejidos, asociaciones multiespecie, restos biológicos antiguos, fosilizados u otros no vivos, aislados medioambientales, suelos, aguas subterráneas, instalaciones de gestión de residuos, entornos de aguas profundas, o similares. Además, entre los ácidos nucleicos molde se incluyen opcionalmente o se derivan a partir de, por ejemplo, moléculas individuales de ADNc, juegos clonados de ADNc, bibliotecas de ADNc, ARN extraídos, ARN naturales, ARN transcritos *in vitro*, ADN genómicos caracterizados o no caracterizados, ADN genómicos clonados, bibliotecas de ADN genómico, ADN o ARN fragmentados enzimáticamente, ADN o ARN fragmentados químicamente, ADN o ARN fragmentados físicamente, o similares. Los ácidos nucleicos molde también pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas. Además, los ácidos nucleicos molde corresponden opcionalmente a por lo menos una parte de un gel o son complementarios al mismo. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "gen" se refiere a cualquier segmento de ADN asociado a una función biológica. De esta manera, entre los genes se incluyen secuencias codificantes y, opcionalmente, las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Entre los genes también se incluyen opcionalmente segmentos de ADN no expresado que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas.

25 Los ácidos nucleicos se "extienden" o se "elongan" al incorporar nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico es extendido opcionalmente por un biocatalizador incorporador de nucleótidos, tal como una polimerasa, que típicamente añade nucleótidos en el extremo 3'-terminal de un ácido nucleico.

30 Un "nucleótido extensible" se refiere a un nucleótido al que puede añadirse o unirse covalentemente por lo menos otro nucleótido, por ejemplo en una reacción catalizada por un biocatalizador incorporador de nucleótidos tras la incorporación del nucleótido extensible en un polímero de nucleótidos. Entre los ejemplos de nucleótidos extensibles se incluyen los desoxirribonucleótidos y los ribonucleótidos. Un nucleótido extensible típicamente se extiende mediante la adición de otro nucleótido en una posición 3' de la fracción sacárida del nucleótido extensible.

35 Un nucleótido "no extensible" se refiere a un nucleótido que, tras la incorporación en un ácido nucleico, impide la extensión posterior del ácido nucleico, por ejemplo por, como mínimo, un biocatalizador incorporador de nucleótidos. Un nucleótido no extensible ejemplar adecuado para la utilización con la invención son los nucleótidos terminadores 2'.

40 Un "nucleótido terminador 2'" se refiere a un análogo de nucleótido que comprende un grupo de bloqueo (GB) en la posición 2' de la fracción sacárida del nucleótido. Un "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo o fracción química que típicamente impide la extensión de un ácido nucleico (es decir, un nucleótido terminador 2' típicamente es no extensible por uno o más biocatalizadores incorporadores de nucleótidos). Es decir, tras la incorporación de un nucleótido terminador 2' en un ácido nucleico (por ejemplo en el extremo 3'-terminal del ácido nucleico), el grupo de bloqueo impide la extensión posterior del ácido nucleico por, como mínimo, el biocatalizador incorporador de nucleótidos seleccionado de entre una polimerasa CS5 G46E E678G, una polimerasa CS6 G46E E678G, una polimerasa  $\Delta$  ZO5R, una ADN polimerasa Taq E615G, una polimerasa de *Thermus flavus* TFL, una polimerasa TMA-25, una polimerasa TMA30, una ADN polimerasa Tth, una polimerasa SPS-17 de *Thermus*, una polimerasa Ta E615G, una polimerasa ZO5R de *Thermus*, una ADN polimerasa de T7, una ADN polimerasa I de Kornberg, una ADN polimerasa Klenow, una ADN polimerasa Taq, una ADN polimerasa microcócica, una ADN polimerasa alfa, una transcriptasa inversa, una transcriptasa inversa del AMV, una transcriptasa inversa del M-MuLV, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una ARN polimerasa de *E. coli*, una ARN polimerasa SP6, una ARN polimerasa T3, una ADN polimerasa T4, una ARN polimerasa de T7, una ARN polimerasa II, una transferasa terminal, una polinucleótido fosforilasa, una ADN polimerasa incorporadora de ribonucleótidos, y/o similares. Un grupo de bloqueo ejemplar es un grupo fosfato. En la presente memoria también se indican otros grupos de bloqueo representativos. Entre los nucleótidos terminadores 2' ejemplares se incluyen los nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-trifosfato y los nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-difosfato. Otros nucleótidos terminadores 2' también se describen en mayor detalle en la presente memoria y en, por ejemplo, las publicaciones de patente US nº 2007/0154914, nº 2005/0037991 y nº 2005/0037398.

Una "fracción" o "grupo" se refiere a una de las partes en las que algo, tal como una molécula, se divide (por ejemplo un grupo funcional, un grupo sustituyente, o similar). Por ejemplo, un nucleótido típicamente comprende un grupo básico (por ejemplo adenina, timina, citosina, guanina, uracilo o un grupo básico de análogo), una fracción sacárida (por ejemplo una fracción que comprende un anillo sacárido o un análogo del mismo) y uno o más grupos fosfato.

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se encuentre en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre posicionado de manera que facilite la traducción.

La expresión "célula huésped" se refiere a organismos unicelulares tanto procarióticos como eucarióticos (por ejemplo bacterias, levaduras y actinomicetos) y células individuales de plantas o animales de orden superior cultivados en cultivo celular.

El término "vector" se refiere a un trozo de ADN, típicamente de doble cadena, en el que puede haberse insertado un trozo de ADN foráneo. El vector puede ser, por ejemplo, de origen plasmídico. Los vectores contienen secuencias polinucleótidas de "replicón" que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula huésped. El ADN foráneo se define como ADN heterólogo, que es ADN no presente naturalmente en la célula huésped, que, por ejemplo, replica la molécula del vector, codifica un marcador seleccionable o cribable, o codifica para un transgén. El vector se utiliza para transportar el ADN foráneo o heterólogo al interior de una célula huésped adecuada. Una vez dentro de la célula huésped, el vector puede replicarse independientemente o concurrentemente con el ADN cromosómico del huésped, y pueden generarse varias copias del vector y su ADN insertado. Además, el vector puede contener además los elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado para formar una molécula de ARNm o de otro modo provocar la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión adicionalmente contienen elementos de secuencia contiguos al ADN insertado que incrementan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula de proteína. De esta manera, pueden sintetizarse rápidamente muchas moléculas de ARNm y del polipéptido codificado por el ADN insertado.

La expresión "tasa de extensión de ácidos nucleicos" se refiere a la tasa a la que un biocatalizador (por ejemplo un enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similar) extiende un ácido nucleico (por ejemplo un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente o independiente del molde mediante la unión (por ejemplo covalentemente) de uno o más nucleótidos al ácido nucleico. A título ilustrativo, determinadas ADN polimerasas mutantes descritas en la presente memoria presentan tasas de extensión de ácidos nucleicos mejoradas respecto a las formas no modificadas de dichas ADN polimerasas, de manera que pueden extender cebadores a tasas más altas que dichas formas no modificadas bajo un conjunto dado de condiciones de reacción.

Una "mezcla" se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes. Una "mezcla de reacción" se refiere a una mezcla que comprende moléculas que pueden participar y/o facilitar una reacción determinada. Por ejemplo, una "mezcla de reacción de secuenciación de ADN" se refiere a una mezcla de reacción que comprende los componentes necesarios para una reacción de secuenciación del ADN. De esta manera, una mezcla de reacción de secuenciación del ADN resulta adecuada para la utilización en un método de secuenciación del ADN para determinar la secuencia de ácidos nucleicos de un ácido nucleico molde o diana, aunque la mezcla de reacción inicialmente puede ser incompleta, de manera que el inicio de la reacción de secuenciación está controlada por el usuario. De esta manera, la reacción puede iniciarse después de la adición de un componente final, tal como el enzima, proporcionando una mezcla de reacción de secuenciación de ADN completa. Típicamente una reacción de secuenciación de ADN contendrá un tampón, adecuado para la actividad de polimerización, nucleótidos extensibles y por lo menos un nucleótido terminador 2'. La mezcla de reacción también puede contener un ácido nucleico cebador adecuado para la extensión en un ácido nucleico molde por parte de un enzima polimerasa. El ácido nucleico cebador o uno de los nucleótidos generalmente se marca con una fracción detectable, tal como un marcaje fluorescente. Generalmente, la reacción es una mezcla que comprende cuatro nucleótidos extensibles y por lo menos un nucleótido terminador 2'. Típicamente, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo una ADN polimerasa CS5 G46E E678G, una ADN polimerasa CS6 G46E E678G, una ADN polimerasa Taq E615G, una ADN polimerasa  $\Delta$  ZO5R, una ADN polimerasa CS5 G46E L329A E678G, etc.) y el nucleótido terminador 2' es un nucleósido 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-trifosfato.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### I. INTRODUCCION

La presente invención proporciona nuevas ADN polimerasas que presentan una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP). Las ADN polimerasas de la invención presentan la capacidad de

5 activar rápidamente y extender los cebadores que finalizan en un nucleótido terminador de extensión que debe escindirse mediante pirofosforólisis antes de que pueda extenderse el cebador. Típicamente deben optimizarse varios parámetros para cada pareja de cebadores utilizada en la reacción de PAP. Entre los parámetros comunes que típicamente se optimizan se incluyen la concentración de polimerasa, la concentración de PPI, el tiempo de extensión y la temperatura. Las nuevas ADN polimerasas de la presente invención pueden activar rápidamente una amplia diversidad de cebadores bloqueados en el caso de que se encuentren unidos a un molde perfectamente correspondiente sin los procedimientos de optimización necesarios con las polimerasas actualmente disponibles. Por lo tanto, las ADN polimerasas resultan útiles en una diversidad de aplicaciones que implican la extensión de cebadores o la amplificación de moldes polinucleótidos, incluyendo, por ejemplo, aplicaciones en estudios de ADN recombinante y el diagnóstico médico de enfermedades que implican la detección de alelos raros.

10 En la práctica de aspectos de la presente invención (por ejemplo produciendo enzimas modificados, llevando a cabo reacciones de amplificación, etc.), se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales en biología molecular y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I, II y III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames y Higgins); Transcription and Translation, 1984 (Hames y Higgins eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller y M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); and Methods in Enzymology Vol. 154 y Vol. 155 (Wu y Grossman, y Wu, editores, respectivamente).

## 25 II. ADN POLIMERASAS MODIFICADAS QUE PRESENTAN UNA CAPACIDAD DE PAP MEJORADA

Las ADN polimerasas de la invención comprenden el motivo de aminoácidos siguiente:

30 Arg-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Leu-Xaa-Xaa-Xaa\*-Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa (también denominado en la presente memoria en el código de una letra: R-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-K-L-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>\*-Y-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>), en el que X<sub>6</sub> es Ser (S) y la polimerasa presenta una tasa de extensión de ácidos nucleicos mejorada de un cebador bloqueado respecto a una ADN polimerasa de otro modo idéntica en la que X<sub>6</sub> es T.

35 En las ADN polimerasas de la invención, X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> y X<sub>7</sub>-X<sub>11</sub> son:  
 X<sub>1</sub> es Glu (E), Gln (Q), Gly (G), Lys (K) o Thr (T),  
 X<sub>2</sub> es Leu (L), Ile (I) o Tyr (Y),  
 X<sub>3</sub> es Thr (T), Met (M), Asp (D), Ser (S), Gly (G), Ala (A), Gln (Q) o Leu (L),  
 X<sub>4</sub> es Lys (K), Arg (R) o Gln (Q),  
 X<sub>5</sub> es Asn (N), Ser (S) o Gly (G),  
 40 X<sub>7</sub> es Val (V), Ile (I), Leu (L), Ala (A) o Thr (T),  
 X<sub>8</sub> es Asp (D) o Glu (E),  
 X<sub>9</sub> es Pro (P), Ala (A), Gly (G), Lys (K), Thr (T) o Ser (S),  
 X<sub>10</sub> es Leu (L) o Ile (I),  
 X<sub>11</sub> es Pro (P) o Leu (L).

45 Se dan a conocer realizaciones de SEC ID n° 1, en la que X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> y X<sub>7</sub>-X<sub>11</sub> son cualesquiera aminoácidos presentes en posiciones correspondientes en cualquier ADN polimerasa. Entre las ADN polimerasas ejemplares no limitativas se incluyen *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. Z05*, *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, *Hot Spring family B/clon 7*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Escheria coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus* y *Hot Spring family A*. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de Glu (E), Gln (Q), Gly (G), Lys (K) y Thr (T) (SEC ID n° 52). En algunas realizaciones, X<sub>3</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Thr (T), Met (M), Asp (D), Ser (S), Gly (G), Ala (A), Gln (Q) y Leu (L) (SEC ID n° 53). En algunas realizaciones, X<sub>7</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Val (V), Ile (I), Leu (L), Ala (A) y Thr (T) (SEC ID n° 54). En algunas realizaciones, X<sub>9</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Pro (P), Ala (A), Gly (G), Lys (K), Thr (T) y Ser (S) (SEC ID n° 55).

50 Se describen además ADN polimerasas que comprenden el motivo de aminoácidos siguiente:  
 Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa (también denominado en la presente memoria con el código de una letra: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-K-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>; (SEC ID n° 2), en la que X<sub>10</sub> no es T o A y la polimerasa presenta una tasa de extensión de ácidos nucleicos mejorada de un cebador bloqueado respecto a una ADN polimerasa de otro modo idéntica en la que X<sub>10</sub> es T o A.

- En algunas realizaciones, X<sub>1</sub>-X<sub>9</sub> y X<sub>11</sub>-X<sub>16</sub> son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones,  
 X<sub>1</sub> es R o L  
 X<sub>3</sub> es L, I o Y  
 X<sub>5</sub> es R o L  
 5 X<sub>6</sub> es I o se encuentra ausente  
 X<sub>7</sub> es G o se encuentra ausente  
 X<sub>8</sub> es K, R o Q  
 X<sub>9</sub> es N, S o G  
 10 X<sub>10</sub> es T o A  
 X<sub>11</sub> es Y o E  
 X<sub>13</sub> es D o E  
 X<sub>15</sub> es L, I o A  
 X<sub>16</sub> es P, L o W (SEC ID n° 40).
- 15 En algunas realizaciones de dichas ADN polimerasas, el aminoácido en la posición X<sub>10</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de (G), (L), (M), (F), (W), (K), (Q), (E), (S), (P), (V), (I), (C), (Y), (H), (R), (N) y (D) (SEC ID n° 42). En algunas realizaciones, X<sub>10</sub> es S (SEC ID n° 43).
- 20 En algunas realizaciones de SEC ID n° 2, X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>12</sub> y X<sub>14</sub> son cualesquiera aminoácidos presentes en posiciones correspondientes en cualquier ADN polimerasa, por ejemplo ADN polimerasas de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. Z05*, *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, *Hot Spring family B1clone 7*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Escheria coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Hot Spring family A* y bacteriófago T7.
- 25 En algunas realizaciones, X<sub>2</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Glu (E), Gln (Q), Gly (G), Lys (K), Thr (T), y Met (M) (SEC ID n° 56). En algunas realizaciones, X<sub>4</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Thr (T), Met (M), Asp (D), Ser (S), Gly (G), Ala (A), Gln (Q) y Leu (L) (SEC ID n° 57). En algunas realizaciones, X<sub>12</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Val (V), Ile (I), Leu (L), Ala (A), Thr (T) y Gly (G) (SEC ID n° 58). En algunas realizaciones, X<sub>14</sub> se selecciona de entre el grupo de entre Pro (P), Ala (A), Gly (G), Lys (K), Thr (T) y Ser (S) (SEC ID n° 59).
- 30 Una forma no modificada de ADN polimerasas que puede mutar (tal como se muestra en, por ejemplo, SEC ID n° 24) también descrita es aquella que presenta un dominio de polimerasa funcional que comprende el motivo de aminoácidos siguiente:  
 R-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-K-L-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-Y-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEC ID n° 24), en el que X<sub>6</sub> es T.
- 35 En algunas realizaciones, X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> y X<sub>7</sub>-X<sub>11</sub> son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones,  
 X<sub>2</sub> es L, I o Y  
 X<sub>4</sub> es K, R o Q  
 X<sub>5</sub> es N, S o G  
 40 X<sub>6</sub> es T  
 X<sub>8</sub> es D o E  
 X<sub>10</sub> es L o I  
 X<sub>11</sub> es P o L (SEC ID n° 44).
- 45 En algunas realizaciones, la forma no modificada de ADN polimerasas que puede mutar (tal como se muestra en, por ejemplo, SEC ID n° 25) es aquella que presenta un dominio de polimerasa funcional que comprende el motivo de aminoácidos siguiente:  
 X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-K-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>, en el que X<sub>10</sub> es T o A.
- 50 En algunas realizaciones, X<sub>1</sub>-X<sub>9</sub> y X<sub>11</sub>-X<sub>16</sub> son cualquier aminoácido.
- En algunas realizaciones,  
 X<sub>1</sub> es R o L  
 X<sub>3</sub> es L, I o Y  
 55 X<sub>5</sub> es R o L  
 X<sub>6</sub> es I o se encuentra ausente X<sub>7</sub> es G o se encuentra ausente  
 X<sub>8</sub> es K, R o Q  
 X<sub>9</sub> es N, S o G  
 60 X<sub>10</sub> es T o A  
 X<sub>11</sub> es Y o E  
 X<sub>13</sub> es D o E  
 X<sub>15</sub> es L, I o A  
 X<sub>16</sub> es P, L o W (SEC ID n° 48).

Los motivos presentados anteriormente (por ejemplo SEC ID n° 24 y SEC ID n° 25) se encuentran presentes dentro del subdominio 3/A de muchas ADN polimerasas dependientes de ADN de tipo familia A, en particular ADN polimerasas termoestables de bacterias termofílicas (SEC ID n° 24) y del bacteriófago T7 (SEC ID n° 25). Por ejemplo, la figura 1 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del subdominio 3/A de varias especies de bacterias: *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. Z05*, *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, *Hot Spring family B/clon 7*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Escheria coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Hot Spring family A* y bacteriófago T7. La alineación de secuencias de aminoácidos mostrada en la figura 1 incluye además ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas. Tal como se muestra, el motivo en SEC ID n° 24 y SEC ID n° 25 se encuentra presente en cada una de dichas polimerasas, indicando una función conservada de esta región de la polimerasa.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la forma no modificada de la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de tipo salvaje o natural, tal como, por ejemplo, una polimerasa seleccionada de entre cualquiera de las especies de bacterias listadas anteriormente. En algunas realizaciones de la invención, la polimerasa es de una especie del género *Thermus*. En otras realizaciones de la invención, la polimerasa no modificada es de una especie termofílica diferente de *Thermus*. La secuencia completa de ácidos nucleicos y de aminoácidos de numerosas ADN polimerasas termoestables se encuentra fácilmente disponible para el experto en la materia. Por ejemplo, las secuencias de cada una de las polimerasas de las especies *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus* especie Z05, *Thermus* especie sps17, *Thermotoga maritima* (Tma) y *Thermosipho africanus* (Taf) han sido publicadas en la publicación de patente internacional PCT n° WO 92/06200. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermus flavus* ha sido publicada en Akhmetzjanov y Vakhitov (Nucleic Acids Research 20:5839, 1992). La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus caldophilus* se encuentra en EMBL/GenBank n° de acceso U62584. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* puede recuperarse del depósito de la ATCC n° 42380 utilizando, por ejemplo, los métodos proporcionados en la patente US n° 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la misma. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana* es de la base de datos de patentes de GeneSeq n° de acceso R98144 y solicitud de patente PCT n° WO 97/09451. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Bacillus caldotenax* se describe en, por ejemplo, Uemori *et al.*, (J Biochem (Tokyo) 113(3):401-410, 1993; ver también el n° de acceso Q04957 de la base de datos Swiss-Prot y los n° de acceso de GenBank D12982 y BAA02361). La secuencia de la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* ha sido publicada en la patente US n° 6.066.483. También se describen ejemplos de formas no modificadas de ADN polimerasas que pueden modificarse tal como se indica en la presente memoria en, por ejemplo, las patentes US n° 6.228.628, n° 6.346.379, n° 7.030.220, n° 6.881.559, n° 6.794.177 y n° 6.468.775, y las solicitudes de patente US n° 2004/0005599; 2002/0012970; 2006/0078928 y 20040115639.

En algunas realizaciones, la forma no modificada de una polimerasa es una ADN polimerasa funcional que ha sido previamente mutada (por ejemplo mediante sustitución, adición o delección de aminoácidos), con la condición de que la polimerasa previamente mutada conserve el motivo de aminoácidos de SEC ID n° 24 o n° 25. De esta manera, las ADN polimerasas no modificadas adecuadas también incluyen variantes funcionales de polimerasas de tipo salvaje o naturales. Dichas variantes típicamente presentan una identidad o similitud de secuencias sustancial respecto a la polimerasa de tipo salvaje o natural, típicamente una identidad de secuencias de por lo menos 80%, y más típicamente una identidad de secuencias de por lo menos 90%, 95% o 98%. En determinadas realizaciones, la ADN polimerasa no modificada presenta una capacidad de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP).

Entre las polimerasas adecuadas se incluyen además, por ejemplo, determinadas ADN polimerasas quiméricas que comprenden regiones polipeptídicas de dos o más enzimas. Se describen ejemplos de dichas ADN polimerasas quiméricas en, por ejemplo, la patente US n° 6.228.628. Resultan particularmente adecuadas las ADN polimerasas de familia CS quiméricas, que incluyen las polimerasas CS5 (SEC ID n° 20) y CS6 (SEC ID n° 21) y variantes de las mismas que presentan una identidad o similitud de secuencias sustancial con la SEC ID n° 20 o la SEC ID n° 21 (típicamente una identidad de secuencia de por lo menos 80% y más típicamente de por lo menos 90%). Las ADN polimerasas CS5 y CS6 son enzimas quiméricas derivadas de las ADN polimerasas de *Thermus sp Z05* y de *Thermotoga maritima* (Tma). Comprenden el dominio N-terminal de nucleasa 5' del enzima de *Thermus* y la exonucleasa 3'-5' C-terminal y los dominios de polimerasa del enzima Tma. Estos enzimas presentan una actividad de transcriptasa inversa eficiente, pueden extender cebadores que contienen análogos de nucleótidos y pueden incorporar dNTP, dUTP, dITP alfa-fosforotioato y también dNTP marcados con pigmentos de la familia de la fluoresceína y la cianina. Las polimerasas CS5 y CS6 también son enzimas de PCR activados por Mg<sup>2+</sup> eficientes. Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las polimerasas CS5 y CS6 se proporcionan en las figuras 2B y 3B, respectivamente. Las polimerasas quiméricas CS5 y CS6 se describen adicionalmente en, por ejemplo, la publicación de patente US n° 2004/0005599.

En algunas realizaciones, la forma no modificada de la ADN polimerasa es una polimerasa que ha sido previamente mutada, típicamente por medios recombinantes, para conferir cierta ventaja selectiva. Entre dichas modificaciones

se incluyen, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos G46E, L329A y/o E678G en la ADN polimerasa CS5, la ADN polimerasa CS6 o la mutación o mutaciones correspondientes en otras polimerasas. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la forma no modificada de la ADN polimerasa es una de las siguientes (cada una presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 20 o SEC ID n° 21, excepto por la sustitución o sustituciones designadas): G46E, G46E L329A, G46E E678G ó G46E L329A E678G. La sustitución E678G, por ejemplo, permite la incorporación de ribonucleótidos y otros nucleótidos modificados 2', aunque esta mutación aparentemente también resulta en una capacidad alterada de extender moldes cebados. En determinadas realizaciones, las mutaciones según la presente invención, que resultan en una tasa de extensión más rápida de la polimerasa mutante, mejoran la capacidad alterada de la mutación de E678G de extender moldes cebados.

La forma modificada de las ADN polimerasas también dada a conocer comprende una o más sustituciones de aminoácidos respecto a la forma no modificada de la polimerasa, es decir, en la posición X<sub>6</sub> de SEC ID n° 24 o X<sub>10</sub> de SEC ID n° 25. La sustitución de aminoácidos en esta posición confiere una capacidad de PAP mejorada que rinde una ADN polimerasa con una tasa de extensión de ácidos nucleicos mejorada (es decir, más rápida) comparado con la de la ADN polimerasa correspondiente que, de otra manera, es idéntica excepto por la inclusión de una T en la posición X<sub>6</sub> de SEC ID n° 24 o de una T o A en la posición X<sub>10</sub> de SEC ID n° 25.

Debido a que las formas no modificadas de ADN polimerasa son únicas, la posición de aminoácido correspondiente a X<sub>6</sub> de SEC ID n° 24 o X<sub>10</sub> de SEC ID n° 25 típicamente es diferente para cada polimerasa mutante. Los programas de alineación de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos se encuentran disponibles fácilmente (ver, por ejemplo, los indicados *supra*) y, dados los motivos particulares identificados en la presente memoria, sirven para ayudar en la identificación de los aminoácidos exactos (y codones correspondientes) para la modificación según la presente invención. Las posiciones correspondientes a X<sub>6</sub> de SEC ID n° 24 o X<sub>10</sub> de SEC ID n° 25 se muestran en la Tabla 1 de ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas y ADN polimerasas termoestables de especies termofílicas ejemplares.

Tabla 1. Posiciones de aminoácidos correspondientes a la posición de motivo X<sub>6</sub> de SEC ID n° 1 o 24 o X<sub>10</sub> de SEC ID n 2 o en las polimerasas termoestables ejemplares.

Organismo o secuencia quimérica	Posición X <sub>6</sub> (SEC ID n° 1 y n° 24) o X <sub>10</sub> (SEC ID n° 2 y n° 25)
De consenso	
<i>T. thermophilus</i>	546
<i>T. caldophilus</i>	546
<i>T. sp. Z05</i>	546
<i>T. aquaticus</i>	544
<i>T. flavus</i>	543
<i>T. filiformis</i>	542
<i>T. sp. Spas17</i>	542
<i>D. radiodurans</i>	634
<i>Hot Spring family B1 clone 7</i>	592
<i>B. stearothermophilus</i>	586
<i>B. caldotenax</i>	587
<i>E. coli</i>	639
<i>T. maritime</i>	606
<i>T. neapolitana</i>	606
<i>T. africanus</i>	605
<i>Hot Spring family A</i>	643
CS5	606
Bacteriófago T7	400

Tal como se ha comentado anteriormente, en algunas realizaciones, la ADN polimerasa mutante de la presente invención se deriva de la ADN polimerasa CS5 (SEC ID n° 20) o una variante de dicha polimerasa (por ejemplo G46E, G46E L329A, G46E E678G, G46E L329A E678G y similares). Tal como se ha indicado anteriormente, en la ADN polimerasa CS5, la posición mutable X<sub>6</sub> corresponde a Thr (T) en la posición 606. De esta manera, en determinadas variaciones de la invención, la forma modificada de la polimerasa comprende una sustitución de aminoácidos en la posición X<sub>6</sub>, respecto a una ADN polimerasa CS5 que, de otro modo, es idéntica. Entre los mutantes de ADN polimerasa CS5 modificada ejemplares se incluyen aquellos que comprenden la sustitución de aminoácidos T606S.

Entre otros mutantes de ADN polimerasa CS5 modificada ejemplares se incluyen los siguientes (presentando, cada uno, la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 20 excepto por las sustituciones indicadas):

G46E **T606S**,  
 G46E L329A **T606S**,  
 G46E **T606S** E678G,  
 L329A **T606S** E678G,  
 G46E L329A **T606S** E678G, y similares.

5

#### A. Método para determinar la tasa relativa de extensión de un cebador bloqueado

10 Con el fin de determinar si una ADN polimerasa modificada (o mutante) de la invención presenta una tasa mejorada de activación de los cebadores bloqueados con 2'-PO<sub>4</sub>, se llevó a cabo un ensayo de extensión. En algunas realizaciones del ensayo de extensión, se substituyó un sustrato oligo dúplex pre-hibridado por un molde M13 cebado. En algunas realizaciones, la cadena del cebador presenta la secuencia: CGCCTGGTCTGTACACCGTTCE (SEC ID n° 34), en la que E=2'PO<sub>4</sub>-dA, y la cadena de molde presenta la secuencia: CAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTQTACAQACCAQCGCP (SEC ID n° 35), en la que Q=7-deaza-dG y P=3' PO<sub>4</sub>. Los residuos de 7-deaza-dG en la cadena de molde resultan en una fluorescencia de fondo reducida. En algunas realizaciones, el oligo dúplex se añade a la mezcla de reacción (pirofosfato 0,5 mM, tricina 100 mM, pH 8,0, KOAc 20 mM, Mg(OAc)<sub>2</sub> 3 mM, tampón de almacenamiento de enzima al 2,5%, 1X SYBR verde I (Molecular Probes) y 0,1 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (el "tampón de almacenamiento de enzima" está compuesto de Tris 20 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,5% y glicerol al 50% v/v) a 100 nM. La tasa a la que las ADN polimerasas son capaces de activar el cebador bloqueado se estima a partir de la tasa de cambio de la fluorescencia, tras restar el fondo. Con el fin de distinguir la fluorescencia derivada de la extensión respecto de la fluorescencia de fondo, se incluyeron pocillos paralelos en el experimento en los que se había bloqueado la extensión de la cadena de cebador omitiendo los nucleótidos de la mezcla maestra de reacción. Para cada polimerasa de la invención, puede estimarse la actividad a partir de la tasa de incremento de la fluorescencia, tras restar el fondo, y después compararse con la actividad en un molde M13. La proporción entre estas dos tasas (para cada polimerasa) seguidamente se utiliza para determinar que ADN polimerasas modificadas (o mutantes) presentan una actividad de activación de cebador bloqueado con 2'-PO<sub>4</sub> relativamente elevada. Dicho ensayo se describe en mayor detalle en el Ejemplo 1.

10

15

20

25

30

35

Con el fin de determinar si una ADN polimerasa modificada en la que X<sub>6</sub> no es T (SEC ID n° 1) o X<sub>10</sub> no es T o A (SEC ID n° 2) presenta una capacidad mejorada de extender un cebador bloqueado respecto a una ADN polimerasa de otro modo idéntica en la que X<sub>6</sub> es T (SEC ID n° 24) o X<sub>10</sub> es T o A (SEC ID n° 25), se llevó a cabo PAP-PCR con un sistema modelo que utiliza M13mp18 como molde. Los cebadores para la utilización con el sistema modelo presentan las secuencias:

KAB77: CGCCTGGTCTGTACACCGTTCE (SEC ID n° 26), en la que E=2'PO<sub>4</sub>-dA, y  
 KAB71: GGAACGAGGGTAGCAACGGCTACE (SEC ID n° 27), en la que E=2'PO<sub>4</sub>-dA.

40

Conjuntamente los cebadores se espera que generen un amplicón de 342 pb a partir del M13 molde. Observar que ambos cebadores se encuentran bloqueados con un grupo 2'-PO<sub>4</sub> en el extremo 3' y no pueden extenderse hasta que ese grupo sea eliminado mediante pirofosforólisis del residuo dA terminal. Las observaciones anteriores indican que la tasa de activación mediante pirofosforólisis de diferentes cebadores bloqueadores con 2'-PO<sub>4</sub> varía y que la activación de KAB77 es relativamente lenta, requiriendo tiempos de extensión prolongados, de hasta 5 minutos en la PCR para conseguir una amplificación eficiente.

45

50

Las condiciones de reacción utilizados para someter a ensayo las polimerasas eran: tricina 50 mM (pH 7,5), KOAc 80 mM (pH 7,5), tampón de almacenamiento de enzima al 2,5% v/v + Tween-20 al 0,5%, 0,2X SYBR verde I (de solución 20X en DMSO), glicerol al 5% v/v, dNTP 0,2 mM de cada d(AGC)TP y 0,4 mM dUTP, 0,02 U/ml de UNG, Mg(OAc)<sub>2</sub> 2,75 mM, pirofosfato 0,2 mM, ADN polimerasa 10 nM, 1E5 copia ADN de M13mp18/20 ml de reacción y 0,2 mM de cada cebador KAB77/KAB71. La composición del "tampón de almacenamiento de enzima" es: Tris 20 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,5% y glicerol al 50% v/v.

55

La mezcla de reacción anteriormente indicada puede modificarse. Entre las variaciones no limitativas pueden incluirse, por ejemplo, la concentración de KOAc de entre 20 y 120 mM, la concentración de pirofosfato de entre 0,15 y 0,3 mM y una concentración de Mg(OAc)<sub>2</sub> de entre 2 y 4 mM. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Las condiciones de ciclado son: 2 minutos a 50°C (para permitir la esterilización de UNG), 92°C durante 1 minuto, seguido de 46 ciclos de: desnaturalización a 92°C durante 15 segundos, seguido de la hibridación/extensión a 62°C durante 35 segundos.

60

A continuación se detectó la formación de amplicones a partir de la fluorescencia relativa incrementada, utilizando las condiciones proporcionadas anteriormente. En el caso de que se utilicen polimerasas con activación eficiente de los cebadores bloqueados, se producirá la detección del amplicón en ciclos anteriores que con polimerasas

ineficientes. Puede utilizarse el análisis en gel de agarosa para verificar que el amplicón de 342 pb esperado es el único producto detectable generado bajo dichas condiciones.

5 En algunas realizaciones, la tasa a la que las ADN polimerasas son capaces de activar el cebador bloqueado se estima a partir de la tasa de cambio de la fluorescencia, tras restar el fondo. Con el fin de distinguir la fluorescencia derivada de la extensión respecto de la fluorescencia de fondo, se incluyeron pocillos paralelos en el experimento en los que se había bloqueado la extensión de la cadena de cebador omitiendo los nucleótidos de la mezcla maestra de reacción. Para cada polimerasa modificada o mutante de la invención, puede estimarse la actividad a partir de la tasa de incremento de la fluorescencia, tras restar el fondo, y después compararse con la tasa de una ADN polimerasa de otro modo idéntica utilizando las mismas condiciones de reacción.

#### B. Métodos para modificar o mutar las ADN polimerasas

15 La producción de los enzimas modificados o mutantes con capacidad de PAP mejorada u otras propiedades deseadas puede conseguirse mediante diversos procedimientos, incluyendo, por ejemplo, la mutagénesis dirigida a sitio, la modificación química, etc. Más concretamente, la mutagénesis dirigida a sitio se consigue generalmente mediante mutagénesis dirigida por cebador específica de sitio. Dicha técnica típicamente se lleva a cabo utilizando un cebador oligonucleotídico sintético complementario a un fago de ADN de cadena sencilla que debe mutagenizarse excepto por una no correspondencia limitada que representa la mutación deseada. Brevemente, se utiliza el oligonucleotídico sintético como cebador para dirigir la síntesis de una cadena complementaria al plásmido o fago, y el ADN de doble cadena resultante se transforma en una bacteria huésped de soporte a fago. Las bacterias resultantes pueden someterse a ensayo mediante, por ejemplo, análisis de secuencias de ADN o hibridación de sondas con el fin de identificar aquellas placas que portan la secuencia génica mutada que se desea. En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la forma no modificada de la polimerasa pueden mutarse mediante una diversidad de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky editores, 1995, Academic Press, San Diego, CA), capítulo 14; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

30 A título de ejemplo no limitativo, el sistema de dos cebadores, utilizado en el kit de mutagénesis dirigida a sitio Transformer de Clontech, puede utilizarse para introducir mutantes dirigidos a sitio en un polinucleótido codificante de una forma no modificada de la polimerasa. Tras la desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores con el plásmido: uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida a sitio deseada; el otro contiene una mutación en otro punto en el plásmido que resulta en la eliminación de un sitio de restricción. A continuación, se lleva a cabo la síntesis de segunda cadena, ligando estrechamente dichas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de *E. coli*. Se aísla el ADN plasmídico a partir de las bacterias transformadas, cortadas con el enzima de restricción relevante (linearizando de esta manera los plásmidos no mutados) y después se transforma nuevamente en *E. coli*. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin la necesidad de subclonación o la generación de fagémidos de cadena sencilla. El ligamiento estrecho de las dos mutaciones y la posterior linearización de plásmidos no mutados resulta en una elevada eficiencia de mutación y permite un cribado mínimo. Tras la síntesis del cebador inicial de sitio de restricción, este método requiere la utilización de únicamente un nuevo tipo de cebador por cada sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, puede sintetizarse un juego de cebadores oligonucleotídicos "diseñados degenerados" con el fin de introducir todas las mutaciones deseadas en un sitio dado simultáneamente. Los transformantes pueden cribarse mediante secuenciación del ADN plasmídico pasando por la región mutagenizada con el fin de identificar y separar los clones mutantes. Cada ADN mutante seguidamente puede cortarse y analizarse mediante electroforesis, tal como, por ejemplo, en un gel Mutation Detection Enhancement gel [gel de detección mejorada de mutaciones] (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) para confirmar que no se han producido otras alteraciones en la secuencia (mediante comparación del desplazamiento de las bandas con el control no mutagenizado). Alternativamente, puede secuenciarse la región de ADN entera para confirmar que no se han producido sucesos de mutación adicionales en el exterior de la región diana.

55 Los dúplex mutantes verificados en vectores de sobreexpresión pET (u otro) pueden utilizarse para transformar *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, para la producción de nivel elevado de la proteína mutante y la purificación mediante protocolos estándares. El método de mapeado FAB-MS, por ejemplo, puede utilizarse para comprobar rápidamente la fidelidad de la expresión del mutante. Esta técnica permite la secuenciación de segmentos de toda la proteína y proporciona la confianza necesaria en la asignación de las secuencias. En un experimento de mapeado de este tipo, se digirió la proteína con una proteasa (la elección dependerá de la región específica que debe modificarse, ya que este segmento es de gran interés y el mapa restante debería ser idéntico al mapa de la proteína no mutagenizada). El juego de fragmentos cortables se fracciona mediante, por ejemplo, HPLC microbore (de fase inversa o de intercambio iónico, nuevamente según la región específica que debe modificarse) para proporcionar varios péptidos en cada fracción y se determinan los

pesos moleculares de los péptidos mediante métodos estándares, tales como FAB-EM. A continuación, se compara la masa determinada de cada fragmento con los pesos moleculares de los péptidos esperados de la digestión de la secuencia predicha y se determina rápidamente la corrección de la secuencia. Debido a que este enfoque de mutagénesis a la modificación de proteínas es dirigido, la secuenciación del péptido alterado no debería resultar necesaria en el caso de que los datos de la EM concuerden con la predicción. En caso de que resulte necesario para verificar un residuo modificado, puede utilizarse la EM/EM-CAD en tándem para secuenciar los péptidos de la mezcla en cuestión, o puede purificarse el péptido diana para degradación de Edman subtractiva o digestión con carboxipeptidasa Y, según la localización de la modificación.

### 10 C. Vectores de expresión y células huésped

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la invención proporciona además ácidos nucleicos recombinantes codificantes de cualquiera de las ADN polimerasas indicadas en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención comprende un vector que presenta un ácido nucleico codificante de una ADN polimerasa dada a conocer en la presente memoria. Cualquier vector que contenga replicón y secuencias de control que se derivan de una especie compatible con la célula huésped puede utilizarse en la práctica de la invención. Generalmente, entre los vectores de expresión se incluyen regiones de ácidos nucleicos reguladoras de la transcripción y de la traducción operablemente ligadas con el ácido nucleico codificante de la ADN polimerasa mutante. La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariontes se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Además, el vector puede contener un elemento retrorregulador positivo (ERP) para incrementar la semivida del ARNm transcrito (ver Gelfand *et al.*, patente US nº 4.666.848). Las regiones de ácidos nucleicos reguladoras de transcripción y traducción generalmente resultarán apropiadas para la célula huésped utilizada para expresar la polimerasa. Se conocen de la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados, y secuencias reguladoras adecuadas, para una diversidad de células huésped. En general, entre las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluirse, por ejemplo, secuencias de promotor, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y parada transcripcional, secuencias de inicio y parada traduccional y secuencias intensificadoras o activadoras. En realizaciones típicas, entre las secuencias reguladoras se incluyen un promotor y secuencias de inicio y parada transcripcional. Entre los vectores típicamente también se incluye una región policonectora que contiene varios sitios de restricción para la inserción de ADN foráneo. En determinadas realizaciones, se utilizan "señalizadores de fusión" para facilitar la purificación y, si se desea, la eliminación posterior de la secuencia de etiqueta/señalizadora, por ejemplo una "etiqueta de His". Sin embargo, éstas generalmente no resultan necesarias al purificar una proteína termoactiva y/o termoestable a partir de un huésped mesofílico (por ejemplo *E. coli*), en el que puede utilizarse una "etapa térmica". La construcción de vectores adecuados que contiene ADN codificante de secuencias replicación, secuencias reguladoras, genes de selección fenotípica y las polimerasas mutantes de interés se prepara utilizando procedimientos estándares de ADN recombinante. Los plásmidos aislados, vectores víricos y fragmentos de ADN se corta, adaptan y ligan entre sí en un orden específico para generar los vectores deseados, tal como es bien conocido de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, 2a ed. 1989)).

En determinadas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes de selección son bien conocidos de la técnica y varían según la célula huésped utilizada. Entre los genes de selección adecuados pueden incluirse, por ejemplo, genes codificantes de la resistencia a ampicilina y/o a tetraciclina, que permite que las células transformadas con estos vectores crezcan en presencia de estos antibióticos.

En un aspecto de la presente invención, se introduce en una célula un ácido nucleico codificante de una ADN polimerasa, solo o en combinación con un vector. Por "se introduce en" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se hace referencia a que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la integración, amplificación y/o expresión posteriores del ácido nucleico. El método de introducción está dictado en gran medida por el tipo celular diana. Entre los métodos ejemplares se incluyen la precipitación con CaPO<sub>4</sub>, la fusión de liposomas, Lipofectin®, la electroporación, la infección vírica y similares.

Típicamente se utilizan procariontes como células huésped para las etapas de clonación iniciales de la presente invención. Resultan particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la producción de ADN molde de cadena sencilla utilizado para la mutagénesis dirigida a sitio, para el cribado de muchos mutantes simultáneamente y para la secuenciación de ADN de los mutantes generados. Entre las células huésped procariontes adecuadas se incluyen *E. coli* K12 cepa 94 (ATCC nº 31.446), *E. coli* cepa W3110 (ATCC nº 27.325), *E. coli* K12 cepa DG116 (ATCC nº 53.606), *E. coli* X1776 (ATCC nº 31.537) y *E. coli* B; sin embargo, pueden utilizarse como huéspedes muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539 y muchas otras especies y géneros de procariontes, incluyendo bacilos tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacteriáceas tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas*.

5 Las células huésped procarióticas u otras células huésped con paredes celulares rígidas se transforman típicamente utilizando el método de cloruro de calcio tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *supra*. Alternativamente, puede utilizarse la electroporación para la transformación de estas células. Las técnicas de transformación de procariotas se describen en, por ejemplo, Dower, en Genetic Engineering, Principles and Methods 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan *et al.*, Meth. Enzymol. 204:63, 1991. Entre los plásmidos utilizados típicamente para la transformación de *E. coli* se incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pUC18, pUC119 y Bluescript M13, la totalidad de los cuales se describe en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook *et al.*, *supra*. Sin embargo, también se encuentran disponibles otros muchos vectores adecuados.

10 Las ADN polimerasas de la presente invención típicamente se producen mediante cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico codificante de la ADN polimerasa, bajo condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la ADN polimerasa mutante. Los métodos de cultivo de células huésped transformadas bajo condiciones adecuadas para la expresión de proteínas son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). Entre las células huésped adecuadas para la producción de las polimerasas mutantes a partir de vectores plasmídicos que contienen promotor lambda pL se incluyen *E. coli* cepa DG116 (ATCC n° 53606) (ver la patente US n° 5.079.352 y Lawyer F.C. *et al.*, PCR Methods and Applications 2:275-87, 1993). Tras la expresión, la polimerasa mutante puede ser recolectada y aislada. Los métodos para purificar la ADN polimerasa termoestable se describen en, por ejemplo, Lawyer *et al.*, *supra*.

20 Tras la purificación, la capacidad de las ADN polimerasas mutantes para extender los moldes cebadores puede someterse a ensayo en cualquiera de los diversos ensayos conocidos para medir la extensión. Por ejemplo, en presencia de moléculas de molde cebado (por ejemplo ADN de M13, etc.), un tampón apropiado, un juego completo de dNTP (por ejemplo dATP, dCTP, dGTP y dTTP) e iones metálicos, las ADN polimerasas extenderán los cebadores, convirtiendo el ADN de cadena sencilla (ADNcs) en ADN de doble cadena (ADNdc). Dicha conversión puede detectarse y cuantificarse mediante, por ejemplo, la adición de un pigmento de unión a ADNdc, tal como SYBR verde I. Utilizando un termociclador cinético (ver Watson *et al.*, Anal. Biochem. 329:58-67, 2004, y también disponible de, por ejemplo, Applied Biosystems, Stratagene y BioRad), pueden obtenerse imágenes digitales de placas de reacción (por ejemplo a intervalos de 10 a 30 segundos), permitiendo de esta manera el seguimiento del progreso de las reacciones. La cantidad de fluorescencia detectada puede convertirse fácilmente en tasas de extensión. Utilizando dichos ensayos rutinarios, pueden determinarse tasas de extensión de los mutantes respecto a las formas no modificadas de polimerasa.

### III. Mezclas de reacción

35 Las ADN polimerasas de la presente invención pueden utilizarse con cualquier fin en el que dicha actividad enzimática resulte necesaria o deseada. En algunas realizaciones, las polimerasas de la invención se utilizan en diversos métodos de extensión de cebador para la amplificación de un ácido nucleico diana. En determinadas realizaciones, los métodos de extensión de cebador implican la utilización de cebadores bloqueados, que requieren la eliminación del nucleótido 3' no extensible previamente a la extensión del cebador (por ejemplo PAP). Las condiciones adecuadas para la extensión de cebadores son conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). Ver también Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (4a ed., John Wiley & Sons 1999). Generalmente se hibrida un cebador con un ácido nucleico diana para formar un complejo de cebador-molde. El complejo de cebador-molde se pone en contacto con la ADN polimerasa mutante y nucleótidos libres en un medio adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos al extremo 3' del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido complementario al ácido nucleico diana. El cebador puede incluir, por ejemplo, uno o más análogos de nucleótido. Además, los nucleótidos pueden ser nucleótidos convencionales, nucleótidos no convencionales (por ejemplo ribonucleótidos o nucleótidos marcados) o una mezcla de los mismos. En algunas variaciones, la reacción de extensión de cebador comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. Las condiciones adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos utilizando una ADN polimerasa y una pareja de cebadores también son conocidas de la técnica (por ejemplo los métodos de amplificación por PCR) (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *supra*; PCR Applications: Protocols for Functional Genomics (Innis *et al.*, editores, Academic Press 1999)). En otras realizaciones no mutuamente excluyentes, la reacción de extensión de cebador comprende la transcripción inversa de un molde de ARN (por ejemplo RT-PCR). La utilización de las polimerasas mutantes modificadas de la presente invención (que proporcionan una tasa de extensión mejorada) proporcionan, por ejemplo, la capacidad de llevar a cabo reacciones de extensión de cebador con tiempos de incubación relativamente cortos, concentraciones reducidas de enzima y/o un rendimiento de producto incrementado.

60 La invención proporciona además muchas mezclas de reacción diferentes que pueden utilizarse en un amplio abanico de aplicaciones, particularmente en las que resulta deseable eliminar nucleótidos terminadores (por ejemplo nucleótidos terminadores 2') de ácidos nucleicos, la polimerización de nucleótidos y/o la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, por ejemplo, se utilizan mezclas de reacción para llevar a cabo ensayos homogéneos de amplificación/detección (por ejemplo el seguimiento de PCR en tiempo real) o la detección de

mutaciones o el genotipado de ácidos nucleicos. En determinadas realizaciones, se agrupan múltiples cebadores y/o sondas en mezclas de reacción para la utilización en aplicaciones que implican formatos multiplex. Muchas de estas aplicaciones se describen en mayor detalle posteriormente o se hace referencia de otra manera a ellas en la presente memoria.

Además de las ADN polimerasas descritas en la presente memoria, entre las mezclas de reacción generalmente también se incluyen diversos reactivos que resultan útiles para llevar a cabo, por ejemplo, PAP, la eliminación de nucleótidos terminadores de oligonucleótidos bloqueados (por ejemplo para producir oligonucleótidos activados o extensibles), la polimerización de nucleótidos, la amplificación de ácidos nucleicos y las reacciones de detección (por ejemplo el seguimiento mediante PCR en tiempo real o los ensayos de 5'-nucleasa) y similares. Entre los tipos ejemplares de estos otros reactivos se incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos de molde o diana (por ejemplo obtenidos o derivados de esencialmente cualquier fuente), pirofosfato, modificaciones de la emisión lumínica, tampones, sales, amplicones, glicerol, iones metálicos (por ejemplo  $Mg^{++}$ , etc.), dimetilsulfóxido (DMSO), poli-rA (por ejemplo como ácido nucleico portador para dianas de bajo número de copia), uracil-N-glucosilasa (UNG) (por ejemplo para la protección frente a la contaminación cruzada). En algunas aplicaciones relacionadas con PCR cinética, las mezclas de reacción incluyen además sondas que facilitan la detección de productos de amplificación. Entre los ejemplos de sondas utilizadas en dichos procedimientos se incluyen, por ejemplo, sondas de hibridación, sondas de 5'-nucleasa y/o sondas de horquilla. La amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como otros métodos, también se describen en mayor detalle posteriormente.

Las mezclas de reacción generalmente se producen mediante la combinación de nucleótidos, cebadores y/o sondas seleccionados, tal como se ha indicado anteriormente, con cantidades de los demás reactivos que resulten suficientes para llevar a cabo la aplicación particular que se ha seleccionado. Las cantidades de reactivos que deben incluirse en una mezcla de reacción dada resultarán evidentes para el experto en la materia a la vista del método seleccionado que debe llevarse a cabo.

#### IV. Métodos de utilización de las ADN polimerasas modificadas

La invención proporciona además métodos de utilización de las polimerasas modificadas descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, por ejemplo, se utilizan dichas polimerasas para llevar a cabo ensayos que implican la detección de ácidos nucleicos diana, por ejemplo para proporcionar información diagnóstica, genética u otra sobre sujetos de los que se derivan dichas dianas. Estos aspectos también se ilustran en los ejemplos proporcionados en la presente memoria.

Las polimerasas indicadas en la presente memoria se utilizan opcionalmente o se adaptan para la utilización en esencialmente cualquier aplicación que implique la eliminación de un nucleótido terminador del extremo 3' de un ácido nucleico, por ejemplo mediante el procedimiento de pirofosforólisis. Entre los ejemplos de tipos de aplicaciones relacionados con ácidos nucleicos se incluyen el análisis de la estructura y conformación de los ácidos nucleicos, los ensayos de PCR en tiempo real y la detección de polimorfismos de nucleótido único (PNU) (Myakishev *et al.*, *Genome Res* 11:163-169, 2001; Lee *et al.*, *Biotechniques* 27:342-349, 1999; Thelwell *et al.*, *Nucleic Acids Res* 28:3752-3761, 2000; Whitcombe *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 17:804-807, 1999, Heid *et al.*, *Genome Res.* 6:986-994, 1996; Nazarenko *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:2516-2521, 1997); la detección de la hibridación de ácidos nucleicos (Parkhurst *et al.*, *Biochemistry* 34:285-292, 1996; Tyagi *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14:303-308, 1996, Tyagi *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 16:49-53, 1998, Sixou *et al.*, *Nucleic Acids Res* 22:662-668, 1994; y Cardullo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8790-8794, 1988); los ensayos de extensión de cebador para la detección de mutaciones (Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10756-10761, 1997) y la secuencia automatizada del ADN (Woolley *et al.*, *Anal Chem* 67:3676-3680, 1995; Hung *et al.*, *Anal Biochem* 255:32-38, 1998; y Ju *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4347-4351, 1995). Los enzimas modificados también pueden utilizarse en diversos métodos de polimerización activada por pirofosforólisis tal como se indica en, por ejemplo, las patentes US nº 7.033.763, nº 6.534.269 y nº 7.238.480.

A título ilustrativo adicional, entre los ejemplos de tipos generales de tecnologías de análisis de ácidos nucleicos que pueden utilizarse o adaptarse para la utilización en el análisis de ácidos nucleicos diana en o procedentes de, por ejemplo, mezclas de reacción de la invención se incluyen diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Una característica común de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos es que típicamente se diseñan para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que son específicas del organismo que se detecta. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos presentan una mayor sensibilidad que otros enfoques de análisis de ácidos nucleicos. Esta sensibilidad, que se mejora adicionalmente utilizando las ADN polimerasas descritas en la presente memoria, típicamente es atribuible a su capacidad de producir una señal positiva a partir de tan solo una única copia de un complejo de cebador:molde perfectamente correspondiente. Entre los métodos de amplificación que se utilizan opcionalmente o se adaptan para la detección de ácidos nucleicos diana se incluyen, por ejemplo, diversos métodos de amplificación mediados por polimerasa, ligasa o transcriptasa inversa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y/o la PCR con transcripción inversa (RT-PCR). Puede encontrarse más información sobre la utilización de dichos métodos y otros métodos de amplificación y diversos

enfoques de preparación de muestras para dichos ensayos en cualquiera de entre una diversidad de textos estándares, incluyendo, por ejemplo, Berger, Sambrook, Ausubel 1 y 2, e Innis, *supra*.

5 Diversos ensayos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos que se adaptan opcionalmente para la utilización con los reactivos y métodos de la invención generalmente difieren en sus métodos de amplificación y en sus secuencias diana de ácidos nucleicos. Entre los ejemplos de dichos ensayos comerciales se incluyen ensayos de sondas de hibridación (por ejemplo utilizando el sistema LightCycler<sup>®</sup>) y los ensayos AMPLICOR<sup>®</sup> y COBAS AMPLICOR<sup>®</sup> (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), que utilizan reacciones en cadena de polimerasa (PCR), el ensayo LCx<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), que utiliza reacciones en cadena de ligasa (LCR); el ensayo BDProbeTec<sup>™</sup> ET (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA), que utiliza la amplificación por desplazamiento de cadena (ADC), y el ensayo APTIMA<sup>™</sup> (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA), que utiliza la amplificación mediada por la transcripción (AMT).

15 En determinadas realizaciones, se utilizan, por ejemplo, sondas 5'-nucleasa en diversas reacciones de 5'-nucleasa. Muchos ensayos de 5'-nucleasa son bien conocidos por el experto en la materia. También se describen ejemplos de dichas reacciones en las patentes US n° 6.214.979, n° 5.804.375, n° 5.487.972 y n° 5.210.015.

20 A modo de ilustración breve, en una reacción de 5'-nucleasa, se pone en contacto un ácido nucleico diana con un cebador y una sonda (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa) bajo condiciones en las que el cebador y la sonda se hibridan con una cadena del ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana, el cebador y la sonda también se ponen en contacto con una polimerasa de ácidos nucleicos que presenta actividad de 5' a 3' nucleasa. Las polimerasas de ácidos nucleicos que presentan actividad de 5' a 3' nucleasa pueden cortar la sonda hibridada con el ácido nucleico diana después del cebador. El extremo 3' del cebador proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa. La polimerasa unida corta fragmentos de la sonda al entrar en contacto con el extremo 5' de la sonda.

25 El cebador y la sonda pueden diseñarse de manera que se hibriden en estrecha proximidad al ácido nucleico diana, de manera que la unión de la polimerasa de ácidos nucleicos al extremo 3' del cebador la ponga en contacto con el extremo 5' de la sonda en ausencia de extensión de cebador. La expresión "corte independiente de la polimerización" se refiere a dicho proceso. Alternativamente, en el caso de que el cebador y la sonda se hibriden con regiones espaciadas a mayor distancia del ácido nucleico diana, la polimerización típicamente se produce antes de que la polimerasa de ácidos nucleicos entre en contacto con el extremo 5' de la sonda. A medida que progresa la polimerización, la polimerasa corta progresivamente fragmentos del extremo 5' de la sonda. Este corte continua hasta que el resto de la sonda ha sido desestabilizado en grado suficiente para que se disocie de la molécula molde. La expresión "corte dependiente de la polimerización" se refiere a dicho proceso.

35 Una ventaja del corte independiente de la polimerización radica en la eliminación de la necesidad de amplificar el ácido nucleico. Con la condición de que el cebador y la sonda se unan contiguamente al ácido nucleico, pueden producirse rondas secuenciales de hibridación de la sonda y el corte de fragmentos. De esta manera, puede generarse una cantidad suficiente de fragmentos, permitiendo la detección en ausencia de polimerización.

40 En cualquiera de los procesos, se proporciona una muestra que se cree que contiene el ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana contenido en la muestra puede en primer lugar transcribirse inversamente en ADNc, en caso necesario, y después desnaturalizarse, utilizando cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo métodos físicos, químicos o enzimáticos, los cuales son conocidos por el experto en la materia. Un enfoque físico ejemplar para llevar a cabo la separación de cadenas implica el calentamiento del ácido nucleico hasta que ha sido completamente (>99%) desnaturalizado. La desnaturalización por calor típica implica temperaturas de entre aproximadamente 85°C y aproximadamente 105°C (típicamente de entre aproximadamente 85°C y aproximadamente 98°C, y más típicamente de entre aproximadamente 85°C y aproximadamente 95°C), durante periodos de tiempo de entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 10 minutos (por ejemplo de entre unos cuantos segundos y aproximadamente 1 minuto). A modo de alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico puede existir en forma de cadena sencilla en la muestra, tal como en el caso de que la muestra comprenda virus de ARN o ADN de cadena sencilla.

55 La cadena de ácido nucleico diana desnaturalizado típicamente se incuba con un cebador y una sonda bajo condiciones de hibridación que permiten que el cebador y la sonda se unen a la cadena de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, pueden utilizarse dos cebadores para amplificar el ácido nucleico diana. Los dos cebadores típicamente se seleccionan de manera que sus posiciones relativas a lo largo del ácido nucleico diana sean tales que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, en el caso de que el producto de extensión se separe de su molde (complemento), sirva como molde para la extensión del otro cebador, rindiendo una cadena réplica de longitud definida.

60 Debido a que las cadenas complementarias típicamente son más largas que la sonda o el cebador, las cadenas presentan más puntos de contacto y, de esta manera, una mayor probabilidad de unión entre sí durante un periodo

de tiempo dado. De acuerdo con lo anterior, típicamente se utiliza un exceso molar elevado de sonda y cebador para favorecer la hibridación de cebador y sonda sobre la rehibridación de cadenas de molde. En formatos de multiplexado, típicamente se utilizan múltiples sondas en un único recipiente de reacción para detectar simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana.

5 Los cebadores generalmente son de suficiente longitud y complementariedad para que se unan selectivamente a ácidos nucleicos diana bajo condiciones seleccionadas para permitir que se produzca el corte independiente de la polimerización o el corte dependiente de la polimerización. La longitud y composición exactas del cebador dependerán de muchos factores, entre ellos la temperatura de la reacción de hibridación, la fuente y composición del cebador, la proximidad del sitio de hibridación de la sonda al sitio de hibridación del cebador, y la proporción de concentraciones de cebador:sonda. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador típicamente incluye entre aproximadamente 15 y 30 nucleótidos, aunque puede contener más o menos nucleótidos.

15 La sonda generalmente se hibrida con su ácido nucleico diana complementario antes de que la polimerasa de ácidos nucleicos entre en contacto con esa región del ácido nucleico diana, permitiendo de esta manera que la actividad nucleasa 5' a 3' del enzima corte fragmentos de la sonda. Para incrementar la probabilidad de que la sonda se hibride con el ácido nucleico diana antes de que la polimerasa alcance dicha región de hibridación, puede utilizarse una diversidad de técnicas. Por ejemplo, los cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el ácido nucleico. Por lo tanto, la sonda puede diseñarse para que sea más larga que el cebador, de manera que la sonda se hibride preferentemente al ácido nucleico diana a temperaturas más altas que la hibridación del cebador. A título ilustrativo adicional, la composición de nucleótidos de la sonda puede seleccionarse para que presente un contenido de G/C más alto y, en consecuencia, una mayor estabilidad térmica que el cebador. Opcionalmente pueden incorporarse nucleótidos modificados en los cebadores o sondas para conseguir una estabilidad térmica mayor o menor comparado con los cebadores o las sondas que presentan únicamente nucleótidos no modificados. En algunas realizaciones, los cebadores contienen un nucleótido terminador en el extremo 3'-terminal. Los parámetros de termociclado también pueden modificarse para aprovechar la diferente estabilidad térmica de la sonda y el cebador. Por ejemplo, tras una etapa de desnaturalización del termociclado, puede introducirse una temperatura intermedia que permite la unión de la sonda, pero no la unión del cebador. A continuación, la temperatura puede reducirse adicionalmente para permitir la hibridación del cebador. Para favorecer preferentemente la unión de la sonda antes del cebador, también puede utilizarse un exceso molar elevado de concentración de sonda a concentración de cebador. Dichas concentraciones de sonda típicamente son entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 veces más altas que la concentración de cebador respectiva, que es generalmente de entre aproximadamente 0,5 y  $5 \times 10^{-7}$  M.

35 La extensión dependiente del molde de los cebadores puede catalizarse utilizando las ADN polimerasas indicadas en la presente memoria, en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) o análogos en una mezcla de reacción que también incluye sales apropiadas, cationes metálicos y tampones. Las mezclas de reacción se han descrito en mayor detalle anteriormente. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con dichas ADN polimerasas son bien conocidas de la técnica. En algunas realizaciones, además de una capacidad de PAP mejorada, la ADN polimerasa presenta actividad de nucleasa 5' a 3' para cortar eficientemente la sonda y liberar fragmentos marcados de manera que pueda generarse directa o indirectamente una señal detectable.

45 Los productos de la síntesis generalmente son moléculas dúplex que incluyen las cadenas de molde y las cadenas de extensión de cebador. Los productos secundarios de dicha síntesis son fragmentos de sonda, los cuales pueden incluir una mezcla de fragmentos mononucleotídicos, dinucleotídicos y de mayor tamaño. Los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de sonda y cebador, y extensión de cebador y corte de la sonda resultan en la acumulación exponencial de la región definida por los cebadores y la generación exponencial de fragmentos marcados. Se llevan a cabo ciclos suficientes para conseguir una cantidad detectable de fragmentos de sonda, que es generalmente varios órdenes de magnitud superior a la señal de fondo.

50 En determinadas realizaciones, las reacciones de PCR se llevan a cabo como procedimiento automatizado, que utiliza un enzima ADN polimerasa termoestable tal como se describe en la presente memoria. En este procedimiento, la mezcla de reacción se cicla a través de una etapa de desnaturalización, una etapa de hibridación de sonda y cebador, y una etapa de síntesis en la que el corte y el desplazamiento se producen concurrentemente con la extensión del cebador dependiente del molde. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se lleva a cabo utilizando un sistema. Opcionalmente, cicladores térmicos, tales como los disponibles comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), los cuales están diseñados para la utilización con enzimas termoestables, tales como las ADN polimerasas de la presente invención.

60 Esencialmente pueden utilizarse los enzimas ADN polimerasa de la presente invención con cualquier método disponible para la detección y amplificación de ácidos nucleicos diana. Entre los enfoques comunes se incluyen la detección de amplificación en tiempo real con sondas de nucleasa 5', sondas de hibridación o sondas de horquilla

(por ejemplo balizas moleculares), la detección de marcajes incorporados en los cebadores de amplificación o los ácidos nucleicos amplificados mismos, por ejemplo tras la separación electroforética de los productos de amplificación de marcajes no incorporados, ensayos basados en la hibridación (por ejemplo ensayos basados en matrices) y/o la detección de reactivos secundarios que se unen a los ácidos nucleicos. Estos enfoques generales también se describen en, por ejemplo, Sambrook, y Ausubel 1 y 2, *supra*.

En otras realizaciones ilustrativas de utilización de las polimerasas modificadas descritas en la presente memoria se incluye la utilización de cebadores marcados para llevar a cabo la detección en tiempo real de los ácidos nucleicos diana. Los enfoques basados en cebadores a la detección en tiempo real de ácidos nucleicos diana que puede adaptarse para la utilización con las ADN polimerasas descritas en la presente memoria también se describen en, por ejemplo, Huang *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 26(11):891-895, 2004; Asselbergs *et al.*, *Anal. Biochem.* 318(2):221-229, 2003, y Nuovo *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 47(3):273-280, 1999.

#### V. KITS

La presente invención proporciona además kits para la extensión de ácidos nucleicos. Generalmente, el kit incluye por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de la invención tal como se indica en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el kit incluye además uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, en variaciones específicas, el recipiente o recipientes adicionales proporcionan nucleótidos libres, un tampón adecuado para la PAPA y/o un cebador hibridable, bajo condiciones de PAP, a un molde polinucleótido predeterminado. En algunas realizaciones, el cebador presenta un nucleótido terminador no extensible en el extremo 3'-terminal. En algunas realizaciones, el nucleótido terminador incluye por lo menos un marcaje (por ejemplo un isótopo radioactivo, un pigmento fluorescente, un grupo modificador de la masa, o similar). En algunas realizaciones, el kit incluye además uno o más nucleótidos extensibles y, opcionalmente, por lo menos uno de los nucleótidos extensibles comprende un marcaje (por ejemplo un isótopo radioactivo, un pigmento fluorescente, un grupo modificador de la masa, o similar). Opcionalmente, el kit incluye además por lo menos una pirofosfatasa (por ejemplo una pirofosfatasa termoestable, etc.). Típicamente, el kit incluye además un juego de instrucciones para extender el ácido nucleico con las ADN polimerasas dadas a conocer en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el kit incluye además un ácido nucleico molde y el ácido nucleico cebador, en el que el ácido nucleico cebador es complementario a por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico molde. Opcionalmente, el ácido nucleico molde o el ácido nucleico cebador se une a un soporte sólido. En algunas de dichas realizaciones, el cebador comprende un marcaje, tal como un isótopo radioactivo, un pigmento fluorescente, un grupo modificador de la masa, o similar.

#### EJEMPLOS

##### EJEMPLO 1: identificación y caracterización de las ADN polimerasas mutantes

El presente ejemplo muestra la identificación y caracterización de ADN polimerasas mutantes con una activación mejorada del cebador bloqueado con 2'-PO<sub>4</sub>. Se identificó una mutación en las polimerasas de la familia CS que proporciona una capacidad mejorada de eliminar el grupo de bloqueo de un cebador bloqueado con 2'-fosfato al hibridar el cebador con su molde perfectamente complementario. Brevemente, las etapas en dicho procedimiento de cribado incluían la generación de una biblioteca, la expresión y purificación parcial de los enzimas mutantes, el cribado de los enzimas para la propiedad deseada, la purificación mediante secuenciación y la caracterización adicional de mutantes seleccionados, y la generación, purificación y caracterización de las mutaciones en diferentes fondos genéticos. Se describe en mayor detalle cada una de estas etapas a continuación.

La mutación identificada mediante este procedimiento era T606S. Se introdujo seguidamente esta mutación en polimerasas de familia CS relacionadas, incluyendo G46E L329A E678G CS5 (GLE-CS5) y G46E L329A D640G S671F E678G CS5 (GLDSE-CS5). Las polimerasas mutantes resultantes se caracterizaron mediante el análisis de su rendimiento en una serie de experimentos de ciclado térmico cinético (CTC).

La mutación identificada, T606S, resultó en una capacidad mejorada de activar y extender el cebador bloqueado con 2'-PO<sub>4</sub> al hibridarse con un molde perfectamente correspondiente, en el contexto de la mutación E678G, lo que permitió la incorporación de ribonucleótidos y otros nucleótidos 2'-modificados, pero que también resultó en una capacidad alterada de extender los moldes cebados. Las mutaciones S671F y D640G, así como Q601R e I669F, mejoraron esta propiedad de capacidad alterada de extensión de cebadores.

Generación de biblioteca clonal: el dominio de polimerasa de la ADN polimerasa CS5 E678G se sometió a PCR con tendencia a errores entre los sitios de restricción Bgl II y Hind III. Los cebadores utilizados para dicha amplificación se proporcionan a continuación:

Cebador directo: 5'-GCAGCGAACTACTCCTGTGA-3' (SEC ID nº 31) y

Cebador inverso: 5'-ACATCCACTTCGAGCGGCACTGA-3' (SEC ID nº 32).

Se llevó a cabo una PCR utilizando un abanico de concentraciones de  $Mg^{2+}$  de entre 1,8 y 3,5 mM con el fin de generar bibliotecas con un rango de tasas de mutación. Las condiciones del tampón eran: bicine 50 mM, pH 8,2, KOAc 115 mM, glicerol al 8% p/v, 0,2 mM de cada dNTP y 0,2X SYBR verde I. Se utilizó un enzima de PCR de inicio en caliente GENEAMP® AccuRT a razón de 0,15 U/μl. Partiendo de  $5 \times 10^5$  copias de ADN plasmídico CS5 E678G linearizado/volumen de reacción de 50 μl, se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación aplicando una temperatura de hibridación de 60°C durante 15 segundos, una temperatura de extensión de 72°C durante 45 segundos y una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 15 segundos.

El amplicón resultante se purificó en una columna de centrifugado QIAquick (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) y se cortó con Bgl II e Hind III y después se purificó nuevamente. Se preparó un plásmido vector, una modificación de G46E L329A CS5 portador de una deleción grande en el dominio de polimerasa entre los sitios Bgl II e Hind III, mediante el corte con los mismos dos enzimas de restricción y el tratamiento con fosfatasa intestinal bovina (FIB). El vector cortado y el inserto mutado se mezclaron en diferentes proporciones y se trataron con ligasa de T4 durante la noche a 15°C. Se purificaron las ligaciones y se transformaron en *E. coli* cepa LK3 mediante electroporación.

Se sembraron alícuotas en medio selectivo con ampicilina con el fin de determinar el número de transformantes únicos en cada transformación. Las transformaciones con los transformantes más únicos en cada tasa de mutagénesis se almacenaron a una temperatura de entre -70°C y -80°C en presencia de glicerol como crioprotector.

A continuación, se extendió cada biblioteca sobre placas de agar selectivas con ampicilina de gran formato. Se transfirieron las colonias individuales a placas de 384 pocillos que contenían caldo de Luria 2X con ampicilina y glicerol al 10% p/v utilizando un recolector de colonias automático (QPix2, Genetic Ltd.). Estas placas se incubaron durante la noche a 30°C para permitir el crecimiento de los cultivos y después se almacenaron a una temperatura de entre -70°C y -80°C. Se añadió suficientemente poco glicerol al caldo Luria 2X para permitir el crecimiento del cultivo aunque suficiente para proporcionar crioprotección. Se prepararon varios miles de colonias a varios niveles de mutagénesis ( $Mg^{2+}$ ) de esta manera, para su uso posterior.

Preparación de biblioteca de extractos Parte 1 - Fermentación: a partir de las bibliotecas clonales indicadas anteriormente, se preparó una biblioteca correspondiente de extractos parcialmente purificados adecuados para fines de cribado. La primera etapa de este procedimiento era preparar cultivos de expresión a pequeña escala de cada clon. Estos cultivos se cultivaron en formato de 96 pocillos; por lo tanto, había 4 placas de cultivo de expresión por cada placa de biblioteca de 384 pocillos. A continuación, se transfirieron 0,5 μl de cada pocillo de la placa de biblioteca clonal a un pocillo de una placa de inóculo de 96 pocillos, que contenían 150 μl de medio A (ver la Tabla 2, posteriormente). Esta placa de inóculo se agitó durante la noche a 1.150 rpm a 30°C en una placa incubadora/agitador iEMS (ThermoElectron). A continuación, dichos cultivos de inóculo se utilizaron para inocular el mismo medio, esta vez inoculando 2,5 μl en 270 μl de medio A en placas de 96 pocillos de gran formato (Nunc nº 267334). Se incubaron estas placas durante la noche a 37°C. El plásmido de expresión contenía elementos de control transcripcional que permiten la expresión a 37°C pero no a 30°C. Tras la incubación durante la noche, los cultivos expresaron la proteína del clon hasta típicamente 1-10% del total de proteínas celulares. Las células de estos cultivos se recolectaron mediante centrifugación. Estas células se congelaron (-70°C) durante por lo menos 2 horas antes del procesado posterior, tal como se indica posteriormente.

Tabla 2. Medio A (esterilizado mediante filtración antes de la utilización)

Componente	Concentración
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
Citric acid·H <sub>2</sub> O	2 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g/l
NaNH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3,5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Ácidos casamino	2,5 g/l
Glucosa	2 g/l
Tiamina·HCl	10 mg/l
Ampicilina	100 mg/l

Preparación de biblioteca de extractos Parte 2 - Extracción: los pellets celulares de la etapa de fermentación se resuspendieron en 25 μl de tampón de lisis (Tabla 3, posteriormente). Observar que el tampón contenía lisozima para ayudar en la lisis celular y una nucleasa ("benzonasa") para eliminar tanto el ARN como el ADN del extracto. Las placas se agitaron a 1.150 rpm a 37°C durante 1 a 2 horas. Se añadió sulfato amónico (2 μl de una solución 2 M) y los extractos se transfirieron a placas de termociclador de 384 pocillos. Las placas se congelaron durante la noche a -70°C. A continuación, se incubaron a 37°C durante 15 minutos, seguido de 75°C durante 15 minutos en un

termociclador (ABI 9700) con el fin de precipitar e inactivar las proteínas contaminantes, incluyendo los enzimas añadidos exógenamente. Las placas se centrifugaron a 3.000xg durante 15 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a una nueva placa para termociclador de 384 pocillos. Estas placas de extractos se congelaron a -20°C para el uso posterior en los cribados. Cada pocillo contenía aproximadamente 0,5 a 3 mM del enzima polimerasa mutante. Además, las placas de extracto se diluyeron 10 veces en un tampón que consistía de Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, KCl 100 mM y Tween-20 al 0,2%. Estos extractos diluidos seguidamente se utilizaron para el cribado para mutantes de PAP mejorados, tal como se indica posteriormente.

Tabla 3. Tampón de lisis

Componente	Concentración o porcentaje
Benzonasa (Novagen nº 70584)	1X
Lisozima (de polvos)	1 mg/ml
Benzonasa (Novagen nº 71205)	125 U/ml

Cribado de bibliotecas de extractos para mutantes de PAP: se utilizaron extractos diluidos en dos determinaciones separadas de tasa de extensión. En el primer ensayo, se utilizó como el molde, ADN de cadena sencilla de M13mp18 (ADN de M13), cebado con un oligonucleótido que presenta la secuencia siguiente:

5'-GGGAAGGGCGATCGGTGCGGCCTCTTCGC-3' (SEC ID nº 33)

Se añadió extracto (0,5 µl) a 13 µl de mezcla maestra de reacción que contenía 1 nM de molde de M13 cebado en placas de PCR de 384 pocillos. Se realizó un seguimiento de la extensión del molde con cebadores cada 20 segundos a 64°C en un termociclador cinético modificado utilizando una cámara CCD. La mezcla maestra de reacción era: tricina 100 mM, pH 8,0, KOAc 20 mM, Mg(OAc)<sub>2</sub> 3 mM, tampón de almacenamiento de enzima al 2,5%, 1X SYBR verde I (Molecular Probes) y 0,1 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. (el "tampón de almacenamiento de enzima" estaba compuesto de Tris 20 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,5% y glicerol al 50% v/v). Con el fin de distinguir la fluorescencia derivada de la extensión de la fluorescencia de fondo, se incluyeron pocillos paralelos en el experimento en los que se había bloqueado la extensión de la cadena de cebador omitiendo los nucleótidos de la mezcla maestra de reacción. Para cada extracto, se estimó la actividad de polimerasa a partir de la tasa de incremento de la fluorescencia, tras restar el fondo.

Con el fin de encontrar enzimas mutantes que presentasen una tasa mejorada de activación de cebadores bloqueados con 2'-PO<sub>4</sub>, se llevó a cabo en cada extracto un segundo conjunto de ensayos de extensión. En este segundo conjunto de ensayos, se sustituyó un sustrato oligo dúplex pre-hibridado por un molde M13 cebado. La cadena del cebador presentaba la secuencia:

CGCCTGGTCTGTACACCGTTCE (SEC ID nº 34), en la que E=2'PO<sub>4</sub>-dA, y la cadena de molde presentaba la secuencia: CAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTQTACAQACCAQGCGP (SEC ID nº 35), en la que Q=7-deaza-dG y P=3' PO<sub>4</sub>. Los residuos de 7-deaza-dG en la cadena de molde resultan en una fluorescencia de fondo reducida. Se añadió dicho oligo dúplex a la mezcla de reacción en una cantidad de 100 nM. Además, se añadió pirofosfato en una cantidad de 0,5 mM. Aparte del cambio de sustrato y la adición de pirofosfato, las condiciones fueron idénticas a la reacción de extensión de M13 indicada anteriormente. La tasa a la que los extractos pudieron activar el cebador bloqueado se estimaron a partir de la tasa de cambio de la fluorescencia, tras restar el fondo. A continuación se comparó esta tasa con la actividad en el molde de M13. La proporción entre estas dos tasas se utilizó para determinar qué mutantes presentaban una actividad de activación relativamente alta de los cebadores bloqueados con 2'-PO<sub>4</sub>.

Se cribaron de esta manera varios miles de extractos. Se muestran resultados típicos en la figura 4. Un extracto, etiquetado "1AS-G2", destacó como de alta actividad sobre el oligo dúplex bloqueado (ver la figura 4). Este clon, redenido "1000-G2", se seleccionó para el estudio adicional. Tras recuperar el clon de la biblioteca clonal, la secuencia de ADN de la región mutada del clon se analizó mediante secuenciación de Sanger y se encontró que portaba tres mutaciones en comparación con la secuencia parental. Estas mutaciones, y los cambios correspondientes en la secuencia de aminoácidos, eran: A7161G ( K570R), A7268T (T606S) y T7285 (mutación silenciosa, ningún cambio de aminoácido). En un estudio paralelo se produjo enzima altamente purificado en un cultivo en matraz de agitación y se determinó la concentración mediante densitometría en gel. Este enzima purificado se comparó directamente con el enzima parental, G46E L329A E678G CS5, o "GLE", para la capacidad de activar el mismo oligo dúplex bloqueado utilizado en el cribado, y para la capacidad de extender M13 cebado. Estos ensayos se llevaron a cabo bajo condiciones similares a las utilizadas en el cribado, utilizando la detección con SYBR verde I de ADN de doble cadena, excepto en que se llevaron a cabo a una concentración de enzima idéntica y con múltiples réplicas, para incrementar la precisión. Los ensayos de extensión mostraron que el mutante era capaz de activar el cebador bloqueado más rápidamente que el tipo parental (figura 5) y además que las mutaciones no presentaron ningún efecto sobre la extensión normal de un molde de ADN cebado (figura 6).

Con el fin de determinar cuál de los dos cambios de aminoácidos en 1000-G2 era responsable del fenotipo observado, se desplazaron separadamente las dos mutaciones en el fondo parental, mediante mutagénesis *in vitro* del plásmido parental, utilizando PCR solapada. Se crearon mutantes con los fenotipos G46E L329A K570R E678G CS5 ("GLKE") y G46E L329A T606S E678G CS5 ("GLTE"). Los mutantes se purificaron hasta la homogeneidad, se cuantificaron y se hicieron migrar en el ensayo de oligo dúplex bloqueado. Los resultados (figura 7) indican que la mutación T606S es la única responsable de la activación mejorada de los cebadores bloqueados con 2'-PO<sub>4</sub> observada en el clon 1000-G2 en el cribado original.

Se han descubierto otras mutaciones determinadas en la ADN polimerasa CS5 que potencian las propiedades de dicho enzima en determinadas aplicaciones. Dos de estas mutaciones, D640G y S671F, en combinación, resultan en una tasa de extensión significativamente más rápida y en un rendimiento mejorado en las aplicaciones de PCR, particularmente en el caso de que la polimerasa porte también la mutación E678G ribo-incorporada. Con el fin de comprobar si el rendimiento de GLTE podía mejorarse mediante estas mutaciones de la tasa de extensión, se creó un clon con el genotipo G46E L329A T606S D640G S671F E678G CS5 ("GLTDSE"), mediante un simple intercambio de fragmentos de restricción entre GLTE y GLQDSE utilizando los sitios de restricción únicos del vector SapI y NdeI. Tras la purificación/cuantificación, dicho enzima se hizo migrar en el ensayo de oligo dúplex bloqueado que se ha indicado anteriormente. Los resultados (figura 8) indican que GLTDSE es más rápido que sus clones parentales en la activación de un oligo dúplex cebado bloqueado con 2'-PO<sub>4</sub>.

#### EJEMPLO 2: utilización de mutantes T606S en PAP-PCR:

El presente ejemplo demuestra la utilización de los mutantes T606S en PAP-PCR. La polimerización activada por pirofosforólisis, denominada en la presente memoria "PAP-PCR", es una modificación del procedimiento de PCR que incrementa la especificidad, requiriendo que un cebador bloqueado se una a una molécula de molde perfectamente correspondiente antes de la activación del cebador mediante pirofosforólisis. Esta "comprobación de especificidad" resulta eficaz en cada ciclo de PCR debido a que, en el caso de que se realice un error y se produzca la pirofosforólisis en un cebador no correspondiente, el producto de extensión resultante todavía se encontrará desapareado en una posterior ronda de extensión y por lo tanto no resultará en la acumulación de un amplicón desapareado.

Los presentes inventores sometieron a ensayo la capacidad de uno de sus mutantes T606S de llevar a cabo la PAP-PCR en un sistema modelo que utilizaba M13mp18 como molde. Los cebadores utilizados presentaban las secuencias:

KAB77: CGCCTGGTCTGTACACCGTTTCE (SEC ID nº 26), en la que E=2'PO<sub>4</sub>-dA, y  
KAB71: GGAACGAGGGTAGCAACGGCTACE (SEC ID nº 27), en la que E=2'PO<sub>4</sub>-dA.

Conjuntamente los dos cebadores se espera que generen un amplicón de 342 pb a partir del molde M13. Observar que ambos cebadores se encuentran bloqueados con un grupo 2'-PO<sub>4</sub> en el extremo 3' y no pueden extenderse hasta que ese grupo sea eliminado mediante pirofosforólisis del residuo dA terminal. Las observaciones anteriores indican que la tasa de activación mediante pirofosforólisis de diferentes cebadores bloqueadores con 2'-PO<sub>4</sub> varía y que la activación de KAB77 es relativamente lenta, requiriendo tiempos de extensión prolongados, de hasta 5 minutos en la PCR para conseguir una amplificación eficiente. En contraste, los presentes inventores encontraron que la utilización de la ADN polimerasa mutante CS5 GLTDSE resultaba en una amplificación rápida y eficiente a partir del molde M13 y los cebadores listados anteriormente.

Las condiciones de reacción utilizadas se listan en la Tabla 4, a continuación:

TABLA 4 Condiciones de reacción

Tricina, pH 7,5	50 mM
KOAc, pH 7,5	80 mM
Tampón de almacenamiento de enzima + Tween-20 al 0,5%	al 2,5% v/v
SYBR verde I	0,2X (a partir de solución 20X en DMSO)
Glicerol	al 5% v/v
dNTP	0,2 mM de cada uno de d(AGC)TP, 0,4 mM de dUTP
UNG	0,02 U/ml
Mg(OAc) <sub>2</sub>	2,75 mM
Pirofosfato	0,2 mM
ADN polimerasa GLTDSE	10 nM
ADN de M13mp18	10 <sup>5</sup> copias/20 ml de reacción
Cebadores KAB77/KAB71	0,2 mM cada uno

La composición del "tampón de almacenamiento de enzima" se ha proporcionado anteriormente, en el Ejemplo 1. SYBR verde I permitió la detección de la acumulación de producto mediante fluorescencia en un termociclador cinético de 384 pocillos. La utilización de dUTP y UNG permite la esterilización del amplicón para evitar la contaminación de experimentos de PCR anteriores.

Se llevó a cabo un experimento utilizando dicha mezcla de reacción, en la que se modificó la concentración de KOAc entre 20 y 120 nM; la concentración de pirofosfato se modificó entre 0,15 y 0,3 mM y la concentración de Mg(OAc)<sub>2</sub> se modificó entre 2 y 4 mM. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Las condiciones de ciclado eran: 2 minutos a 50°C (para permitir la esterilización de UNG), 92°C durante 1 minuto, seguido de 46 ciclos de: desnaturalización a 92°C durante 15 segundos, seguido de la hibridación/extensión a 62°C durante 35 segundos.

Los presentes inventores detectaron la formación de amplicones a partir de una fluorescencia relativa incrementada con una Ct de 21,4 ciclos, utilizando las condiciones proporcionadas en la Tabla, anteriormente. Lo anterior es indicativo de que se alcanzó una amplificación muy eficiente, dado el número de copia de entrada y el tiempo de extensión relativamente corto, de sólo 35 segundos. El análisis en gel de agarosa indicó que el amplicón de 342 pb esperado era el único producto detectable generado bajo dichas condiciones.

Además, los presentes inventores encontraron que las condiciones de reacción podían modificarse en cierto grado con sólo retrasos insignificantes del ciclado en Ct. Por ejemplo, permitiendo un retardo de Ct de 1 ciclo o menos, la concentración de KOAc pudo modificarse entre 60 y 100 mM, y el pirofosfato pudo modificarse entre 0,15 y 0,3 mM, y Mg(OAc)<sub>2</sub> pudo modificarse entre 2,5 y 3,5 mM. Lo anterior indica que la ADN polimerasa CS5 GLDTSE es capaz de llevar a cabo una PAP-PCR rápida y eficiente con dichos cebadores bloqueados bajo un abanico razonablemente amplio de condiciones de reacción.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ADN polimerasas mutantes con capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP)

<130> 24305 WO

<140> US No asignado todavía  
<141> No asignado todavía

<150> US 60/990,847  
<151> 2007-11-28

<160> 59

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)...(8)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)...(9)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 5  
 <400> 1  
                   Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
                   1                                  5                                  10                                  15  
 10 <210> 2  
       <211> 17  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
       <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP)  
       en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A  
 20 <220>  
       <221> MOD\_RES  
       <222> (1)...(10)  
       <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 25 <220>  
       <221> MOD\_RES  
       <222> (11)...(11)  
       <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr o Ala  
 30 <220>  
       <221> MOD\_RES  
       <222> (12)...(17)  
       <223> Xaa=cualquier aminoácido  
       <400> 2  
           Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
           1                                  5                                  10                                  15  
 35 Xaa  
       <210> 3  
       <211> 15  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
       <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus  
       thermophilus* (Tth)  
 45 <400> 3  
           Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro  
           1                                  5                                  10                                  15  
 50 <210> 4  
       <211> 15  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
       <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus  
       calophilus* (Tca)  
       <400> 4  
           Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro  
           1                                  5                                  10                                  15

<210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus* sp. Z05 (Z05)

10 <400> 5  
           Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro  
                   1                  5                  10                  15

15 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus aquaticus* (Taq)

25 <400> 6  
           Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro  
                   1                  5                  10                  15

30 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus flavus* (Tfl)

40 <400> 7  
           Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro  
                   1                  5                  10                  15

45 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus filiformis* (Tfi)

50 <400> 8  
           Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro  
                   1                  5                  10                  15

55 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220><223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermus* sp. sps17 (Sps17)

ES 2 553 893 T3

<400> 9  
Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro  
1 5 10 15

5 <210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

<400> 10  
Arg Glu Leu Asp Lys Leu Arg Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Ile Pro  
15 1 5 10 15

<210> 11  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de clon 7 de Hot Spring Family B 7 (HspB7)

25 <400> 11  
Arg Glu Leu Ser Lys Leu Arg Ser Thr Tyr Ala Asp Ala Leu Pro  
1 5 10 15

<210> 12  
30 <211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)

<400> 12  
Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu Leu  
40 1 5 10 15

<210> 13  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Bacillus caldotenax* (Bca)

<400> 13  
Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu Leu  
50 1 5 10 15

<210> 14  
<211> 15  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 553 893 T3

<223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Escherichia coli* (Eco)

<400> 14

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

<210> 15

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermotoga maritima* (Tma)

<400> 15

20 Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Ala Leu Pro  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermotoga neapolitana* (Tne)

<400> 16

30 Arg Lys Ile Leu Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Thr Leu Pro  
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de *Thermosiphon africanus* (Taf)

<400> 17

Arg Lys Tyr Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Ser Ile Pro  
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A de Hot Spring Family A (HspA)

<400> 18

Arg Thr Leu Ala Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Val Asp Ala Leu Pro  
1 5 10 15

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A del bacteriófago T7 (T7)

<400> 19

Leu Met Ile Gln Lys Arg Ile Gly Gln Ser Ala Glu Gly Asp Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Trp

10 <210> 20

<211> 893

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ADN polimerasa CS5 termoestable de la familia CS quimérica con dominio de nucleasa 5' N-terminal de *Thermus* sp. Z05 y dominios de exonucleasa 3'-5' y de polimerasa C-terminales de *Thermotoga maritima*

<400> 20

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

20



ES 2 553 893 T3

```

        675                680                685
Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu
   690                695                700
Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu
   705                710                715                720
Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val
                725                730                735
Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala
                740                745                750
Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp
                755                760                765
Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
                770                775                780
Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp
   785                790                795                800
Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile
                805                810                815
Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp
                820                825                830
Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val
                835                840                845
His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu
                850                855                860
Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
   865                870                875                880
Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser
                885                890

```

<210> 21  
 <211> 893  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADN polimerasa CS6 termoestable de la familia CS quimérica con dominio de nucleasa 5' N-terminal de *Thermus* sp. Z05 y dominios de exonucleasa 3'-5' y de polimerasa C-terminales de *Thermotoga maritima*

10

<400> 21

```

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
  1                5                10                15

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

```

ES 2 553 893 T3

				165					170					175					
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp				
				180				185						190					
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu				
		195					200					205							
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg				
	210					215					220								
Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp				
225					230					235				240					
Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu				
				245					250					255					
Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg				
			260					265					270						
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly				
		275					280					285							
Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	Asp	Leu				
	290					295					300								
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe				
305				310						315					320				
Ala	Ile	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asp	Cys	Asp	Ile				
				325					330					335					
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro				
			340					345						350					
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Lys				
		355					360						365						
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Val	Gly	Gln				
	370					375					380								
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Pro				
385				390						395				400					
Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Pro				
				405					410					415					
Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly				
			420					425					430						
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Pro	Leu				
	435						440						445						
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Ala	Asn	Tyr				
	450					455					460								
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser				
465				470						475				480					
Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	Ile	Glu				
				485					490					495					
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Tyr				
			500					505					510						
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys				
		515					520						525						
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe				
	530					535					540								
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu				
545				550						555				560					
Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr				
				565					570					575					
Arg	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Gly	Glu	His	Glu	Ile	Ile	Pro				
			580					585					590						
Leu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile				
		595					600						605						
Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Met	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Ile	His	Ala				
	610					615					620								
Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp				
625				630					635					640					
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile				
				645					650					655					
Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Pro	Asn	Trp	Trp	Ile	Val	Ser	Ala				

ES 2 553 893 T3

				660						665				670				
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp			
		675					680				685							
Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	His	Thr	Leu			
	690					695					700							
Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Glu			
	705				710					715					720			
Met	Arg	Arg	Ala	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val			
			725						730					735				
Thr	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Lys	Glu	Ala			
			740					745					750					
Glu	Lys	Met	Ile	Val	Asn	Tyr	Phe	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Asp			
		755					760						765					
Tyr	Ile	Gln	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg			
	770					775					780							
Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Lys	Arg	Asp	Ile	Pro	Gln	Leu	Met	Ala	Arg	Asp			
	785				790				795						800			
Arg	Asn	Thr	Gln	Ala	Glu	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Thr	Pro	Ile			
			805						810					815				
Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Glu	Ile	Asp			
			820					825					830					
Arg	Glu	Leu	Lys	Glu	Arg	Lys	Met	Arg	Ser	Lys	Met	Ile	Ile	Gln	Val			
		835				840						845						
His	Asp	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Pro	Asn	Glu	Glu	Lys	Asp	Ala	Leu			
	850				855						860							
Val	Glu	Leu	Val	Lys	Asp	Arg	Met	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Val			
	865			870					875					880				
Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Gly	Lys	Thr	Trp	Ser						
				885					890									

<210> 22  
 <211> 2682  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> ADN polimerasa CS5 termoestable de la familia CS química con dominio de nucleasa 5' N-terminal de *Thermus* sp. Z05 y dominios de exonucleasa 3'-5' y de polimerasa C-terminales de *Thermotoga maritima*

<400> 22  
 atgaaagcta tggtagcatt attcgaaccc aaaggccggg tcctcctggt ggacggccac 60  
 cacctggcct accgcacctt ctctgccttg aagggcctca ccacgagccg gggcgaaccg 120  
 gtgcaggcgg tttacggcct cgccaagagc ctctcaagg cctgaagga ggacgggtac 180  
 aaggccgtct tcgtggtctt tgacgccaaag gcccttctc tccgccacga ggcctacgag 240  
 gcctacaagg caggccgcgc cccgaccccc gaggacttcc cccggcagct cgcctcatc 300  
 aaggagctgg tggacctctt ggggtttact cgcctcgagg ttccgggctt tgaggcggac 360  
 gacgtcctcg ccaccctggc caagaaggcg gaaaggagg ggtacgaggt gcgcatcctc 420  
 accgccgacc gggacctta ccagctcgtc tccgaccgcg tcgcccctc ccaccccgag 480  
 ggccacctca tcaccccgga gtggctttgg gagaagtacy gccttaagcc ggagcagtg 540  
 gtggacttcc gcgccctcgt gggggacccc tccgacaacc tccccggggt caagggcatc 600  
 ggggagaaga ccgccctcaa gctcctcaag gagggggaa gcctggaaaa taccctcaag 660  
 aacctggacc ggggtgaagc ggaaagcgtc cgggaaagga tcaaggccca cctggaagac 720  
 cttaagctct ccttgagct ttcccgggtg cgtcggacc tccccctgga ggtggacttc 780  
 gcccgaggc gggagcctga ccgggaaggg ctccgggct ttttgagcg cttggagttc 840  
 ggcagcctcc tccacgagtt cggccttcta gaggagtccg aacccttgg gtaccgtata 900  
 gttaaagacc tgggtgaatt tgaaaaactc atagagaaac tgagagaatc tccttcggtc 960  
 gctatcgatt tggaaactag ttccctcgat ccttctgact ggcacattgt cggtatctct 1020  
 gtgtctttca aaccaagga agcgtactac ataccactcc atcatagaaa cgcccagaac 1080  
 ctggacgaaa aagaggttct gaaaaagctc aaagaaattc tggaggacct cggagcaaag 1140

ES 2 553 893 T3

```

atcgttggtc agaatttgaa attcgattac aaggtggtga tggggaaggg tgttgaacct 1200
gttcctcctt acttcgacac gatgatagcg gcttaccttc ttgagccgaa cgaaaagaag 1260
ttcaatctgg acgatctcgc attgaaatth cttggataca aaatgacatc ttaccaagag 1320
ctcatgtect tctcttttcc gctgtttggg ttcagttttg cccgatgttcc tgtagaaaaa 1380
gcagcgaact actcctgtga agatgcagac atcacctaca gactttacaa gaccctgagc 1440
ttaaaactcc acgaggcaga tctggaaaac gtgttctaca agatagaaat gcccttgtg 1500
aacgtgcttg cacggatgga actgaacggg gtgtatgtgg acacagagtt cctgaagaaa 1560
ctctcagaag agtacggaaa aaaactcgaa gaactggcag aggaaatata caggatagct 1620
ggagagccgt tcaacataaa ctcaccgaag caggtttcaa ggatcctttt tgaaaaactc 1680
ggcataaaac cacgtggtaa aacgacgaaa acgggagact attcaacacg catagaagtc 1740
ctcgaggaac ttgccggtga acacgaaatc attcctctga ttcttgaata cagaaagata 1800
cagaaattga aatcaaccta catagacgct cttcccaaga tgggcaacc aaagaccgga 1860
aggattcatg cttctttcaa tcaaaccggg actgccactg gaagacttag cagcagcgat 1920
cccaatcttc agaacctccc gacgaaaagt gaagagggaa aagaaatcag gaaagcgata 1980
gttcctcagg atccaaactg gtggatcgtc agtgccgact actcccaaat agaactgagg 2040
atcctcgccc atctcagtgg tgatgagaat cttttgaggg cattcgaaga gggcatcgac 2100
gtccacactc taacagcttc cagaatatte aacgtgaaac ccgaagaagt aaccgaagaa 2160
atgcgcccgc ctggtaaaat ggttaatttt tccatcatat acgggtgtaac accttacggt 2220
ctgtctgtga ggcttggagt acctgtgaaa gaagcagaaa agatgatcgt caactacttc 2280
gtcctctacc caaagggtgcg cgattacatt cagaggggtcg tatcggaagc gaaagaaaaa 2340
ggctatgtta gaacgctggt tgggaagaaaa agagacatac cacagctcat ggcccgggac 2400
aggaacacac aggctgaagg agaacgaatt gccataaaca ctccataca gggtacagca 2460
gcggatataa taaagctggc tatgatagaa atagacaggg aactgaaaga aagaaaaatg 2520
agatcgaaga tgatcataca ggtccacgac gaactggttt ttgaagtgcc caatgaggaa 2580
aaggacgcgc tcgtcgagct ggtgaaagac agaatgacga atgtggtaaa gctttcagtg 2640
ccgctcgaag tggatgtaac catcggcaaa acatgggtcgt ga 2682

```

<210> 23

<211> 2682

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN polimerasa CS6 termoestable de la familia CS quimérica con dominio de nucleasa 5' N-terminal de *Thermus* sp. Z05 y dominios de exonucleasa 3'-5' y de polimerasa C-terminales de *Thermotoga maritima*

<400> 23

atgaaagcta	tgttaccatt	attcgaacce	aaaggccggg	tcctcctggt	ggacggccac	60
cacctggcct	accgcacctt	cttcgccttg	aagggcctca	ccacgagccg	gggccaaccg	120
gtgcaggcgg	tttacggctt	cgccaagagc	ctcctcaagg	ccctgaagga	ggacgggtac	180
aaggccgtct	tcgtggtctt	tgaocccaag	gcccttctct	tcgccacga	ggcctacgag	240
gcctacaagg	caggccgcgc	cccgaacccc	gaggacttcc	cccggcagct	cgcctcatc	300
aaggagctgg	tggacctcct	ggggtttact	cgctctgagg	ttccgggctt	tgaggcggac	360
gacgtcctcg	ccaccctggc	caagaaggcg	gaaagggagg	ggtacgaggt	gcgcatcctc	420
accgccgacc	gggaccttta	ccagctcgtc	tcggaccgcg	tcgccctcct	ccaccccgag	480
ggccacctca	tcaccccgga	gtggctttgg	gagaagtacg	gccttaagcc	ggagcagtg	540
gtggacttcc	gcgcctctcg	gggggacccc	tcggacaacc	tccccggggt	caagggcatc	600
ggggagaaga	ccgccctcaa	gctcctcaag	gagtggggaa	gcctggaaaa	tatcctcaag	660
aacctggacc	gggtgaagcc	ggaaaagcgtc	cgggaaagga	tcaaggccca	cctggaagac	720
cttaagctct	ccttggagct	ttcccgggtg	cgctcggacc	tccccctgga	ggtggacttc	780
gcccggagge	gggacctga	ccgggaaggg	cttcgggctt	ttttggagcg	cctggagttc	840
ggcagcctcc	tcacagagtt	cggccttcta	gaggagtccg	aacccttgg	gtaccgtata	900
gttaaagacc	tggttgaatt	tgaaaaactc	atagagaaac	tgagagaatc	tccttcgctc	960
gcgatcgctc	ttgcgactag	ttccctcgat	cctttcgact	gcgacattgt	cggtatctct	1020
gtgtctttca	aaccaaagga	agcgtactac	ataccactcc	atcatagaaa	cgcccagaac	1080
ctggacgaaa	aagaggttct	gaaaaagctc	aaagaaattc	tggaggaccc	cggagcaaag	1140
atcgttggtc	agaatttgaa	attcgattac	aaggtgttga	tgggtgaagg	tgttgaacct	1200
gttctcctt	acttcgacac	gatgatagcg	gcttaccttc	ttgagccgaa	cgaaaagaag	1260
ttcaatctgg	acgatctcgc	attgaaattt	cttggataca	aatgacatc	ttaccaagag	1320
ctcatgtcct	tctcttttcc	gctgtttggt	ttcagttttg	ccgatgttcc	tgtagaaaaa	1380
gcagcgaact	actcctgtga	agatgcagac	atcacctaca	gactttacaa	gaccctgagc	1440
ttaaaactcc	acgaggcaga	tctggaaaac	gtgttctaca	agatagaaat	gcccttgtg	1500
aacgtgcttg	cacggatgga	actgaacggt	gtgtatgtgg	acacagagtt	cctgaagaaa	1560
ctctcagaag	agtacggaaa	aaaactcgaa	gaactggcag	aggaaatata	caggatagct	1620
ggagagccgt	tcaacataaa	ctcaccgaag	caggtttcaa	ggatcctttt	tgaaaaactc	1680
ggcataaaa	cacgtggtaa	aacgacgaaa	acgggagact	attcaacacg	catagaagtc	1740
ctcgaggaac	ttgccggtga	acacgaaatc	attcctctga	ttcttgaata	cagaaagata	1800
cagaaattga	aatcaaccta	catagacgct	cttcccaaga	tgggtcaacc	aaagaccgga	1860
aggattcatg	cttctttcaa	tcaaacgggg	actgccactg	gaagacttag	cagcagcgat	1920
cccaatcttc	agaacctccc	gacgaaaagt	gaagagggaa	aagaaatcag	gaaagcgata	1980
gttctcagg	atccaaactg	gtggatcgtc	agtgccgact	actcccaaat	agaactgagg	2040
atcctcgccc	atctcagtg	tgatgagaat	cttttgagg	cattcgaaga	gggcatcgac	2100
gtccacactc	taacagcttc	cagaatattc	aacgtgaaac	ccgaagaagt	aaccgaagaa	2160
atgcgccgcg	ctggtaaaat	ggttaatttt	tccatcatat	acggtgtaac	accttacggt	2220
ctgtctgtga	ggcttggagt	acctgtgaaa	gaagcagaaa	agatgatcgt	caactacttc	2280
gtcctctacc	caaaggtgcg	cgattacatt	cagagggtcg	tatcggaagc	gaaagaaaaa	2340
ggctatgtta	gaacgctgtt	tggaaagaaa	agagacatac	cacagctcat	ggcccgggac	2400
aggaacacac	aggctgaagg	agaacgaatt	gccataaaca	ctcccataca	gggtacagca	2460
gcggatataa	taaagctggc	tatgatagaa	atagacaggg	aactgaaaga	aagaaaaatg	2520
agatcgaaga	tgatcataca	ggtccacgac	gaactggttt	ttgaagtgcc	caatgaggaa	2580
aaggacgcgc	tcgtcagact	ggtgaaagac	agaatgacga	atgtggtaaa	gctttcagtg	2640
ccgctcgaag	tggatgtaac	catcggcaaa	acatggctcg	ga		2682

<210> 24

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> forma no modificada de motivo en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

<220>

<221> MOD\_RES

15

<222> (2)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 24  
 Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 5           1                           5                           10                           15

<210> 25  
 <211> 17  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> forma no modificada de motivo en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN  
 15 de tipo familia A

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(10)  
 20 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 25 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr o Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(17)  
 30 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 25  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
 1                           5                           10                           15  
 Xaa

35 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador KAB77 sintético para el sistema modelo de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP-PCR)  
 utilizando el molde M13mp18

<220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> (22)...(22)  
 <223> n=2'-fosfato-desoxiadenosina

<400> 26  
 50 cgctgtgtct gtacaccgtt cn           22

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador KAB71 sintético para el sistema modelo de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP-PCR)  
 utilizando el molde M13mp18  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (24)...(24)  
 <223> n = 2'-fosfato-desoxiadenosina  
 5  
 <400> 27  
 ggaacgaggg tagcaacggc tacn 24  
 <210> 28  
 10 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa termoestable de familia CS quimérica de CS5  
 <400> 28  
 Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Ala Leu Pro  
 1 5 10 15  
 20 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa termoestable de familia CS quimérica de CS6  
 <400> 29  
 Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp Ala Leu Pro  
 1 5 10 15  
 30 <210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> secuencia de consenso para la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(4)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa=Ile o ausente  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)...(8)  
 <223> Xaa = Gly o ausente  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(17)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 60 <400> 30

ES 2 553 893 T3

Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

- 5 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> cebador directo de amplificación por PCR sintética con tendencia a errores
- 15 <400> 31  
 gcagcgaact actcctgtga 20
- 20 <210> 32  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> cebador inverso de amplificación por PCR sintética con tendencia a errores
- 30 <400> 32  
 acatccactt cgagcggcac tga 23
- 35 <210> 33  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
 <223> cebador oligonucleótido de molde de ADN de cadena sencilla M13mp18 sintético
- 45 <400> 33  
 ggggaagggcg atcgggtgcgg gcctcttcgc 30
- 50 <210> 34  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
 <223> cadena de cebador de sustrato oligo dúplex prehibridado sintético
- 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (22)...(22)  
 <223> n = 2'-fosfato-desoxiadenosina
- 65 <400> 34  
 cgctgtgtct gtacaccgtt cn 22
- 70 <210> 35  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 75 <220><223> cadena de cebador de sustrato oligo dúplex prehibridado sintético
- 80 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (29)...(39)

<223> n=7'-deaza-desoxiguanosina

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> (42)..(42)  
 <223> g modificada con 3'-fosfato

<400> 35  
 caactttgaa agaggacaga tgaacggtnt acanaccang cg 42

10 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa=Leu, Ile o Tyr

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = Lys, Arg o Gln

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa=Asn, Ser o Gly

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa=Asp o Glu

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (13)...(13)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)...(14)  
 <223> Xaa=Leu o Ile

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)...(15)  
 <223> Xaa=Pro o Leu

<400> 36  
 Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

5 <210> 37  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta un subdominio de polímero activado por pirofosforólisis de ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(2)  
 <223> Xaa = Glu, Gln, Lys o Thr

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)...(3)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)...(4)  
 <223> Xaa = Thr, Met, Asp, Ser, Gly, Ala, Gln o Leu

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)...(8)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 <223> Xaa = Val, Ile, Leu, Ala o Thr

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(12)

<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (13)...(13)  
 <223> Xaa=Pro, Ala, Gly, Lys, Thr o Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (14)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 37  
           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
           1                                  5                                  10                                  15

15 <210> 38  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(8)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa = Gly, Ala, Leu, Met, Phe, Trp, Lys, Gln, Glu, Ser, Pro, Val, Ile, Cys, Tyr, His, Arg, Asn o Asp

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

40 <400> 38  
           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
           1                                  5                                  10                                  15

45 <210> 39  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 39  
           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
           1                                  5                                  10                                  15

- <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 5  
 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A
- 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(1)  
 <223> Xaa = Arg o Leu
- 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(2)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido
- 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)...(3)  
 <223> Xaa = Leu, Ile o Tyr
- 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)...(4)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido
- 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)...(6)  
 <223> Xaa = Arg o Leu
- 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)...(7)  
 <223> Xaa=Ile o ausente
- 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)...(8)  
 <223> Xaa=Gly o ausente
- 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa=Lys, Arg o Gln
- 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)...(10)  
 <223> Xaa=Asn, Ser o Gly
- 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr o Ala
- 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(12)

- <223> Xaa=Tyr o Glu
- <220>  
<221> MOD\_RES  
5 <222> (13)...(13)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
<221> MOD\_RES  
10 <222> (14)...(14)  
<223> Xaa = Asp o Glu
- <220>  
<221> MOD\_RES  
15 <222> (15)...(15)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
<221> MOD\_RES  
20 <222> (16)...(16)  
<223> Xaa=Leu, Ile o Ala
- <220>  
<221> MOD\_RES  
25 <222> (17)...(17)  
<223> Xaa=Pro, Leu or Trp
- <400> 40  

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Xaa											
1				5					10						15	
Xaa																
- 30 <210> 41  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
<223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A
- 40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)...(1)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- 45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)...(2)  
<223> Xaa=Glu, Gln, Gly, Lys, Thr o Met
- 50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)...(3)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- 55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)...(4)  
<223> Xaa=Thr, Met, Asp, Ser, Gly, Ala, Gln o Leu
- 60 <220>  
<221> MOD\_RES

<222> (6)...(12)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)...(13)  
 <223> Xaa=Val, Ile, Leu, Ala, Thr o Gly

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)...(14)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)...(15)  
 <223> Xaa=Pro, Ala, Gly, Lys, Thr o Ser

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)...(17)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 41  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
 1 5 10 15  
 25 Xaa

<210> 42  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(10)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 <223> Xaa=Gly, Leu, Met, Phe, Trp, Lys, Gln, Glu, Ser, Pro, Val, Ile, Cys, Tyr, His, Arg, Asn o Asp

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(17)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

50 <400> 42  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa

55 <210> 43  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 553 893 T3

<223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

```

5  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (1)...(17)
    <223> Xaa=cualquier aminoácido

    <400> 43
           Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
           1           5           10           15
10  Xaa

    <210> 44
    <211> 15
    <212> PRT
15  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> región de motivo no modificado del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia
20  A

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (2)...(2)
    <223> Xaa=cualquier aminoácido
25

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (3)...(3)
    <223> Xaa=Leu, Ile o Tyr
30

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (4)...(4)
    <223> Xaa=cualquier aminoácido
35

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (7)...(7)
    <223> Xaa=Lys, Arg o Gln
40

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (8)...(8)
    <223> Xaa=Asn, Ser o Gly
45

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (11)...(11)
    <223> Xaa=cualquier aminoácido
50

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (12)...(12)
    <223> Xaa=Asp o Glu
55

    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (13)...(13)
    <223> Xaa=cualquier aminoácido
60

    <220>

```

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)...(14)  
 <223> Xaa=Leu o Ile

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)...(15)  
 <223> Xaa=Pro o Leu

10 <400> 44  
 Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

<210> 45  
 <211> 15  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(2)  
 25 <223> Xaa=Glu, Gln, Gly, Lys o Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)...(3)  
 30 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)...(4)  
 35 <223> Xa =Thr, Met, Asp, Ser, Gly, Ala, Gln o Leu

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)...(8)  
 40 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 45 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 50 <223> Xaa=Val, Ile, Leu, Ala o Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(12)  
 55 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)...(13)  
 60 <223> Xaa=Pro, Ala, Gly, Lys, Thr o Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 5  
 <400> 45  
           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
           1                          5                          10                          15  
  
 <210> 46  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP)  
 en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(8)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 20  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa=Gly, Ala, Leu, Met, Phe, Trp, Lys, Gln, Glu, Ser, Pro, Val, Ile, Cys, Tyr, His, Arg, Asn or Asp  
 25  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 30  
 <400> 46  
           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
           1                          5                          10                          15  
 35  
 <210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP)  
 en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 45  
 <400> 47  
           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
           1                          5                          10                          15  
 50  
  
 <210> 48  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
  
 <220>

<223> región de motivo no modificada del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

- <220>  
5 <221> MOD\_RES  
<222> (1)...(1)  
<223> Xaa=Arg o Leu
- <220>  
10 <221> MOD\_RES  
<222> (2)...(2)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
15 <221> MOD\_RES  
<222> (3)...(3)  
<223> Xaa=Leu, Ile o Tyr
- <220>  
20 <221> MOD\_RES  
<222> (4)...(4)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
25 <221> MOD\_RES  
<222> (6)...(6)  
<223> Xaa=Arg o Leu
- <220>  
30 <221> MOD\_RES  
<222> (7)...(7)  
<223> Xaa=Ile o ausente
- <220>  
35 <221> MOD\_RES  
<222> (8)...(8)  
<223> Xaa=Gly o ausente
- <220>  
40 <221> MOD\_RES  
<222> (9)...(9)  
<223> Xaa=Lys, Arg o Gln
- <220>  
45 <221> MOD\_RES  
<222> (10)...(10)  
<223> Xaa=Asn, Ser o Gly
- <220>  
50 <221> MOD\_RES  
<222> (11)...(11)  
<223> Xaa=Thr o Ala
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)...(12)  
<223> Xaa=Tyr o Glu
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)...(13)

<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)...(14)

<223> Xaa=Asp o Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)...(15)

<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(16)

<223> Xaa=Leu, Ile o Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)...(17)

<223> Xaa=Pro, Leu o Trp

<400> 48

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Xaa											
1				5					10						15	
Xaa																

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)...(1)

<223> Xaa=cualquier aminoácido

15

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa=Glu, Gln, Gly, Lys, Thr o Met

20

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)...(3)

<223> Xaa=cualquier aminoácido

25

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)...(4)

<223> Xaa=Thr, Met, Asp, Ser, Gly, Ala, Gln o Leu

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)...(12)

<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)...(13)  
 5 <223> Xaa=Val, Ile, Leu, Ala, Thr o Gly

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)...(14)  
 10 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)...(15)  
 15 <223> Xaa=Pro, Ala, Gly, Lys, Thr o Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)...(17)  
 20 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 49  
           Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
           1                  5                          10                          15  
           Xaa

25 <210> 50  
     <211> 17  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial

30 <220>  
     <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

35 <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (1)...(10)  
     <223> Xaa=cualquier aminoácido

40 <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (11)...(11)  
     <223> Xaa=Gly, Leu, Met, Phe, Trp, Lys, Gln, Glu, Ser, Pro, Val, Ile, Cys, Tyr, His, Arg, Asn o Asp

45 <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (12)...(17)  
     <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 50  
           Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
           1                  5                          10                          15  
           Xaa

50 <210> 51  
     <211> 17  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(17)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 <400> 51  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 10 Xaa

<210> 52  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(2)  
 <223> Xaa=Glu, Gln, Gly, Lys o Thr  
 25 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)...(8)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 30 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr  
 35 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido  
 40 <400> 52

Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

45 <210> 53  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(3)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)...(4)  
 60 <220>

<223> Xaa=Thr, Met, Asp, Ser, Gly, Ala, Gln o Leu

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (7)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 53

10           Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
               1                               5                               10                               15

<210> 54  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(8)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 <223> Xaa=Val, Ile, Leu, Ala o Thr

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

40 <400> 54

              Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
               1                               5                               10                               15

45 <210> 55  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(8)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(9)

60

<223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (11)...(12)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (13)...(13)  
 <223> Xaa=Pro, Ala, Gly, Lys, Thr o Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (14)...(15)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 55

20 Arg Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

<210> 56  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(1)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)...(2)  
 <223> Xaa=Glu, Gln, Gly, Lys, Thr o Met

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)...(10)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr o Ala

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)...(17)  
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

55 <400> 56  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa

<210> 57  
 <211> 17

- <212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
5 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A
- <220>  
10 <221> MOD\_RES  
<222> (1)...(3)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
15 <221> MOD\_RES  
<222> (4)...(4)  
<223> Xaa=Thr, Met, Asp, Ser, Gly, Ala, Gln o Leu
- <220>  
20 <221> MOD\_RES  
<222> (6)...(10)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
25 <221> MOD\_RES  
<222> (11)...(11)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr o Aal
- <220>  
30 <221> MOD\_RES  
<222> (12)...(17)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <400> 57
- |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Lys | Xaa |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |
- 35 <210> 58  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
40 <223> motivo modificado que presenta una capacidad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) en la región del subdominio 3/A de la ADN polimerasa dependiente de ADN de tipo familia A
- <220>  
45 <221> MOD\_RES  
<222> (1)...(10)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
50 <221> MOD\_RES  
<222> (11)...(11)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido excepto Thr o Ala
- <220>  
55 <221> MOD\_RES  
<222> (12)...(12)  
<223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>  
60 <221> MOD\_RES



**REIVINDICACIONES**

1. ADN polimerasa, que comprende R-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-K-L-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-Y-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>, en la que:
  - X<sub>1</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de E, Q, G, K y T,
  - X<sub>2</sub> es L, I o Y,
  - X<sub>3</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de T, M, D, S, G, A, Q y L,
  - X<sub>4</sub> es K, R o Q,
  - X<sub>5</sub> es N, S o G,
  - X<sub>6</sub> es S,
  - X<sub>7</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de V, I, L, A, T,
  - X<sub>8</sub> es D o E,
  - X<sub>9</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste de P, A, G, K, T y S,
  - X<sub>10</sub> es L o I,
  - X<sub>11</sub> es P o L,
 en la que la polimerasa presenta una actividad mejorada de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP) respecto a una polimerasa de otro modo idéntica en la que X<sub>6</sub> es T.
2. ADN polimerasa según la reivindicación 1, en la que la polimerasa presenta una tasa más rápida de extensión del cebador bloqueado KAB77 (SEC ID nº 26) que una polimerasa de otro modo idéntica en la que X<sub>6</sub> es T.
3. ADN polimerasa según la reivindicación 1, en la que la polimerasa comprende una polimerasa quimérica, en la que la polimerasa quimérica presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90% respecto a una ADN polimerasa CS5 (SEC ID nº 20).
4. ADN polimerasa según la reivindicación 3, en la que la polimerasa quimérica comprende SEC ID nº 22 con una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste de G46E, L329A, E678G y T606S.
5. Ácido nucleico recombinante codificante de la ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante según la reivindicación 5.
7. Célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 6.
8. Mezcla de reacción que comprende un molde polinucleótido, por lo menos un cebador con un nucleótido no extensible en el extremo 3' y una ADN polimerasa según las reivindicaciones 1 a 4, en la que el nucleótido no extensible es un nucleótido terminador 2'.
9. Método para llevar a cabo la polimerización activada por pirofosforolisis, que comprende:
  - poner en contacto una ADN polimerasa según las reivindicaciones 1 a 4 con un cebador, un molde polinucleótido y nucleótidos libres, en la que el extremo 3' del cebador está bloqueado con un nucleótido no extensible,
  - y bajo condiciones adecuadas para la pirofosforolisis del nucleótido no extensible en el extremo 3' del cebador, seguido de la extensión del cebador, llevando a cabo de esta manera la polimerización activada por pirofosforolisis.
10. Método para llevar a cabo la extensión de cebadores, que comprende:
  - poner en contacto una ADN polimerasa según las reivindicaciones 1 a 4 con un cebador, un molde polinucleótido y nucleótidos libres bajo condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido.
11. Kit para llevar a cabo la polimerización activada por pirofosforolisis, que comprende:
  - por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa según las reivindicaciones 1 a 4, y uno o más recipientes adicionales seleccionados de entre el grupo que consiste de:
    - (a) un recipiente que proporciona un cebador hibridable, bajo polimerización activada por pirofosforolisis, a un molde polinucleótido,
    - (b) un recipiente que proporciona un cebador que presenta un nucleótido no extensible en el extremo 3', el cebador hibridable, bajo condiciones de polimerización activada por pirofosforolisis, al molde polinucleótido,
    - (c) un recipiente que proporciona nucleótidos libres,
    - (d) un recipiente que proporciona un tampón adecuado para la polimerización activada por pirofosforolisis.

Tth	RELTKL	KNTYVDPLP
Tca	RELTKL	KNTYVDPLP
Z05	RELTKL	KNTYVDPLP
Taq	RELTKL	KSTYIDPLP
Tfl	RELTKL	KNTYIDPLP
Tfi	RELMKL	KSTYIDPLP
Spe17	RELMKL	KSTYIDPLP
Dra	RELOKL	RSTYEDPIP
HspB7	RELSKL	RSTYADALP
Bst	RQLGKL	QSTYIEGLL
Bca	RQLGKL	QSTYIEGLL
Eco	RGLAKL	KSTYTDKLP
Tma	RKIQKL	KSTYIDALP
Tne	RKILKL	KSTYIDTLP
Taf	RKYQKL	KSTYIDSIP
HepA	RTLAKL	KSTYVDALP
CS5	RKIQKL	KSTYIDALP
CS6	RKIQKL	KSTYIDALP
T7	LMIQKRIGQSAEGDKAW	
Cons	R--- <u>KL</u> ----TY-----	

**Figura 1**

1 MKAMLPLFEP KGRVLLVDGH HLAYRTFFAL KGLTTSRGEP VQAVYGFPAKS  
 51 LLXALKEDGY KAVFVVFDAK APSFRHEAYE AYKAGRPTP EDFPRQLALI  
 101 KELVDLLGFT RLEVPGFEAD DVLATLAKKA EREGYEVRIE TADRDLYQLV  
 151 SDRVAVLHPE GHLITPEWLW EKYGLKPEQW VDFRALVGDP SDNLPGVKGI  
 201 GEKALKLLK EWGSLENILK NLDVRKPEV RERIKAHLED LKLSLELSRV  
 251 RSDLPLEVDF ARRREPDREG LRAFLELLEF GSLLEHFGLL EESEPVGYRI  
 301 VKDLVEFEKL IBKLRSPSF AIDLETSSLD PFDCDIWGIS VSPFKPEAYY  
 351 IPLHHRNAQN LDEKEVLKKL KEILEDPGAK IVGQNLKFDY KVLVVKGVPEP  
 401 VPPYFDTMIA AYLLEPNEKK PNLDDLAKF LGYKMTSYQE LMSFSFPLFG  
 451 FSFADVPEK AANYSCEDAD ITYRLYKTLK LKLHEADLEN VFYKIEMPLV  
 501 NVLARMELNG VYVDTEFLKK LSEYGGKLE ELAEEIYRIA GEPFNINSPK  
 551 QVSRILFEKL GIKPRGKPTK TGDYSTRIEV LEELAGEHEI IPLILEYRKI  
 601 QKLNKSTYIDA LPKMVNPKTG RIHASFNQTG TATGRLSSSD PNLQNLPTKS  
 651 EEGKEIRKAI VPQDPNWWIV SADYSQIELR ILAHLSGDEN LLRAFEEGID  
 701 VHTLTASRIF NVKPEEVTEE MRRAGKMNLF SIIYGVTPYG LSVRLGVPVK  
 751 EAEMIVNYF VLYPKVRDYI QRVVSEAKEK GYVRTLFGRK RDIPQLMARD  
 801 RNTQABGERI AINTPIQGTA ADIIKLAMIE IDRELKERKM RSKMIIQVHD  
 851 ELVFEVNEE KDALVELVKD RMTNVVKLSV PLEVDTIGK TWS

## Figura 2A

1 ATGAAAGCTA TGTTACCATT ATTGGAACCC AAAGGCCGGG TCCTCCTGGT  
 51 GGACGGCCAC CACCTGGCCT ACCGCACCTT CTTCGCCCTG AAGGGCCTCA  
 101 CCACGAGCCG GGGCGAACCG GTGCAGGCCG TTTACGGCTT CGCCAAGAGC  
 151 CTCTCAAGG CCTGAAAGGA GGACGGGTAC AAGGCCGTCT TCGTGGTCTT  
 201 TGAGGCCAAG GCCCTTCCT TCCGCCACGA GGCCTAAGAG GCCTACAAGG  
 251 CAGGCCGCGC CCCGACCCC GAGGACTTCC CCCGGCAGCT CGCCCTCATC  
 301 AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGTTTACT CGCCTCGAGG TTCCGGGCTT  
 351 TGAGGCCGAC GACGTCTCG CCACCCCTGGC CAAGAAAGCG GAAAGGGAGG  
 401 GGTACGAGGT GCGCATCTC ACCGCCGACC GGGACCTTTA CCAGCTCGTC  
 451 TCCGACCGCG TCGCCGTCTT CCACCCCGAG GGCACCTCA TCACCCCGGA  
 501 GTGGCTTTGG GAGAAGTACG GCCTTAAGCC GGAGCAGTGG GTGGACTTCC  
 551 GCGCCCTCGT GGGGGACCCC TCCGACAACC TCCC CGGGGT CAAGGGCATC  
 601 GGGGAGAAGA CCGCCCTCAA GCTCCTCAAG GAGTGGGAA GCCTGGAAAA  
 651 TATCCTCAAG AACCTGGACC GGTGAAGCC GGAAAGCTC CGGAAAGGA  
 701 TCAAGGCCCA CCTGGAAGAC CTTAAGCTCT CTTGGAGCT TTCCCGGGT  
 751 CGCTCGGACC TCCCCCGGA GGTGGACTTC GCCCGGAGC GGGAGCCTGA  
 801 CCGGAAGGG CTTCGGCCT TTTTGGAGCG CTTGGAGTC GGCAGCCTCC  
 851 TCCACGAGTT CGCCCTCTA GAGGAGTCCG AACCCGTTGG GTACCGTATA  
 901 GPTAAAGACC TGGTGGATT TGAAAACTC ATAGAGAAC TGAGAGATC  
 951 TCCTTCGTC GCTATCGATT TGGAAACTAG TTCCCTCGAT CCTTTCGACT  
 1001 GCGACATTGT CGGTATCTCT GTGTCTTTCA AACCAAAGGA AGCGTACTAC  
 1051 ATACCACTCC ATCATAGAAA CGCCAGAAC CTGGACGAAA AAGAGGTTCT  
 1101 GAAAAAGCTC AAAGAAATC TGGAGGACCC CGGAGCAAG ATCGTTGGTC  
 1151 AGAATTTGAA ATTGATATC AAGGTGTTGA TGGTGAAGGG TGTGAACCT  
 1201 GTCTCTCTT ACTTCGACAC GATGATAGCG GCTTACCTC TTGAGCCGAA  
 1251 CGAAAAGAAG TTCAATCTGG ACGATCTCGC ATTGAAATTT CTTGATACA  
 1301 AAATGACATC TTACCAAGAG CTCATGTCTT TCTCTTTTCC GCTGTTGGT

**Figura 2B-1**

1351 TTCAGTPTTG COGATGTTCC TGTAGAAAA GCAGCGAACT ACTCCTGTGA  
 1401 AGATGCAGAC ATCACCTACA GACTTTACAA GACCCTGAGC TTAAACTCC  
 1451 ACGAGGCAGA TCTGGAAAC GTGTTCTACA AGATAGAAAT GCCCCTGTG  
 1501 AACGTGCTTG CACGGATGGA ACTGAACGGT GTGTATGTGG ACACAGAGTT  
 1551 CCTGAAGAA CTCTCAGAAG AGTACGGAAA AAAACTCGAA GAACTGGCAG  
 1601 AGGAAATATA CAGGATAGCT GGAGAGCCGT TCAACATAAA CTCACCGAAG  
 1651 CAGGTTTCAA GGATCCTPTT TGAAAACTC GGCATAAAAC CACGTGGTAA  
 1701 AACGACGAAA ACGGGAGACT ATTCAACACG CATAGAAGTC CTGAGGAAC  
 1751 TTGCCGGTGA ACACGAAATC ATTCCCTCTGA TTCTTGAATA CAGAAAGATA  
 1801 CAGAAATTGA AATCAACCTA CATAGACGCT CTTCCCAAGA TGGTCAACCC  
 1851 AAAGACCGGA AGGATTCATG CTTCTPTCAA TCAAACGGGG ACTGCCCTG  
 1901 GAAGACTTAG CAGCAGCGAT CCAATCTTC AGAACCTCC GACGAAAAGT  
 1951 GABGAGGGAA AAGAAATCAG GAAAGCGATA GTTCTCAGG ATCCAAACTG  
 2001 GTGGATCGTC AGTGCCGACT ACTCCCAAAT AGAACTGAGG ATCTTGCCC  
 2051 ATCTCAGTGG TGATGAGAAAT CPTTGGAGGG CATTGGAAGA GGGCATGAC  
 2101 GTCCACACTC TAACAGCTTC CAGAATATTC AACGTGAAAC CCGAAGAGT  
 2151 AACCGAAGAA ATGCGCCGCG CTGGTAAAT GGTAAATTTT TCCATCATAT  
 2201 ACGGGTAAAC ACCTTACGGT CTGTCTGTGA GGCTTGGAGT ACCTGTGAAA  
 2251 GAAGCAGAAA AGATGATCGT CAACTACTTC GTCTCTACC CAAAGGTGCG  
 2301 CGATTACATT CAGAGGGTCG TATCGGAAGC GAAAGAAAA GGCTATGTTA  
 2351 GAACGCTGTT TGGAAAGAAA AGAGACATAC CACAGCTCAT GGCCCGGGAC  
 2401 AGGAACACAC AGGCTGAAGG AGAACGAATT GCCATAACA CTCOCATACA  
 2451 GGGTACAGCA GCGGATATAA TAAAGCTGGC TATGATAGAA ATAGACAGGG  
 2501 AACTGAAAGA AAGAAAAATG AGATCGAAGA TGATCTACA GGTCCACGAC  
 2551 GAACTGGTPT TTGAAGTCC CAATGAGGAA AAGGACGCGC TCGTCGAGCT  
 2601 GGTGAAAGAC AGAATGACGA ATGTGGTAAA GCTTTCAGTG CCGCTCGAAG  
 2651 TGGATGTAAC CATCGGCAAA ACATGGTCTG GA

## Figura 2B-2

1 MKAMLPLEFEP KGRVLLVDGH HLAYRTFFAL KGLTTSRGEP VQAVYGFSAK  
 51 LLKALKEDGY KAVFVVFDAK APSFRHEAYE AYKAGRPTP EDFFRQLALI  
 101 KELVDLIGFT RLEVPGFEAD DVLATLAKKA EREGYEVRII TADRDLYQLV  
 151 SDRVAVLHPE GHLITPEWLW EKYGLKPBQW VDFRALVGGP SDMLPGVKGI  
 201 GEKTKALKLK EWGSLENILK NLDKVKPESV RERIKAHLED LKLSLELSRV  
 251 RSDLPLEVDF ARREPDREG LRAFLERLEF GSLLHEFGLL EESFPVGYRI  
 301 VKDLVEFEKL IEKLRSPSP AIALATSSLD PFDCCDIVGIS VSFKPKAAYY  
 351 IFLHHRNAQN LDEKEVLKKL KEILEDGAK IVGQNLKFDY KVLMLVGVPEP  
 401 VPPYFDTMIA AYLLEPNEKK FNLDLALKF LGYKMTSYQE LMSFSPPLFG  
 451 FEFADVPVEK AANYSCEDAD ITYRLYKTLK LKLHEADLEN VFYKIEMPLV  
 501 NVLARMELNG VYVDTEFLK LSEYGGKLE ELAEEIYRIA GEFNINSPK  
 551 QVSRILFEKL GIKPRGKPTK TGDYSTRIEV LEBLAGEHEI IFLILEYRKI  
 601 QKTKSTYIDA LPKMWNPKTG RIHASFNQTG TATGRLSSSD FNLQMLPTKS  
 651 BEGKEIRKAI VPQDPNWWIV SADYSQIELR ILAHLSDEN LLRAFEEGID  
 701 VHTLTASRIF NVKPEEVTEE MRRAGKMNPF SIIYGVTYPG LSVRLGVFVK  
 751 EAEKMIYNYP VLYPKVRDYI QRVVSEAKEK GYVRTLFGRK RDIPQLMARD  
 801 RMTQAEGERI AINTPIQGEA ADIIKLAMIE IDRELKERKM RSKMIYQVHD  
 852 ELVFEVPEE KDALVELVKD RMTNKKLSV PLEVDVTIGK TWS

## Figura 3A

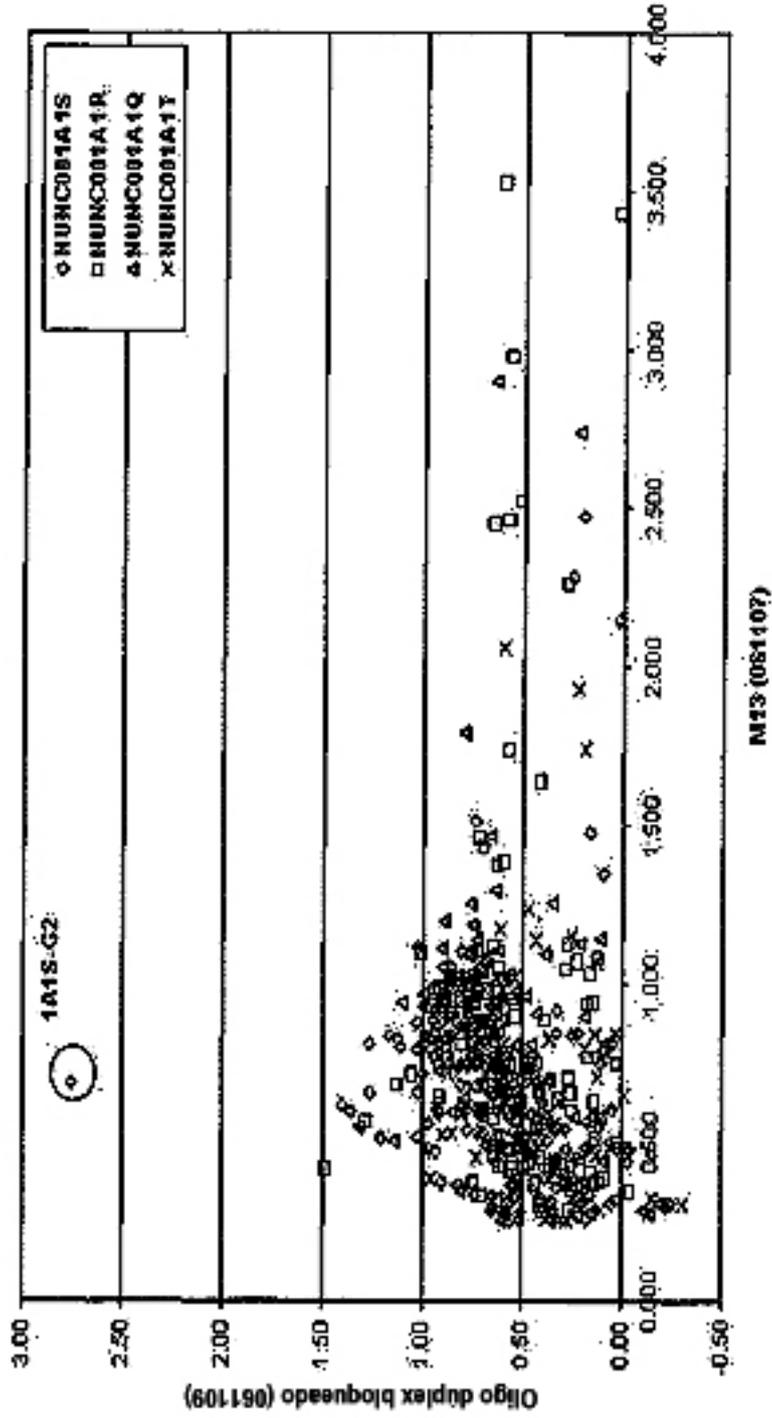
1 ATGAAAGCTA TGTTACCATT APTCGAACCC AAAGGCCGGG TCCTCCTGGT  
 51 GGACGGCCAC CACCTGGCCT ACCGCACCTT CTTGCCCCFG AAGGGCCTCA  
 101 CCACGAGCCG GGGCGAACCG GTGCAGGCGG TTTACGGCTT CGCCAGAGGC  
 151 CTCCTCAAGG CCCTGAAGGA GGACGGGTAC AAGGCCGTCT TCGTGGTCTT  
 201 TGACGCCAAG GCCCCTTCCT TCCGCCACGA GGCTACGAG GCCTACAAGG  
 251 CAGGCCGGC CCCGACCCCC GAGGACTTCC CCCGGCAGCT CGCCCTCCTC  
 301 AAGGAGCTGG TGGACCTCCT GGGGTTTACT CGCCTCGAGG TTCCGGGCTT  
 351 TGAGGCGGAC GACGTCTCTG CCACCCTGGC CAAGAAGGCG GAABGGGAGG  
 401 GGTACGAGGT GCGCATCTCT ACCGCCGACC GGGACCTTTA CCAGCTCGTC  
 451 TCCGACCGCG TCGCCGTCTT CCACCCCGAG GGGCAGCTCA TCACCCCGGA  
 501 GTGGCTTTGG GAGAAGTACG GCCTTAAGCC GGAGCAGTGG GTGGACTTCC  
 551 GCGCCCTCGT GGGGGACCCC TCCGACAACC TCCCCGGGGT CARGGGCATC  
 601 GGGGAGAAGA CCGCCCTCAA GCTCCTCAAG GAGTGGGGAA GCCTGGAAAA  
 651 TATCTCARG AACCTGGAOC GGGTGAAGCC GGAAAGCGTC CGGGAAAGGA  
 701 TCAAGGCCCA CCTGGAAGAC CTTAAGCTCT OCTTGGAGCT TTCCCGGGTG  
 751 CGCTCGGACC TCCCCCTGGA GGTGGACTTC GCCCAGAGGC GGGAGCCTGA  
 801 CCGGGAAGGG CTTGCGGCCT TTTTGGAGCG CTTGGAGTTC GGCAGCCTCC  
 851 TCCACGAGTT CGGCCTTCTA GAGGAGTCCG AACCCGTTGG GTACCGTATA  
 901 GTTAAAGACC TGGTTGAATT TGAAAACTC ATAGAGAAAC TGAGAGAATC  
 951 TCTTCGTTT CCGATCGCTC TTGCGACTAG TTCCCTCGAT CCTTTCGACT  
 1001 GCGACATTGT CCGTATCTCT GTGTCTTTCA AACCAAAGGA AGCGTACTAC  
 1051 ATACCACTCC ATCATAGAAA CGCCCAGAAC CTGGACGAAA AAGAGGTTCT  
 1101 GAAAAAGCTC AABGAAATTC TGGAGGACCC CGGAGCAAAG ATCGTGGTTC  
 1151 AGAATTTGAA ATTCGATTAC AAGGTGTTGA TGGTGAAGGG TGTTGAACCT  
 1201 GTTCTCCTT ACTTCGACAC GATGATAGCG GCTTACCTTC TTGAGCCGAA  
 1251 CGAAAAGAAG TTCAATCTGG ACGATCTCGC ATTGAAATTT CTTGGTATCA  
 1301 AAATGACATC TTACCAAGAG CTCATGTCTT TCTCTTTTCC GCTGTTGGT

## Figura 3B-1

1351 TFCAGTTTTG CCGATGTTCC TGTAAGAAAA GCAGCGAAGT ACTCCTGTGA  
 1401 AGATGCAGAC ATCACCTACA GACTTTACAA GACCCTGAGC TTAAAAGTCC  
 1451 ACGAGGCAGA TCTGGAAAAC GTGTTCTACA AGATAGAAAT GCCCCTTGTG  
 1501 AACGTGCTTG CACGGATGGA ACTGAACGGT GTGTATGTGG ACACAGAGTT  
 1551 CCTGAAGAAA CTCTCAGGAG AGTAAGGAAA AAAACTCGAA GAACTGGCAG  
 1601 AGGAAATATA CAGGATAGCT GGAGAGCCGT TCAACATATA CTCACCGAAG  
 1651 CAGGTTTCAA GGATCCTTTT TGAAAAAGTC GGCATAAAAC CACGTGGTAA  
 1701 AACGACGAAA ACGGGAGACT ATTCAACACG CATAGAAATC CTCGAGGAGC  
 1751 TTGCCGGTGA ACACGAAATC ATTCTCTGTA TTCTTGAATA CAGAAAGATA  
 1801 CAGAAATTGA AATCAACCTA CATAGACGCT CTTCCCAAGA TGGTCAACCC  
 1851 AAAGACCGGA AGGATTCTAT CTTCTTTCAA TCAAAAGGGG ACTGCCACTG  
 1901 GAAGACTTAG CAGCAGCGAT CCCAATCTTC AGAACCTCCG GACGAAAAGT  
 1951 GAAGAGGGAA AAGAAATCAG GAAAGCGATA GTTCTCAGG ATCCAAACTG  
 2001 GTGGATCGTC AGTGCAGACT ACTCCCAAT AGAACTGAGG ATCCTCGCCC  
 2051 ATCTCAGTGG TGATGAGGAT CTTTTGAGGG CATTCGAGA GGGCATCGAC  
 2101 GTCCACACTC TAACAGCTTC CAGAATATTC AACGTGAAAC CCGAAGAAGT  
 2151 AACCGAAGAA ATGCGCCGCG CTGGTAAAT GGTAAATTTT TCCATCATAT  
 2201 ACGGTGTAAC ACCTTACGGT CTGTCTGTGA GGCTTGGAGT ACCTGTGAAA  
 2251 GAAGCAGAAA AGATGATGAT CAACTACTTC GTCTCTACC CAAAGGTGCG  
 2301 CGATTACATT CAGAGGGTCC TATCGGAGC GAAAGAAAAA GGCTATGTTA  
 2351 GAACGCTGTT TGGAAAGAAA AGAGACATAC CACAGCTCAT GGCCCGGGAC  
 2401 AGGAACACAC AGGCTGAGG AGAAGCAATT GCCATAACA CTCCCTACA  
 2451 GGGTACAGCA GCGGATATAA TAAAGCTGGC TATGATAGAA ATAGACAGGG  
 2501 AACTGAAAGA AAGAAAAATG AGATCGAGA TGATCATACA GGTCCACGAC  
 2551 GAACTGGTTT TTGAAGTGCC CAATGAGGAA AAGGACCGCG TCGTCAAGT  
 2601 GGTGAAAGAC AGAATGACGA ATGTGGTAAA GCTTTCAGTG CCGCTCGAAG  
 2651 TGGATGTAAC CATCGGCAAA ACATGGTCTG GA

## Figura 3B-2

**Figura 4** Proporción entre pendiente sobre oligo dúplex bloqueado y pendiente sobre M13 (pendiente de M13 > 0,25)



**Figura 5** Activación de un oligo dúplex bloqueado con 2'-PO4 por GLE y 1000-G2

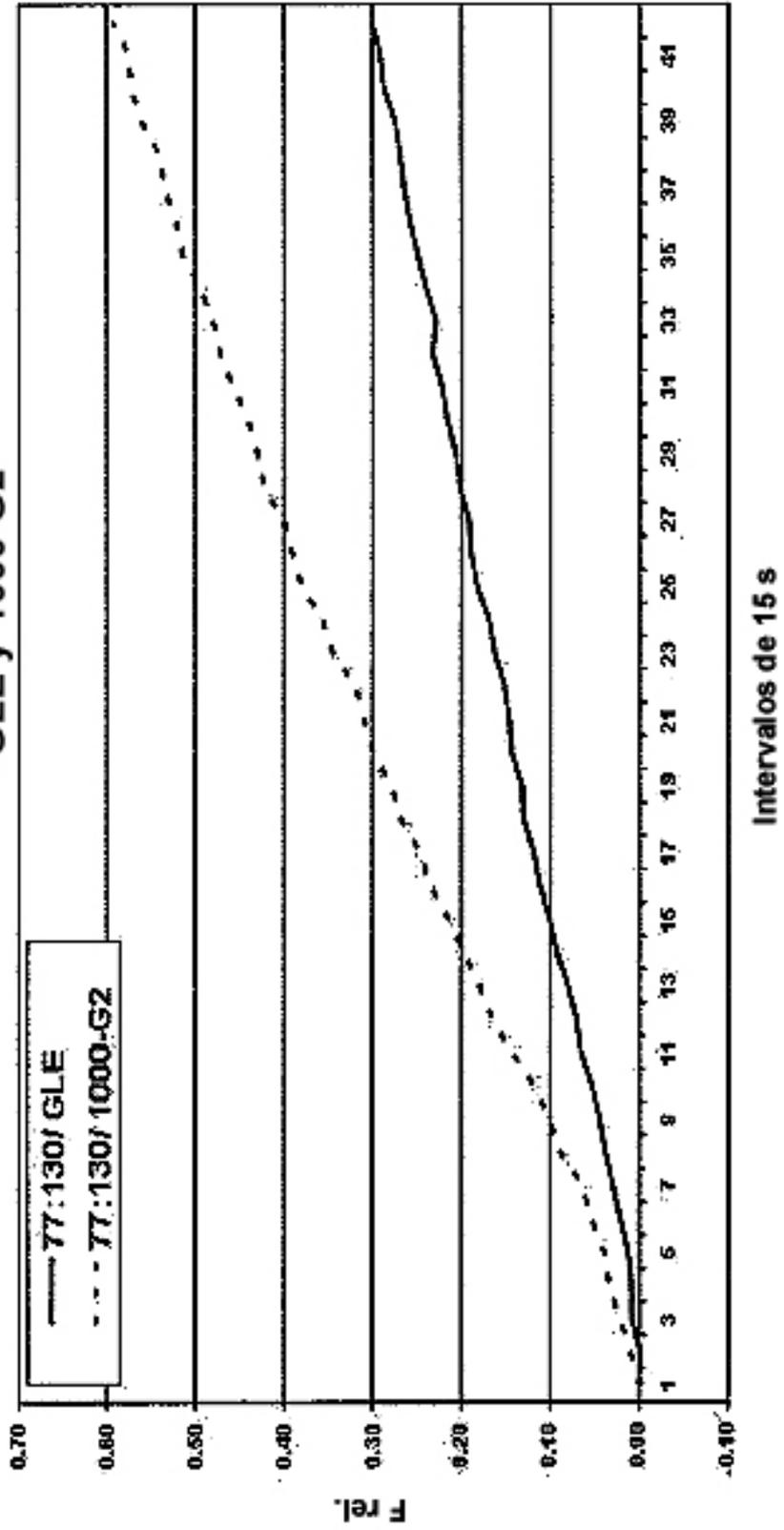


Figura 6

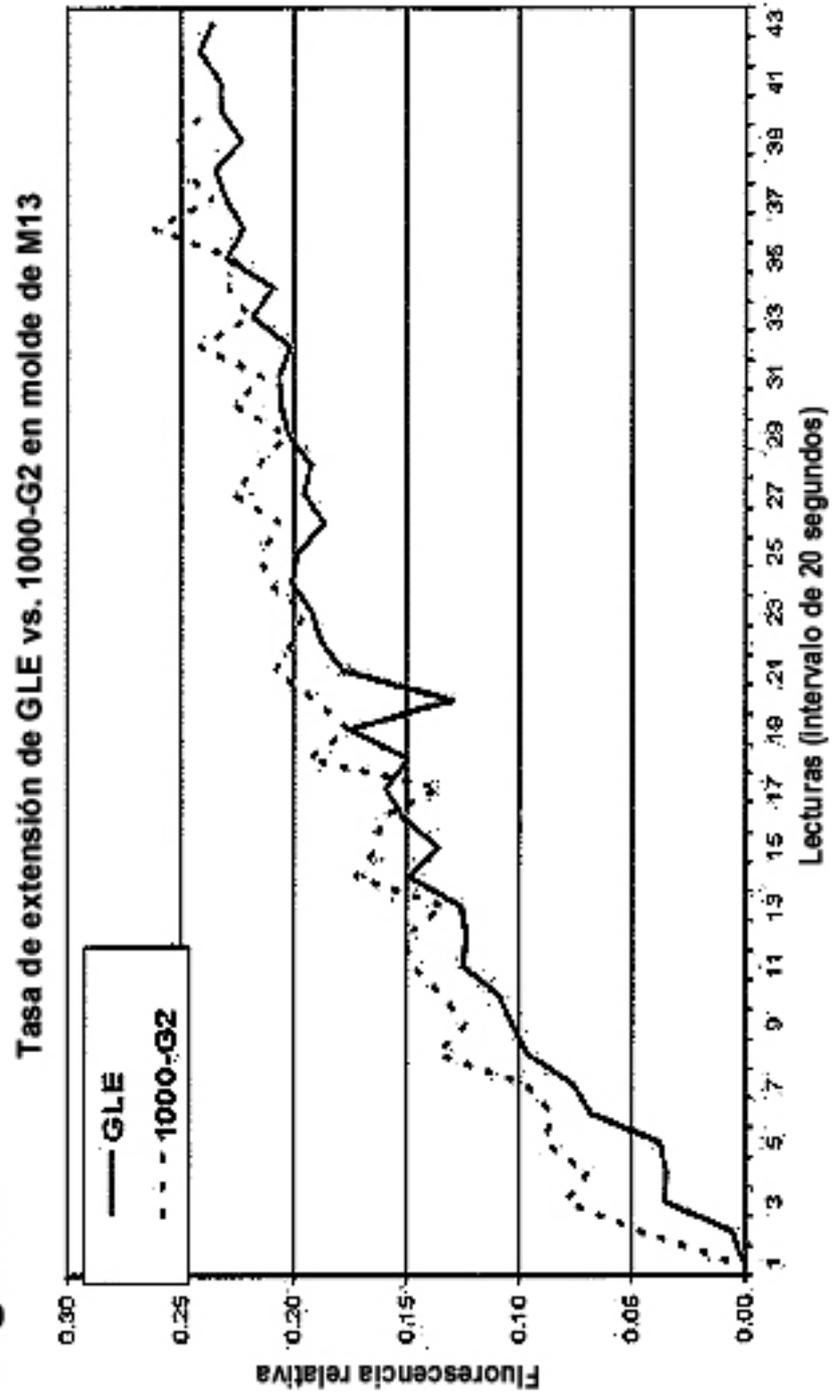
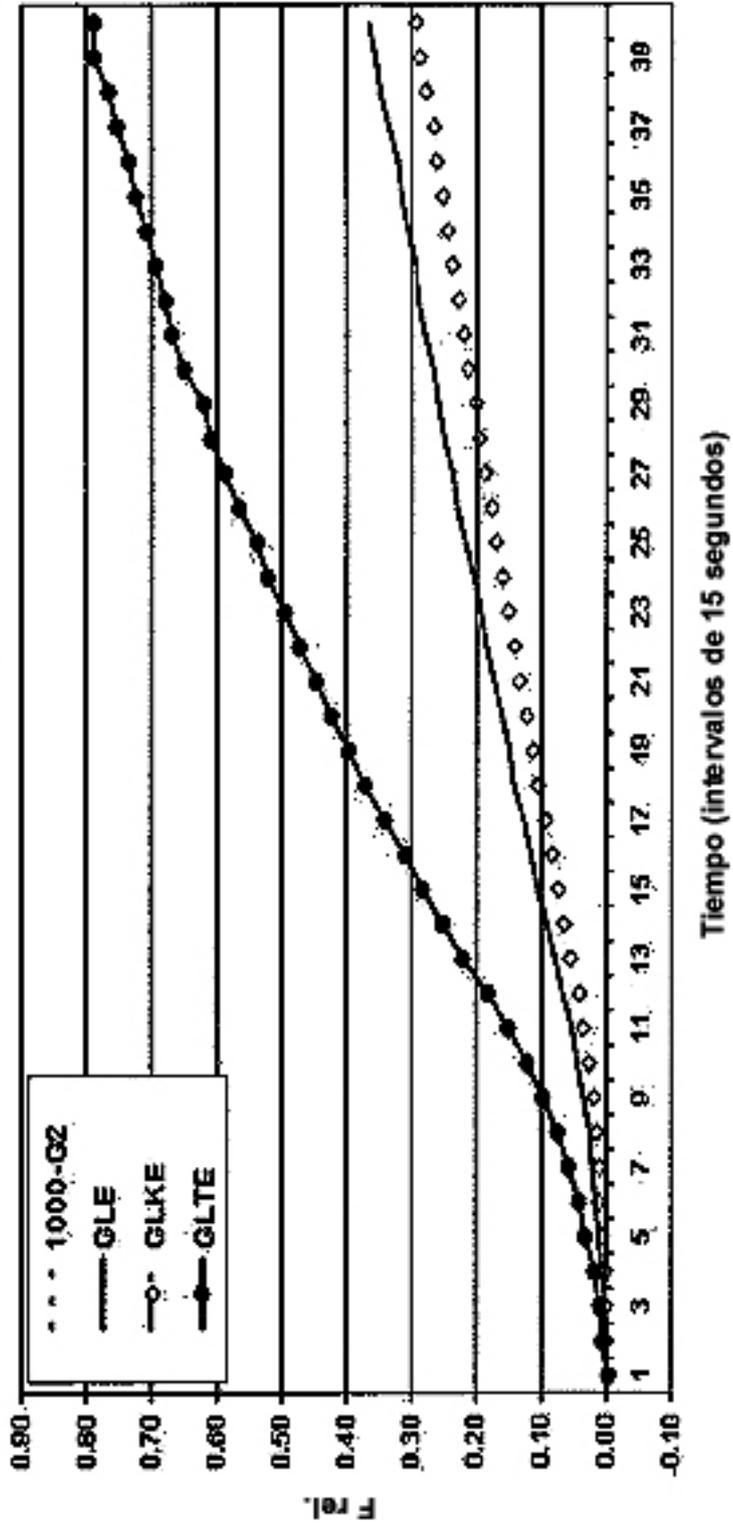


Figura 7

Activación de un oligo dúplex bloqueado con 2'-PO<sub>4</sub> con  
GLE, GLKE, GLTE y 1000-G2



**Figura 8** Activación de un oligo dúplex bloqueado con 2'-PO<sub>4</sub> con GLE, GLDSE, GLTE y GLTDSE

