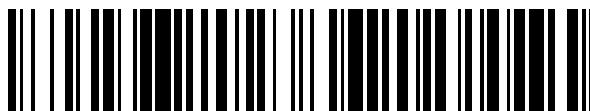


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 662**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/030003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145269**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14762285 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2970922**

54 Título: **Ligasa termoestable de extremos romos y métodos de uso**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361802124 P

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

03.04.2018

73 Titular/es:

**THERANOS, INC. (100.0%)
1701 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

CHRISTIANS, FREDERICK

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 662 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

Ligasa termoestable de extremos romos y métodos de uso

Antecedentes

5 Se conocen una variedad de métodos para la amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (véase, p. ej., Patente de E.E.U.U. N° 4.683.202) es un método popular para la amplificación de ácidos nucleicos. Para llevar a cabo con éxito una reacción de PCR, la reacción debe realizarse a múltiples temperaturas diferentes. Esto requiere hardware u otros mecanismos para cambiar repetidamente la temperatura de la reacción de PCR. Otro método para la amplificación de ácidos nucleicos se conoce como amplificación isotérmica mediada por bucle ("LAMP") (véase, p. ej., Patente de E.E.U.U. N° 6.410.278). Las reacciones LAMP se pueden llevar a cabo isotérmicamente, pero típicamente implican el uso de cuatro cebadores diferentes que reconocen un total de seis secuencias distintas en el ácido nucleico diana.

10 Algunos métodos de amplificación utilizan la ligación de ADN. La ligación de ADN es un método común de biología molecular para unir múltiples fragmentos de ADN. Las ligasas pueden sellar mellas monocatenarias en el ADN dúplex, unir dos trozos con extremos "cohesivos" complementarios, y en algunos casos unir dos trozos con extremos romos no cohesivos. Estos métodos encuentran uso en clonación molecular, diagnóstico/detección de ácidos nucleicos, amplificación de ácidos nucleicos, y actividades relacionadas. Se describen ligasas y métodos de ligación, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de E.E.U.U. N° 7.927.853; de Lumley et al., J. Mol. Biol. (2004) 339, 1059-1075; y Rolland et al., FEMS Microbiol. Lett. (2004) 236, 267-273.

15 Es posible la ligación de dos cadenas de ADN de "extremos cohesivos", donde los sustratos a unir están ya posicionados con antelación en el caso de sellado de la mella de cadena sencilla, y la afinidad de los extremos cohesivos entre sí ayuda a impulsar la ligación del extremo cohesivo. Sin embargo, ya que la ligación de ADN depende de la yuxtaposición de los dos sustratos a unir, la ligación de ADN es más difícil en las situaciones donde la yuxtaposición de los dos sustratos es más difícil, o las cadenas son propensas a alinearse mal o a separarse fácilmente. Por esta razón, las ligaciones de extremos romos y a alta temperatura son dos tipos de ligación que son particularmente difíciles. Sin embargo, la ligación de extremos romos depende de interacciones aleatorias de los sustratos. Comúnmente se hacen dos ajustes en la ligación de extremos romos para dar lugar a las interacciones de sustrato: baja temperatura para disminuir el movimiento molecular por lo que las interacciones al azar duren más tiempo y así dar a la ligasa una mejor oportunidad de unirse a los fragmentos; y reactivos de hacinamiento molecular, como polietilenglicol para aumentar las concentraciones locales de los sustratos. Del mismo modo, las ligaciones a alta temperatura son un reto debido a que las interacciones de los sustratos de ADN son más breves. El caso menos eficiente es, por lo tanto, una ligación de extremos romos a alta temperatura en la que no se pueden usar reactivos de hacinamiento molecular.

20 Se ha descrito una ligasa termoestable, ADN ligasa T4, que puede realizar ligaciones de extremos romos; sin embargo, se inactiva a temperatura por encima de aproximadamente 45°C, de modo que el intervalo de temperatura a la que la ADN ligasa T4 es estable es relativamente pequeño. Se conocen algunos otros ejemplos de ligasas que se pueden inducir a unir fragmentos de extremos romos, pero estas ligasas parecen hacerlo solo en presencia de altas concentraciones de agentes de hacinamiento como polietilenglicol (PEG) al 50%. Sin embargo, la utilidad de las ligasas que requieren tales agentes de hacinamiento no está clara, ya que el PEG al 50% que polimeriza ADN (que se requiere para la amplificación de ADN).

25 WO2011/034449 describe proteínas de fusión entre dominios de unión de ADN y ADN-ligasas capaces de realizar ligaciones de extremos romos. Está presente en las proteínas de fusión un marcador de His N-terminal adicional. También está prevista en la descripción la presencia de un espaciador o enlazador entre los dominios. Las proteínas de fusión resultantes tienen una actividad de ligación de extremos romos aumentada, probada a temperaturas por debajo de 60°C.

30 Por consiguiente, con el fin de facilitar la generación de ácidos nucleicos para las muchas y crecientes aplicaciones que usan ácidos nucleicos amplificados, se desean nuevos métodos y reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos.

Compendio

35 Se proporcionan proteínas de fusión que tienen una actividad ligasa de extremos romos termoestable. Dichas ligasas de extremos romos termoestables son útiles para amplificación, secuenciación de ADN, producción de ADN recombinante (p. ej., como resultado de tales fusiones de extremos romos) y proteínas de fusión recombinantes (p. ej., proteínas codificadas por ADN recombinante producido como resultado de fusiones de extremos romos), y para otros fines. Muchos esquemas de biología molecular implican ligasas; tales esquemas se beneficiarían de al menos una temperatura de incubación elevada, como de una incubación a aproximadamente 60-65°C o mayor, que incluye esquemas de incubación a temperaturas tan altas como aproximadamente 94°C. Una ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria sería útil para tales esquemas.

Además, las ligasas de extremos romos termoestables como se describen en esta memoria pueden permitir la

ligación de extremos romos a alta temperatura sin la necesidad de agentes de hacinamiento molecular. Por consiguiente, la ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria puede ser útil para muchos esquemas de ligación-amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen esquemas de ligación-amplificación de ácido nucleico que operan a una temperatura uniforme (p. ej., a aproximadamente 60°C o más), y que incluyen esquemas de ligación-amplificación de ácido nucleico que requieren ciclos de temperatura como el ciclo de, p. ej., aproximadamente 94°C a aproximadamente 60°C (o más) para uno, dos, tres, o más ciclos. Los esquemas de ligación-amplificación de ácido nucleico que pueden beneficiarse del uso de ADN ligasas de extremos romos termoestables descritas en esta memoria pueden también funcionar a otras temperaturas, p. ej., dependiendo de las características de resistencia a la temperatura de las nuevas proteínas de fusión descritas en esta memoria y los requisitos de la diferencia de esquemas de ligación-amplificación de ácido nucleico. Las ADN ligasas de extremos romos termoestables descritas en esta memoria proporcionan la capacidad de usar altas temperaturas en esquemas de ligación-amplificación de ácido nucleico y de este modo permitir una mayor amplificación de alta especificidad de la diana, por ejemplo, permitiendo la desnaturalización por temperatura de los moldes de ADN de doble cadena, así como la unión específica del cebador.

Por consiguiente, el Solicitante describe una ligasa de ácido nucleico de extremos romos termoestable que comprende una proteína de fusión que comprende una ligasa de ácido nucleico y una proteína de unión de ácido nucleico, en donde dicha ligasa de ácido nucleico de extremos romos termoestable es adecuada para usar en una reacción de ligación de ácido nucleico de extremos romos realizada a una temperatura elevada. En realizaciones, una temperatura elevada comprende una temperatura a aproximadamente 60°C o más. En realizaciones, una elevada temperatura comprende una temperatura de aproximadamente 65°C, o aproximadamente 70°C, o aproximadamente 75°C, o aproximadamente 80°C, o aproximadamente 85°C, o aproximadamente 90°C, o aproximadamente 95°C, o más alta. El Solicitante describe además un artículo de fabricación, que comprende una ligasa de ácidos nucleicos de extremos romos termoestable, y un recipiente. En realizaciones, el artículo de fabricación comprende además un tampón. El Solicitante describe además un método de ligación de ácidos nucleicos de extremos romos a una elevada temperatura, que comprende usar una ligasa de ácido nucleico de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria, en donde el uso puede ser a temperatura de aproximadamente 60°C o más. El Solicitante describe además un dispositivo para analizar una muestra que contiene ácidos nucleicos, que comprende una ligasa de ácido nucleico de extremos romos termoestable que comprende una proteína de fusión que comprende una ligasa de ácido nucleico y una proteína de unión a ácido nucleico, en donde dicha una ligasa de ácido nucleico de extremos romos termoestable es adecuada para usar en una reacción de ligación de ácido nucleico de extremos romos realizada a aproximadamente 60°C o más.

En realizaciones, el Solicitante describe en esta memoria una ADN ligasa de extremos romos termoestable que comprende una proteína de fusión que comprende una ADN ligasa y una proteína de unión a ADN, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos es adecuada para usar en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a una elevada temperatura, por ejemplo, a una temperatura de 60°C o más. En realizaciones, la ADN ligasa de extremos romos termoestable comprende la ADN ligasa T4 con una fusión N-terminal de p50.

En una realización particular, la ADN ligasa de extremos romos termoestable comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1):

```

mghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfryvcegshggplgasseknkksypqvkicny
vgpakvivvqlvtngknihlhahslvgkhcedgictvtgpkdmvvgfanlgilhvtkkvfetlearnateacirgy
npgllvhpdlaylqaegggdrqldrekelirqaalqqtkemdlsvvrlmftafipdstgsfrrlepvsdaiysdk
apnasnkivrmrdtagcvtggeeiylldckvqkddiqirfyeeenggvwegfgdfspdvhrqfaivfktpkyy
dinitkpasvfvqlrrksdletsepkpflyypeikdkeevqrkrqkssgsggsggsgmtleearkvrnelrliry
hnyryyvldapeisdaeydrllrelkeleerfpelkspdsptlqvgarpleatfrvrhptrmysldnafndelkafe
erialgrkqpfaytvehkvdglsvnlyyeeegvlygatrgdgevgeevtqnlltiptiprllkgvperlevrgev
mpieaflrlneeleergerifknprnaaagslrqkdpritakgrlatfyalglgleeveregvatqfallhwkekgfp
vehgyaravgaegveavyqdwlkrralpfeadgvvkldeallwrelgytaraprfaiaykfpaeeketrlldiv
fqvgrtrvtpvgilepvflegsevsrvtlhnesyieeldirigdwwlvhkaggvipevlrvlkerrtgeerpwpet
cpeghrllkegkvhrpcnplcpakrfeairhfaskamdiqglgeklierllekgvlkdvadlyrlrkedlvglerm
geksaqlnrqieeskkrglerllyalglpgvgevlamlaarfngmdrilleasleelleveevgeltaraitetldkpafr
dlvrrlkeagvemeakekggealkglftvitgelsrpreevkallrrlgakvtdsvsrktsylvgenpssklekaral
gvptlteeelyrllartgkkaeelv.
    
```

Una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria puede comprender una

proteína de fusión que comprende un componente seleccionado de un péptido enlazador, una adición N-terminal, una adición C-terminal, un péptido marcador, un D-aminoácido, y un péptido mimético. En realizaciones, una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria comprende una proteína de fusión que comprende un componente seleccionado de un azúcar y un polímero.

5 En realizaciones, una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria es adecuada para usar en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a aproximadamente 75°C.

En realizaciones, una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria es capaz de producir concatámeros en múltiples eventos de ligación en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a aproximadamente 60°C o más.

10 En realizaciones, la ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria es adecuada para usar en un esquema de amplificación de ácido nucleico que funciona a una temperatura uniforme de aproximadamente 60°C o más.

En realizaciones, la ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria es adecuada para usar en un esquema de amplificación de ácido nucleico que comprende ciclos de temperatura. En realizaciones, dichos ciclos de temperatura comprenden ciclos de temperatura a temperaturas de aproximadamente 60°C o más. En realizaciones, dichos ciclos de temperatura comprenden ciclos de temperatura de aproximadamente 94°C a aproximadamente 60°C. En realizaciones, dichos ciclos de temperatura comprenden dos o más ciclos de ciclos de temperatura, y, en realizaciones, comprende tres o más ciclos de ciclos de temperatura.

20 El Solicitante describe además un método de ligación de ADN de extremos romos a temperatura elevada, que comprende usar una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria, en donde el uso puede ser a una elevada temperatura. En realizaciones, una elevada temperatura comprende una temperatura de aproximadamente 60°C o más. En realizaciones, una elevada temperatura comprende una temperatura de aproximadamente 75°C; y, en realizaciones adicionales, puede comprender una temperatura mayor de aproximadamente 75°C.

25 El Solicitante describe en esta memoria un artículo de fabricación, que comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable y un recipiente, en donde la ADN ligasa de extremos romos termoestable es una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria. En realizaciones, el artículo de fabricación comprende además un tampón.

30 El Solicitante describe en esta memoria un dispositivo para analizar una muestra que contiene ADN, que comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable, en donde la ADN ligasa de extremos romos termoestable es una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se describe en esta memoria.

Breve descripción de la figura

35 La Fig. 1 muestra un ejemplo de los resultados de una reacción de ligación de extremos romos realizada a 75°C que usa una ADN ligasa de extremos romos termoestable como se proporciona en esta memoria. El sustrato de ADN era un ADN dúplex de 49 pb preparado mediante hibridando los oligonucleótidos EE0139 (SEQ ID NO: 20) y EE0140 (SEQ ID NO: 21).

Descripción detallada

40 Se proporcionan en esta memoria ligasas de extremos romos termoestables. Como se describe en esta memoria, se puede preparar una ligasa de extremos romos termoestable mediante la fusión de una proteína de unión a ADN con una ligasa termoestable. Dichas ligasas producidas mediante estas fusiones tienen características y capacidades no proporcionadas por sus compuestos originales solos; las diferentes porciones de estas proteínas de fusión proporcionan actividades que, cuando se combinan, proporcionan nuevas capacidades y una actividad inesperadamente mejorada. La porción de proteína de unión a ADN de tales proteínas de fusión es eficaz para aumentar la afinidad de la ligasa a sustratos de ADN, lo que da como resultado una ligación mejorada en las difíciles condiciones de ligación de extremos romos a alta temperatura. La porción de ADN ligasa retiene sorprendentemente su capacidad de ligar ADN cuando se combina con una proteína extraña (la porción de proteína de unión de ADN). Juntas, las porciones combinadas se unen en nuevas proteínas de fusión que son capaces de ligar sustratos de ADN de extremos romos incluso a altas temperaturas, proporcionando una actividad de ligación aumentada a altas temperaturas no disponible mediante el uso de las ligasas no modificadas originales.

50 Definiciones

Antes de que se divulguen y describan las nuevas ligasas y métodos de ligación presentes, se debe entender que la terminología usada en esta memoria tiene el propósito de describir realizaciones solamente particulares y no pretende ser limitante. También debe entenderse que la presente descripción proporciona descripciones y ejemplos explicativos y ejemplares, de modo que, a menos que se indique lo contrario, las moléculas, composiciones, ensayos, métodos y kits descritos en esta memoria no están limitados a las realizaciones específicas descritas en

esta memoria.

Debe observarse que, como se usa en la especificación y reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una sal” se refiere a una única sal o mezclas de sales diferentes, y similares.

- 5 Como se usa en la descripción en esta memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, el significado de “en” incluye “en” y “sobre” a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Como se usa en la descripción en esta memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, el significado de “o” incluye tanto la conjuntiva como la disyuntiva a menos que el contexto indique expresamente lo contrario. Por lo tanto, el término “o” incluye “y/o” a menos que el contexto indique expresamente lo contrario.

- 10 En esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos, que se definirán con los siguientes significados:

El término “fracción” como se usa en esta memoria se refiere a cualquier composición particular de materia, por ejemplo, un fragmento molecular, una molécula intacta o una mezcla de materiales.

- 15 El término “ácido nucleico” se refiere a nucleótidos y nucleósidos que constituyen, por ejemplo, macromoléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y macromoléculas de ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos se pueden identificar por la base unida al azúcar (p. ej., deoxirribosa o ribosa); como se usa en esta memoria, se usan las siguientes abreviaturas para estas bases para representar ácidos nucleicos en listados de secuencia que identifican y describen sus estructuras (pueden usarse tanto mayúsculas como minúsculas).

Tabla 1A

| Base (en Ácido Nucleico) | Código de Letra |
|--------------------------|-----------------|
| Adenina | A |
| Timina | T |
| Guanina | G |
| Citosina | C |
| Uracilo | U |

- 20 Como se usa en esta memoria, un “polinucleótido” se refiere a una cadena polimérica que contiene dos o más nucleótidos. Los “polinucleótidos” incluyen cebadores, oligonucleótidos, cadenas de ácidos nucleicos, etc. Un polinucleótido puede contener nucleótidos estándar o no estándar. Típicamente, un polinucleótido contiene un fosfato 5' en un extremo (“5' terminal”) y un grupo 3' hidroxilo en el otro extremo (“3' terminal”) de la cadena. El nucleótido más 5' de un polinucleótido se puede referir en esta memoria como el “nucleótido 5' terminal” del polinucleótido. El nucleótido más 3' de un polinucleótido se puede denominar en esta memoria como el “nucleótido 3' terminal” del polinucleótido.

- 25 El término “corriente abajo” como se usa en esta memoria en el contexto de un polinucleótido que contiene un nucleótido 5' terminal y un nucleótido 3' terminal se refiere a una posición en el polinucleótido que está más cerca del nucleótido 3' terminal que una posición de referencia en el polinucleótido. Por ejemplo, en un cebador que tiene la secuencia: 5' ATAAGC 3', la “G” está corriente debajo de la “T” y todas las “A”s.

- 30 El término “corriente arriba” como se usa en esta memoria en el contexto de un polinucleótido que contiene un nucleótido 5' terminal y un nucleótido 3' terminal se refiere a una posición en el polinucleótido que está más cerca del nucleótido 5' terminal que una posición de referencia en el polinucleótido. Por ejemplo, en un cebador que tiene la secuencia: 5' ATAAGC 3', la “T” está corriente arriba de la “G”, la “C”, y las “A”s más cercanas.

- 35 Como se usa en esta memoria, “ácido nucleico” incluye tanto ADN como ARN, que incluye ADN y ARN que contienen nucleótidos no estándar. Un “ácido nucleico” contiene al menos un polinucleótido (una “cadena de ácido nucleico”). Un “ácido nucleico” puede ser de cadena sencilla o de cadena doble.

- 40 Como se usa en esta memoria, una molécula de ácido nucleico que se describe que contiene la “secuencia” de un molde u otro ácido nucleico se puede también considerar que contiene el molde u otro ácido nucleico en sí mismo (p. ej., una molécula que se describe como que contiene la secuencia de un molde también puede describirse como que contiene el molde), a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usa en esta memoria, un ácido nucleico o molécula “diana” se refiere a un ácido nucleico de interés. Una

molécula/ácido nucleico diana puede ser de cualquier tipo, que incluye ADN o ARN de cadena sencilla o de cadena doble (p. ej., mRNA).

5 Como se usa en esta memoria, secuencias “complementarias” se refieren a dos secuencias de nucleótidos que, cuando están alineadas entre sí de forma antiparalela, contienen múltiples bases de nucleótidos individuales que se aparean entre sí. No es necesario que se emparejen entre sí cada base de nucleótido en dos secuencias para que las secuencias se consideren “complementarias”. Se pueden considerar secuencias complementarias, por ejemplo, si al menos el 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o el 100% de bases de nucleótidos en las dos secuencias se emparejan entre sí. Además, se pueden considerar todavía secuencias “complementarias” cuando las longitudes totales de las dos secuencias son significativamente diferentes entre sí. 10 Por ejemplo, un cebador de 15 nucleótidos se puede considerar “complementario” a un polinucleótido más largo que contiene cientos de nucleótidos si se emparejan múltiples bases individuales del cebador con bases de nucleótidos en el polinucleótido más largo cuando el cebador está alineado de forma antiparalela a una región particular del polinucleótido más largo.

15 Como se usa en esta memoria, el término “aislado” aplicado a proteínas, ácidos nucleicos u otras biomoléculas se refiere a una molécula que se ha purificado o separado de un componente de su entorno natural (p. ej., una proteína purificada de una célula en la que se produjo de forma natural). Una molécula “aislada” puede estar en contacto con otras moléculas (por ejemplo, como parte de una mezcla de reacción). Como se usa en esta memoria, las moléculas “aisladas” también incluyen proteínas producidas de forma recombinante o ácidos nucleicos que tienen una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que se producen de forma natural. Los ácidos nucleicos “aislados” 20 incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos contenidas en células que habitualmente expresan el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales. En algunas realizaciones, los polipéptidos “aislados” se purifican a al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 100% de homogeneidad como se evidencia mediante SDS-PAGE de los polipéptidos seguido de tinción con azul de Coomassie, plata, u otro método de tinción de proteínas.

25 Los términos “polipéptido” y “proteína” pueden usarse indistintamente para referirse a moléculas compuestas que comprenden aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos individuales se pueden denominar “residuos” de un polipéptido o proteína. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos descritos en esta memoria pueden identificarse por SEQ ID NO: presentada como una cadena de letras, donde las letras tienen los siguientes significados:

30 Tabla 1B

| Aminoácido | Código de 3 letras | Código de 1 letra |
|-----------------|--------------------|-------------------|
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Cisteína | Cys | C |
| Ácido glutámico | Glu | E |
| Glutamina | Gln | Q |
| Glicina | Gly | G |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys | K |
| Metionina | Met | M |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |

ES 2 661 662 T3

| | | |
|------------|-----|---|
| Treonina | Thr | T |
| Triptófano | Trp | W |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Valina | Val | V |

Los residuos de aminoácidos producidos de forma natural se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 - 5 (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr;
 - (3) ácidos: asp, glu;
 - (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 - (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
 - (6) aromáticos: trp, tyr, phe.
- 10 “Idéntico” o “identidad” como se usa en esta memoria en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, puede significar que las secuencias tienen un porcentaje de especificidad de residuos que son iguales en una región específica. Se puede calcular el porcentaje por alineamiento óptimo de las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región especificada, determinado el número de posiciones en las que se da el residuo idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número
- 15 de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. En los casos donde las dos secuencias son de diferentes longitudes o el alineamiento produce uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluye solo una secuencia única, se incluyen los residuos de la secuencia única en el denominador pero no en el numerador del cálculo.
- 20 “Homología” u “homólogo” como se usa en esta memoria en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, pueden significar que las secuencias tienen un porcentaje específico de residuos que son i) iguales, o ii) sustituciones conservativas del mismo residuo, sobre una región especificada. Las sustituciones conservativas incluyen sustituciones de un aminoácido por un aminoácido del mismo grupo, e incluyen sustituciones de un aminoácido identificado en la Tabla 1C como una sustitución ejemplar o preferida. Al determinar la homología
- 25 de dos secuencias, los residuos idénticos y los residuos homólogos tienen el mismo peso. El porcentaje puede calcularse alineando de forma óptima las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región especificada, determinando el número de posiciones en las que se dan residuos idénticos u homólogos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el
- 30 porcentaje de homología de secuencia. En los casos donde las dos secuencias son de diferentes longitudes o el alineamiento produce uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluye solo una secuencia única, se incluyen los residuos de la secuencia única en el denominador pero no en el numerador del cálculo.
- 35 Los polipéptidos variantes o modificados se pueden preparar sustituyendo uno o más residuos de aminoácidos por uno o más residuos de aminoácidos diferentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Las sustituciones conservativas implicarán el intercambio de un miembro de un grupo por otro miembro del mismo grupo; tales cambios tienden a no afectar significativamente a la función de un polipéptido. Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro grupo. Pueden realizarse modificaciones
- 40 sustanciales de polipéptidos sin afectar significativamente a las características funcionales de un polipéptido seleccionando sustituciones que mantienen una o más de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.
- 45 En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservativas de interés en la Tabla 1C bajo los títulos de “sustituciones ejemplares” y “sustituciones preferidas”. Dichas sustituciones conservativas pueden no dar lugar a cambios significativos en la actividad biológica.

Tabla 1C

| Residuo original | Sustituciones ejemplares | Sustituciones preferidas |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Ala (A) | val; leu; ile | val |
| Arg (R) | lys; gln; asn | lys |
| Asn (N) | gln; his; lys; arg | gln |
| Asp (D) | glu | glu |
| Cys (C) | ser | ser |
| Gln (Q) | asn | asn |
| Glu (E) | asp | asp |
| Gly (G) | pro; ala | ala |
| His (H) | asn; gln; lys; arg | arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; norleucina | leu |
| Leu (L) | norleucina; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn | arg |
| Met (M) | leu; phe; ile | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | leu |
| Pro (P) | ala | ala |
| Ser (S) | thr | thr |
| Thr (T) | ser | ser |
| Trp (W) | tyr; phe | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; norleucina | leu |

- 5 Se pueden realizar sustituciones adicionales, y se pueden identificar sustituciones adecuadas mediante análisis de escaneo de aminoácidos, en el que se sustituye un único aminoácido, o muy pocos aminoácidos, de una secuencia inicial. Entre los aminoácidos de escaneo preferidos se encuentran aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. La alanina es el aminoácido de escaneo típicamente preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)].
- 10 Además, se pueden sustituir uno o más aminoácidos en una secuencia por un aminoácido no convencional. Los reemplazamientos conservadores que comprenden aminoácidos no convencionales sustituyen el aminoácido original por un aminoácido no convencional que se parece al original en una o más de sus propiedades características (p. ej., carga, hidrofobicidad, volumen estérico; por ejemplo, se puede reemplazar Val con Nval). El término "aminoácido no convencional" se refiere a aminoácidos distintos de los aminoácidos convencionales, e
- 15 incluyen, por ejemplo, isómeros y modificaciones de los aminoácidos convencionales (p. ej., D-aminoácidos), aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados post-traduccionalmente, aminoácidos enzimáticamente modificados, constructos o estructuras diseñados para imitar aminoácidos (p. ej., aminoácidos .alfa., .alfa.-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, .beta.-alanina, naftilalanina, 3-piridilalanina, 4-hidroxi prolina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilisina, y norleucina), y péptidos que tienen el enlace amida natural --CONH-- reemplazado en uno o más sitios dentro del esqueleto peptídico con un enlace no
- 20 convencional como enlaces amida N-sustituida, éster, tioamida, retropéptido (--NHCO--), retrotioamida (--NHCS--), sulfonamido (--SO.sub.2 NH--), y/o enlaces peptoides (glicina N-sustituida).

Se puede proporcionar a las proteínas homólogas y otras variantes de proteínas sustitución, inserción, supresión, o

adición. Dicha sustitución, inserción, supresión o adición puede incluir sustitución, inserción, supresión, o adición de un único residuo; puede incluir sustitución, inserción, supresión, o adición de dos residuos; y puede incluir sustitución, inserción, supresión, o adición de tres, o de más residuos. Por ejemplo, la sustitución puede incluir reemplazar uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más residuos de aminoácidos por un residuo diferente. La sustitución puede ser, o puede incluir, una sustitución conservadora. Por ejemplo, la inserción puede incluir insertar uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más residuos de aminoácidos dentro de una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la supresión puede incluir suprimir uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la adición puede incluir añadir uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal, o en ambos, de una secuencia de aminoácidos.

Una composición puede incluir un tampón. Los tampones incluyen, sin limitación, tampones fosfato, citrato, amonio, acetato, carbonato, tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido N-(2-Acetamido)-iminodiacético (ADA), piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), cloruro de colamina, ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico (TES), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico (HEPES), acetamidoglicina, tricina (N-(2-Hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina), glicinamida, y bicina (ácido 2-(Bis(2-hidroxietil)amino)acético). Los tampones incluyen otros tampones de ácidos orgánicos además de los tampones fosfato, citrato, amonio, acetato, y carbonato mencionados explícitamente en esta memoria.

Un artículo de fabricación puede comprender un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en donde la composición comprende una ligasa termoestable. Un artículo de fabricación puede comprender un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en donde la composición comprende una ligasa de extremos romos. Un artículo de fabricación puede comprender un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en donde la composición comprende una ligasa de extremos romos termoestable. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales como vidrio o plástico, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, un recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El artículo de fabricación puede comprender además una etiqueta o prospecto inserto en o asociado al recipiente que indica que la composición puede usarse para ligar ADN de extremos romos.

Las realizaciones de los métodos y composiciones proporcionadas en esta memoria se pueden describir con referencia a la Figura 1.

Las nuevas ADN ligasas de extremos romos termoestables descritas en esta memoria se componen de la fusión de una proteína de unión a ADN con una ligasa termoestable. Dichas proteínas de fusión como se describen en esta memoria pueden comprender además otros componentes, como, por ejemplo, enlazadores peptídicos, adiciones N-terminales o C-terminales, péptidos marcadores, y otras secuencias de aminoácidos, que incluyen D-aminoácidos y péptido miméticos. Además, la proteína de fusión como se describe en esta memoria puede además comprender otros componentes, como, por ejemplo, azúcares (p. ej., las proteínas de fusión pueden estar glicosiladas), polímeros como polietilenglicol (p. ej., las proteínas de fusión pueden estar PEGiladas), fracciones orgánicas distintos de aminoácidos, y otras adiciones unidas a las proteínas de fusión. La porción de proteína de unión a ADN aumenta la afinidad de la ligasa a los sustratos de ADN, lo que da como resultado una unión mejorada en las difíciles condiciones de ligación de extremos romos a alta temperatura. Son posibles muchas combinaciones de proteínas de unión y ligasas. Por ejemplo, la proteína de unión puede ser N-terminal o C-terminal en relación con la ligasa.

Se entenderá que se pueden unir múltiples combinaciones de ADN ligasas y proteínas de unión a DBA para producir las proteínas de fusión descritas en esta memoria. Por ejemplo, se han construido las siguientes 16 combinaciones (Tabla 2):

45

Tabla 2

Proteínas de fusión construidas

| Construido | N-terminal | C-terminal |
|------------|------------|------------|
| pEE0208 | CTF | T4 |
| pEE0209 | CTF | Tth |
| pEE0210 | CTF | Pfu |
| pEE0211 | CTF | Pfu C23 |
| pEE0212 | T4 | CTF |
| pEE0213 | Tth | CTF |
| pEE0214 | Pfu | CTF |
| pEE0215 | Pfu C23 | CTF |
| pEE0216 | p50 | T4 |
| pEE0217 | p50 | Tth |
| pEE0218 | p50 | Pfu |
| pEE0219 | p50 | Pfu C23 |
| pEE0220 | T4 | p50 |
| pEE0221 | Tth | p50 |
| pEE0222 | Pfu | p50 |
| pEE0223 | Pfu C23 | p50 |

5 * Las celdas que carecen de color de fondo se refieren a la proteína de unión a ADN. Las descripciones de CFT y p50 se dan más adelante.

* Las celdas que tienen un fondo gris se refieren a la ligasa. T4= Fago T4; Tth= Thermus thermophilus, Pfu= Pyrococcus furiosus, Pfu C23= Pfu con una supresión del aminoácido 23 C-terminal.

10 Son posibles variaciones adicionales, que incluyen: (1) proteínas de unión a ADN diferentes, que incluyen proteínas termoestables; (2) otras ADN ligasas, que incluyen variantes de ADN ligasa T4 diseñadas para ser termoestables; (3) múltiples proteínas de unión a ADN por ligasa, o múltiples ligasas por proteína de unión a ADN, (4) enlaces transitorios no covalentes entre la ligasa y la proteína de unión a ADN, en lugar de una proteína de fusión, para permitir mejor los eventos de ligación múltiple por molécula de ligasa; (5) dímeros o multímeros de orden superior de proteínas de fusión para aumentar la concentración local de la ligasa una vez que los sustratos de ADN están unidos; (6) diferentes grados de afinidad entre el sustrato de ADN y la proteína de unión a ADN- por ejemplo, usando la secuencia diana natural de p50, GGGAATCCC (SEQ ID NO: 6), en el ADN diana, para permitir una baja afinidad picomolar; (7) otras enzimas modificadoras de ácido nucleico en lugar de ADN ligasa para realizar otras reacciones moleculares.

20 Un método ejemplar para producir las proteínas de fusión descritas en esta memoria puede ser el siguiente. Se pueden preparar proteínas de fusión induciendo a que E. coli exprese constructos de ADN preparados mediante métodos de ADN recombinante estándar, seguido de métodos de purificación de proteínas cromatográficos estándar. Se puede emplear un marcador de afinidad como polihistidina para ayudar en la purificación de la proteína. En el caso de proteínas termoestables, la purificación puede ser asistida empleando calor para desnaturar la mayoría de las proteínas del huésped de E. coli. La proteína de fusión purificada se puede usar de la misma manera que se usaría una ligasa estándar no termoestable en la aplicación/reacción de la elección, por ejemplo, en un esquema que depende de la ligación de sustratos de ADN para hacer un molde para amplificación.

30 Los métodos descritos en esta memoria pueden incorporarse y usarse fácilmente en un dispositivo para procesar una muestra, o un sistema para procesar una muestra, que puede ser un dispositivo de ensayo automatizado, o puede ser un sistema de ensayo automatizado. Tales dispositivos de ensayo y sistemas de ensayo descritos pueden comprender dispositivos y sistemas descritos, por ejemplo, en la Patente de E.E.U.U. 8.088.593; la Patente de E.E.U.U. 8.380.541; en la Publicación de Patente de E.E.U.U. N° US2013/0121530 (App. Ser. N° 13/769.798), presentada el 18 de febrero de 2013; la Publicación de Patente de E.E.U.U. N° US2013/0078485 (App. Ser. N° 13/769.779), presentada el 18 de febrero de 2013; la Publicación de Patente de E.E.U.U. N° US2013/0079236 (App. Ser. N° 13/244.947), presentada el 26 de septiembre de 2011; WO 2013/052318 (PCT/US2012/57155), presentada el 25 de septiembre de 2012; la Patente de E.E.U.U. N° 8380541 (solicitud en serie N° 13/244.946), presentada el 26 de septiembre de 2011; la Publicación de Patente de E.E.U.U. N° US2013/0078624 (Solicitud de Patente 13/244.949), presentada el 26 de septiembre de 2011; y WO 2014/015199 (Solicitud en serie de E.E.U.U. N° 61/673.245), presentada el 26 de septiembre de 2011.

Los dispositivos de ensayo y sistemas de ensayo, que incluyen dispositivos para procesar una muestra y sistemas

para procesar una muestra, que pueden ser dispositivos de ensayo automatizados y sistemas de ensayo automatizados, se pueden ubicar y usar en un punto de sitio de asistencia, y se pueden ubicar y usar en una pluralidad de puntos de sitio de asistencia. Los dispositivos de ensayo y los sistemas de ensayo, que incluyen dispositivos para procesar una muestra y sistemas para procesar una muestra, que pueden ser dispositivos de ensayo automatizados y sistemas de ensayo automatizados, se pueden ubicar y usar en un punto de sitio de asistencia, y se pueden ubicar y usar en una pluralidad de puntos de lugares de servicio.

Un dispositivo de procesamiento de muestra para realizar ensayos y mediciones como se describe en esta memoria puede ubicarse, y puede realizar tales ensayos y mediciones, en un punto de sitio de asistencia, o en un punto de lugar de servicio, u otro lugar. Puede ubicarse un sistema de procesamiento de muestra para realizar ensayos y mediciones como se describe en esta memoria, y puede realizar dichos ensayos y mediciones, en un punto de sitio de asistencia, o en un punto de lugar de servicio, u otro lugar.

Puede usarse un punto de sistema de asistencia en un punto de lugar de servicio, como una localización del sujeto (p. ej., lugar del hogar o trabajo o evento deportivo o control de seguridad o de combate), la localización de un proveedor de asistencia sanitaria (p. ej., médico), una farmacia o comerciante, una clínica, un hospital, una sala de emergencias, una enfermería, un hospicio, o un laboratorio. Un comerciante puede ser una farmacia (p. ej., farmacia minorista, farmacia clínica, farmacia de hospital), farmacia, cadena de tiendas, supermercado, o tienda. Ejemplos de comercios pueden incluir, pero no se limitan a, Walgreen's, CVS Pharmacy, Duane Reade, Walmart, Target, Rite Aid, Kroger, Costco, Kaiser Permanente, o Sears. En algunas situaciones, un punto de sistema de servicio (que incluye, pero no se limita al punto de sistema de asistencia) se implementa en cualquier ubicación designada para usar por una entidad de certificación o de licencia (p. ej., una entidad gubernamental de certificación). En otras situaciones, se puede usar o integrar un punto de sistema de servicio en un vehículo de transporte, como un coche, barco, camión, autobús, avión, motocicleta, furgoneta, vehículo médico de viaje, unidad móvil, ambulancia, coche/camión de bomberos, vehículo de cuidados críticos, u otro vehículo configurado para transportar un sujeto de un punto a otro. Un sitio de recogida de muestra puede estar en un sitio de adquisición de muestra y/o localizaciones de evaluación y/o de tratamiento de la salud (que pueden incluir cualquiera de los sitios de recogida de muestras descritos en otra parte en esta memoria que incluyen pero no se limitan a salas de emergencias, consultorios médicos, atención de urgencia, tiendas de campaña para la detección de (que pueden estar en lugares lejanos), un profesional de la salud que visita la casa de alguien para proporcionar atención domiciliaria).

El sistema (dispositivo) o una combinación de sistemas (dispositivos) pueden ubicarse/localizarse en puntos estratégicos de localizaciones de servicio. Las localizaciones se pueden seleccionar y optimizar en función de una variedad de objetivos, como, pero no se limitan a la prevalencia de la enfermedad, nivel de desarrollo de la enfermedad, índices de enfermedad previstos, riesgo estimado de brotes, demografía de población, políticas y regulaciones gubernamentales, preferencias del cliente, médico y del paciente, acceso a otras tecnologías en dichas localizaciones, seguridad y riesgos estimados, amenazas de seguridad, etc. Los dispositivos se pueden reubicar periódicamente para mejorar la utilidad general de manera frecuente, como diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc. Los sistemas se pueden actualizar para mejorar el rendimiento y/o añadir funcionalidad. Los sistemas se pueden actualizar módulo por módulo. Las actualizaciones de los sistemas pueden producirse a través de hardware y/o software. Los sistemas se pueden actualizar con un tiempo de inactividad mínimo mediante funciones que permiten la extracción e inserción de la cuchilla y/o módulo.

Además, un punto de localización de servicio donde se puede recoger una muestra de un sujeto o proporcionada por un sujeto puede estar en una localización lejana a un laboratorio de análisis. El sitio de recogida de muestra puede tener una instalación separada del laboratorio. La muestra puede o no ser recogida en fresco del sujeto en el punto de localización de servicio. Alternativamente, la muestra se puede recoger del sujeto en otro lugar y llevarse al punto de localización de servicio. En algunas realizaciones, no se proporciona una etapa de preparación de muestra en la muestra antes de proporcionarse al dispositivo. Por ejemplo, no es necesario preparar un portaobjetos antes de que se proporcione una muestra al dispositivo. Alternativamente, se puede realizar una o más etapas de preparación de muestra en la muestra antes de proporcionarse al dispositivo.

Un sitio de recogida de muestra en un punto de localización de servicio puede ser un centro de recogida de sangre o cualquier otro centro de recogida de fluidos corporales. El sitio de recogida de muestra puede ser un centro de recogida de muestras biológicas. En algunas realizaciones, un sitio de recogida de muestra puede ser un comerciante. Otros ejemplos de sitios de recogida de muestra pueden incluir hospitales, clínicas, consultorios de profesionales de la salud, escuelas, centros de día, centros de salud, residencias de vida asistida, oficinas gubernamentales, unidades de atención médica ambulante, o el hogar. Por ejemplo, un sitio de recogida de muestra puede ser un hogar de un sujeto. Un sitio de recogida de muestra puede ser cualquier localización donde se recibe una muestra del sujeto por el dispositivo. Un sitio de recogida puede ser una localización móvil, como en o con un paciente o en una unidad móvil o vehículo con un médico ambulante. Se puede designar cualquier localización como un sitio de recogida de muestra. La designación se puede hacer por cualquier parte, que incluye, pero no se limita al laboratorio, la agencia gubernamental, o el organismo regulador. Cualquier descripción en esta memoria relacionada con el sitio de recogida de muestra o el punto de localización de servicio puede estar relacionada o ser aplicada a comerciantes, hospitales, clínicas o cualquier otro ejemplo proporcionado en esta memoria y viceversa.

Un dispositivo puede ser una parte de un sistema, un componente del que puede ser un dispositivo de

procesamiento de muestra. Un dispositivo puede ser un dispositivo de procesamiento de muestra. Se puede configurar un dispositivo de procesamiento de muestra para facilitar la recogida de una muestra, preparar una muestra para una prueba clínica, o efectuar una reacción química con uno o más reactivos u otros procesamientos químicos o físicos, como se describe en esta memoria. Se puede configurar un dispositivo de procesamiento de muestra para obtener datos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para transmitir los datos obtenidos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para analizar datos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para comunicarse con otro dispositivo, o un laboratorio, o un individuo afiliado a un laboratorio, para analizar los datos obtenidos de una muestra.

Los sistemas de punto de servicio descritos en esta memoria están configurados para procesar muestras en una ubicación donde puede acceder un usuario al punto de sistema de servicio. En un ejemplo, un punto de sistema de servicio se encuentra en el hogar de un sujeto y se recoge una muestra de un sujeto y se procesa en el hogar del sujeto. En otro ejemplo, un punto de sistema de servicio se localiza en una farmacia y se recoge una muestra de un sujeto y se procesa en la farmacia. En otro ejemplo, un punto de sistema de servicio está ubicado en la localización de un proveedor de asistencia sanitaria (p. ej., consultorio médico) y se recoge una muestra de un sujeto y se procesa en la localización del proveedor de asistencia sanitaria. En otro ejemplo, un punto de sistema de servicio se localiza a bordo de un sistema de transporte (p. ej., un vehículo) y se recoge una muestra de un sujeto y se procesa en el sistema de transporte.

En algunas realizaciones, el análisis de procesamiento posterior de la muestra, que incluye diagnóstico y/o tratamiento, se realiza por el punto de sistema de servicio en la localización del punto de sistema de servicio. En otras realizaciones, el análisis de procesamiento posterior de la muestra se realiza a distancia desde una localización en la que se recoge y se procesa una muestra. En un ejemplo, el análisis de procesamiento posterior de la muestra se realiza en la ubicación de un proveedor de asistencia médica. En otro ejemplo, el análisis de procesamiento posterior de la muestra se realiza en la ubicación de un sistema de procesamiento. En otro ejemplo, el análisis de procesamiento posterior de la muestra se realiza en un servidor (p. ej., en la nube).

El análisis posterior de la muestra puede darse en un laboratorio o por una entidad afiliada a un laboratorio. Un laboratorio puede ser una entidad o instalación capaz de realizar una prueba clínica o analizar datos recopilados. Un laboratorio puede proporcionar condiciones controladas en las que se puede realizar investigación científica, experimentos, y mediciones. El laboratorio puede ser un laboratorio médico o laboratorio clínico donde se pueden realizar pruebas en muestras clínicas, o se pueden realizar análisis de datos recopilados de muestras clínicas, con el fin de obtener información sobre la salud de un paciente en relación con el diagnóstico, pronóstico y tratamiento y/o prevención de enfermedades. Una muestra clínica puede ser una muestra recogida de un sujeto. Preferiblemente, una muestra clínica se puede recoger del sujeto en un sitio de recogida de muestra que está en una instalación separada del laboratorio, como se describe con más detalle en otro lugar de esta memoria. La muestra clínica se puede recoger del sujeto usando un dispositivo, que se coloca en un sitio de recogida de muestra designado o en el sujeto.

Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para colocarse en o sobre un sujeto. Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para aceptar una muestra de un sujeto, ya sea directa o indirectamente. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre (p. ej., una muestra obtenida de una punción digital, o de una venopunción, o una muestra de sangre arterial), una muestra de orina, una muestra de biopsia, un corte de tejido, muestra de heces, u otras muestras biológicas; una muestra de agua, una muestra de suelo, una muestra alimentaria, una muestra de aire; u otra muestra. Una muestra de sangre puede comprender, p. ej., sangre completa, plasma, o suero. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede recibir una muestra del sujeto a través de una carcasa del dispositivo. La recogida de muestra puede darse en un sitio de recogida de muestra, o en cualquier otro lugar. Se puede proporcionar la muestra al dispositivo en un sitio de recogida de muestras.

En algunas realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para aceptar o contener un cartucho. En algunas realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestra puede comprender un cartucho. El cartucho puede ser extraíble del dispositivo de procesamiento de muestra. En algunas realizaciones, se puede proporcionar una muestra al cartucho del dispositivo de procesamiento de muestra. Alternativamente, se puede proporcionar una muestra a otra porción de un dispositivo de procesamiento de muestra. El cartucho y/o dispositivo puede comprender una unidad de recogida de muestra que se puede configurar para aceptar una muestra.

Un cartucho puede incluir una muestra, y puede incluir reactivos para usar en el procesamiento o prueba de una muestra, desechables para usar en el procesamiento o prueba de una muestra u otros materiales. Después de la colocación de un cartucho en, o la inserción de un cartucho en un dispositivo de procesamiento de muestra, pueden ponerse en comunicación fluida uno o más componentes del cartucho con otros componentes del dispositivo de procesamiento de muestra. Por ejemplo, si se recoge una muestra en un cartucho, la muestra puede transferirse a otras partes del dispositivo de procesamiento de muestra. De forma similar, si en un cartucho se proporcionan uno o más reactivos, los reactivos pueden transferirse a otras partes del dispositivo de procesamiento de muestra, u otros componentes del dispositivo de procesamiento de muestra pueden trasladarse a los reactivos. En algunas realizaciones, los reactivos o componentes de un cartucho pueden permanecer a bordo en el cartucho. En algunas

realizaciones, no se incluyen fluidos que requieran tubos o que requieran mantenimiento (p. ej., mantenimiento manual o automático).

Se puede transferir una muestra o reactivo a un dispositivo, como un dispositivo de procesamiento de muestra. Una muestra o reactivo puede transferirse dentro de un dispositivo. Tal transferencia de muestra o reactivo puede llevarse a cabo sin proporcionar una ruta de fluido continuo desde el cartucho al dispositivo. En realizaciones, tal transferencia de muestra o reactivo puede llevarse a cabo mediante un sistema de manipulación de muestra (p. ej., una pipeta); por ejemplo, una muestra, reactivo o alícuota de la misma puede aspirarse en un componente de transferencia de punta abierta, como una punta de pipeta, que puede estar operativamente conectada a una unidad móvil que transfiere la punta, con la muestra, reactivo o alícuota del mismo contenido dentro del tip, a una localización en o dentro del dispositivo de procesamiento de muestra. En algunas realizaciones, una punta del sistema de manipulación de muestra puede insertarse al menos parcialmente en el recipiente y/o cavidad de la muestra. La punta puede ser insertable o extraíble de la vasija y/o cavidad de muestra. La muestra, reactivo, o alícuota de la misma se puede depositar en una localización en o dentro del dispositivo de procesamiento de muestra. Se puede mezclar la muestra y el reactivo, o múltiples reactivos usando un sistema de manipulación de muestra de una manera similar. Se pueden transferir uno o más componentes del cartucho de manera automatizada a otras partes del dispositivo de procesamiento de muestra, y viceversa.

Un dispositivo, como un dispositivo de procesamiento de muestra, puede tener un sistema de manipulación de fluidos (que puede ser parte de un sistema de manipulación de muestra). Un sistema de manipulación de fluidos puede realizar, o puede ayudar a realizar, transportar, diluir, extraer, alícuotar, mezclar y otras acciones con un fluido, como una muestra. En algunas realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede estar contenido dentro de una carcasa del dispositivo. Un sistema de manipulación de fluidos puede permitir la recogida, entrega, procesamiento y/o transporte de un fluido, disolución de reactivos secos, mezcla de reactivos líquidos y/o secos con un líquido, así como la recogida, entrega, procesamiento y/o transporte de componentes, muestras o materiales no-fluidos. El fluido puede ser una muestra, un reactivo, diluyente, lavado, colorante, o cualquier otro fluido que puede ser usado por el dispositivo, y puede incluir, pero no se limita a, fluidos homogéneos, diferentes líquidos, emulsiones, suspensiones, y otros fluidos. Un sistema de manipulación de fluidos, que incluye sin limitación una pipeta, también se puede usar para transportar vasijas (con o sin fluido contenido en las mismas) alrededor del dispositivo. El sistema de manipulación de fluidos puede dispensar o aspirar un fluido. La muestra puede incluir uno o más partículas o materia sólida flotando dentro de un fluido.

En realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede comprender una pipeta, punta de pipeta, jeringa, capilar, u otro componente. El sistema de manipulación de fluidos puede tener una porción con una superficie interior y una superficie exterior y un extremo abierto. El sistema de manipulación de fluidos puede comprender una pipeta, que puede incluir un cuerpo de pipeta y una boquilla de pipeta, y puede comprender una punta de pipeta. Una punta de pipeta puede o no ser extraíble de una boquilla de pipeta. En realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede usar una pipeta acoplada con una punta de pipeta; una punta de pipeta puede ser desechable. Una punta de pipeta puede formar un sello hermético a los fluidos cuando se combina con una pipeta. Una punta de pipeta puede usarse una, dos o más veces. En realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede usar una pipeta o dispositivo similar, con o sin una punta de pipeta, para aspirar, dispensar, mezclar, transportar, o si no manejar el fluido. El fluido se puede dispensar desde el sistema de manipulación de fluidos cuando se desee. El fluido puede estar contenido dentro de una punta de pipeta antes de ser dispensado, p. ej., desde un orificio en la punta de pipeta. En realizaciones, o instancias durante el uso, se puede dispensar todo el fluido; en otras realizaciones, o instancias durante el uso, se puede dispensar una porción de fluido dentro de una punta. Una pipeta puede aspirar selectivamente un fluido. La pipeta puede aspirar una cantidad seleccionada de fluido. La pipeta puede ser capaz de activar mecanismos de agitación para mezclar el fluido dentro de la punta o dentro de una vasija. La pipeta puede incorporar puntas o vasijas que crean bucles de flujo continuo para mezclar, que incluyen materiales o reactivos que no están en forma líquida. Una punta de pipeta puede también facilitar la mezcla mediante el suministro dosificado de múltiples fluidos simultáneamente o en secuencia, como en reacciones de sustrato en 2 partes.

El sistema de manipulación de fluidos puede incluir una o más unidades aisladas flúidicamente o hidráulicamente independientes. Por ejemplo, el sistema de manipulación de fluidos puede incluir una, dos o más puntas de pipeta. Las puntas de pipeta se pueden configurar para aceptar y confinar un fluido. Las puntas pueden estar flúidicamente aisladas de o hidráulicamente independientes entre sí. El fluido contenido en cada punta puede estar aislado flúidicamente o hidráulicamente independiente de un fluido en otras puntas y de otros fluidos dentro del dispositivo. Las unidades flúidicamente aisladas o hidráulicamente independientes pueden ser móviles con relación a otras partes del dispositivo y/o entre sí. Las unidades flúidicamente aisladas o hidráulicamente independientes pueden ser individualmente móviles. Un sistema de manipulación de fluidos puede comprender una o más bases o soportes. Una base o soporte puede soportar una o más pipetas o unidades de pipeta. Una base o soporte puede conectar una o más pipetas del sistema de manipulación de fluidos entre sí.

Un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para realizar etapas o acciones de procesamiento en una muestra obtenida de un sujeto. El procesamiento de la muestra puede incluir la preparación de la muestra, que incluye, p. ej., dilución de la muestra, división de una muestra en alícuotas, extracción, poner en contacto con un reactivo, filtración, separación, centrifugación, u otra acción o etapa de preparación o procesamiento. Un dispositivo

- de procesamiento de muestra se puede configurar para realizar una o más acciones o etapas preparatorias. Opcionalmente, se puede preparar una muestra para una reacción química y/o etapa de procesamiento físico. Una acción o etapa de preparación de muestra puede incluir uno o más de los siguientes: centrifugación, separación, filtración, dilución, enriquecimiento, purificación, precipitación, incubación, pipeteo, transporte, cromatografía, lisis celular, citometría, pulverización, trituración, activación, ultrasonicación, procesamiento en micro columna, procesamiento con perlas magnéticas, procesamiento con nanopartículas, u otras acciones o etapas de preparación de la muestra. Por ejemplo, la preparación de la muestra puede incluir una o más etapas para separar la sangre en suero y/o fracciones particuladas, o para separar cualquier otra muestra en varios componentes. La preparación de la muestra puede incluir una o más etapas para diluir y/o concentrar una muestra, como una muestra de sangre, u otras muestras biológicas. La preparación de la muestra puede incluir añadir un anticoagulante u otros ingredientes a la muestra. La preparación de la muestra puede también incluir la purificación de una muestra. En realizaciones, todas las acciones o etapas de procesamiento, preparación o ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo. En realizaciones, todas las acciones o etapas de procesamiento, preparación o ensayo de la muestra se realizan dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, la mayoría de las acciones o etapas de procesamiento, preparación o ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, muchas acciones o etapas de procesamiento, preparación, o ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, las acciones o etapas de procesamiento, preparación o ensayo de la muestra se pueden realizar por más de un dispositivo.
- 20 Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para ejecutar uno o más ensayos en una muestra, y para obtener datos de la muestra. Un ensayo puede incluir uno o más tratamientos físicos o químicos, y puede incluir ejecutar una o más reacciones químicas o físicas. Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para realizar uno, dos o más ensayos en una muestra pequeña de fluido corporal. Pueden tener lugar una o más reacciones químicas en una muestra que tiene un volumen, como se describe en otra parte de esta memoria.
- 25 Por ejemplo, pueden tener lugar una o más reacciones químicas en una píldora que tiene menos de un volumen de femtolitros. En una ocasión, la unidad de recogida de muestra se configura para recibir un volumen de la muestra de fluido corporal equivalente a una única gota o menos de sangre o de fluido intersticial. En realizaciones, el volumen de una muestra puede ser un volumen pequeño, donde un volumen pequeño puede ser un volumen que es menor que aproximadamente 1000 μl , o menor que aproximadamente 500 μl , o menor que aproximadamente 250 μl , o menor que aproximadamente 150 μl , o menor que aproximadamente 100 μl , o menor que aproximadamente 75 μl , o menor que aproximadamente 50 μl , o menor que aproximadamente 40 μl , o menor que aproximadamente 20 μl , o menor que aproximadamente 10 μl , u otro volumen pequeño. En realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan en una única muestra. En realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo. En realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, la mayoría de las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, muchas de las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, las acciones o etapas de procesamiento, preparación, o de ensayo de la muestra se pueden realizar por más de un dispositivo.
- 40 Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para realizar una pluralidad de ensayos en una muestra. En realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para realizar una pluralidad de ensayos en una única muestra. En realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para realizar una pluralidad de ensayos en una única muestra, donde la muestra es una muestra pequeña. Por ejemplo, una muestra pequeña puede tener un volumen de muestra que es un volumen pequeño de menos de aproximadamente 1000 μl , o menos de aproximadamente 500 μl , o menos de aproximadamente 250 μl , o menos de aproximadamente 150 μl , o menos de aproximadamente 100 μl , o menos de aproximadamente 75 μl , o menos de aproximadamente 50 μl , o menos de aproximadamente 40 μl , o menos de aproximadamente 20 μl , o menos de aproximadamente 10 μl , u otro volumen pequeño. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede ser capaz de realizar ensayos multiplexados en una única muestra. Se pueden realizar una pluralidad de ensayos simultáneamente; o se pueden realizar secuencialmente; o se pueden realizar algunos ensayos simultáneamente mientras otros se realizan secuencialmente. Se pueden incorporar también en el dispositivo uno o más ensayos de control y/o calibradores (p. ej., que incluyen una configuración con un control de un calibrador para los ensayos/pruebas); los ensayos de control y el ensayo de calibradores se pueden realizar simultáneamente con los ensayos realizados en la muestra, o se pueden realizar antes o después de que se realicen los ensayos en una muestra, o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan por un único dispositivo. En realizaciones, toda una pluralidad de acciones o etapas de ensayo se realizan dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, la mayoría de las acciones o etapas de ensayo de la muestra, de una pluralidad de ensayos, se realizan por un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, muchas acciones o etapas de ensayo de la muestra, de una pluralidad de ensayos, se realizan por un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En realizaciones, las acciones o etapas de procesamiento, preparación, o ensayo de la muestra se pueden realizar por más de un dispositivo.

En realizaciones, se pueden realizar toda una pluralidad de ensayos en un corto periodo de tiempo. En

realizaciones, dicho corto periodo de tiempo comprende menos de aproximadamente tres horas, o menos de aproximadamente dos horas, o menos de aproximadamente una hora, o menos de aproximadamente 40 minutos, o menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 25 minutos, o menos de aproximadamente 20 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos, o menos de aproximadamente 10 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos, o menos de aproximadamente 4 minutos, o menos de aproximadamente 3 minutos, o menos de aproximadamente 2 minutos, o menos de aproximadamente 1 minuto, u otro corto periodo de tiempo.

Un dispositivo puede ser capaz de realizar todas las etapas a bordo (p. ej., etapas o acciones realizadas por un único dispositivo) en una corta cantidad de tiempo. Un dispositivo puede ser capaz de realizar todas las etapas a bordo en una sola muestra en una corta cantidad de tiempo. Por ejemplo, desde la recogida de la muestra de un sujeto hasta la transmisión de los datos y/o análisis, puede tardar aproximadamente 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 50 minutos o menos, 45 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 4 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos, o 1 minuto o menos. La cantidad de tiempo desde la aceptación de una muestra dentro del dispositivo hasta la transmisión de datos y/o análisis desde el dispositivo con respecto a dicha muestra puede depender del tipo o número de etapas, pruebas, o ensayos realizados en la muestra. La cantidad de tiempo desde la aceptación de una muestra dentro del dispositivo hasta la transmisión de datos y/o análisis desde el dispositivo con respecto a dicha muestra puede tardar aproximadamente 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 50 minutos o menos, 45 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 4 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos, o 1 minuto o menos.

Un dispositivo o sistema como se describe en esta memoria, como, p. ej., un punto de dispositivo de servicio o un punto de sistema de servicio, puede procesar una muestra de acuerdo con una petición o un esquema de prueba. En algunas situaciones, un bucle de retroalimentación (acoplado con sensores) permite al punto de dispositivo o sistema de servicio registrar el progreso del procesamiento de la muestra y mantenga o modifique la petición o el esquema de prueba. En un ejemplo, si el dispositivo o sistema detecta que el procesamiento tarda más que la cantidad de tiempo predeterminada establecida en el esquema, el dispositivo o sistema acelera el procesamiento o ajusta cualquier proceso paralelo, como el procesamiento de la muestra en otro módulo del dispositivo o sistema. El bucle de retroalimentación permite la monitorización en tiempo real o pseudo-real (p. ej., en caché). En algunas situaciones, el bucle de retroalimentación puede proporcionar pruebas de reflejos, que pueden provocar que se inicien pruebas, ensayos, etapas de preparación, y/u otros procesos posteriores después de iniciar o completar otra prueba y/o ensayo o detectar uno o más parámetros. Dichas pruebas, ensayos, etapas de preparación, y/u otros procesos posteriores pueden iniciarse automáticamente sin intervención humana.

En algunas realizaciones, el punto de sistema de servicio puede adherirse a una petición o esquema de prueba predeterminado en base a los parámetros iniciales y/o efectos deseados. En otras realizaciones, el esquema y/o petición de prueba se puede modificar sobre la marcha. El esquema y/o petición de prueba se puede modificar en función de una o más condiciones detectadas, uno o más procesos adicionales para ejecutar, uno o más procesos que ya no se ejecutan, uno o más procesos para modificar, uno o más modificaciones de utilización de recurso/componente, una o más condiciones de error o alerta detectadas, una o más no disponibilidad de un recurso y/o componente, una o más entradas o muestras posteriores proporcionadas por un usuario, datos externos, o cualquier otra razón.

En algunos ejemplos, se pueden proporcionar una o más muestras adicionales a un dispositivo después de que se proporcionen una o más muestras iniciales al dispositivo. Las muestras adicionales pueden ser del mismo sujeto o de diferentes sujetos. Las muestras adicionales pueden ser del mismo tipo de muestra que la muestra inicial o diferentes tipos de muestras (p. ej., sangre, tejido). Las muestras adicionales pueden proporcionarse antes, al mismo tiempo, y/o después del procesamiento de una o más muestras iniciales en el dispositivo. Se pueden proporcionar las mismas y/o diferentes pruebas o criterios deseados para las muestras adicionales, frente a muestras entre sí y/o las iniciales. Las muestras adicionales pueden procesarse en secuencia y/o en paralelo con las muestras iniciales. Las muestras adicionales pueden usar uno o más de los mismos componentes que las muestras iniciales, o pueden usar diferentes componentes. Las muestras adicionales pueden o no solicitarse en vista de una o más condiciones detectadas de las muestras iniciales.

En algunas realizaciones, el sistema acepta una muestra con la ayuda de un módulo de recogida muestra, como una lanceta, bisturí o vasija de recogida de fluidos. Luego, el sistema carga o accede a un protocolo para realizar una o más rutinas de procesamiento a partir de una pluralidad de posibles rutinas de procesamiento. En un ejemplo, el sistema carga un protocolo de centrifugación y un protocolo de citometría. En algunas realizaciones, el protocolo puede cargarse desde un dispositivo externo a un dispositivo de procesamiento de muestra. Alternativamente, el protocolo puede estar ya en el dispositivo de procesamiento de muestra. El protocolo se puede generar en base a uno o más criterios deseados y/o rutinas de procesamiento. En un ejemplo, generar un protocolo puede incluir generar una lista de una o más subtareas para cada uno de los procesos de entrada. En algunas realizaciones, cada subtarea se debe realizar por un único componente de uno o más dispositivos. Generar un protocolo puede incluir generar el orden de la lista, el tiempo y/o la asignación de uno o más recursos.

En una realización, un protocolo proporciona detalles de procesamiento o especificaciones que son específicos de

una muestra o un componente en la muestra. Por ejemplo, un protocolo de centrifugación puede incluir velocidad de rotación y tiempo de procesamiento que es adecuado para una densidad de muestra predeterminada, que permite la separación dependiente de la densidad de una muestra de otro material que puede estar presente con un componente deseable de la muestra.

- 5 Se incluye un protocolo en el sistema, como en un registro de protocolos del sistema, o se recupera de otro sistema, como una base de datos, en comunicación con el sistema. En una realización, el sistema está en comunicación unidireccional con un servidor de base de datos que proporciona protocolos al sistema a petición del sistema para uno o más protocolos de procesamiento. En otra realización, el sistema está en comunicación bidireccional con un servidor de base de datos, que permite que el sistema cargue rutinas de procesamiento específicas del usuario en el
- 10 servidor de base de datos para su futuro uso por parte del usuario u otros usuarios que pueden tener uso para las rutinas de procesamiento específicas del usuario.

En algunos casos, se ajusta un protocolo de procesamiento por un usuario. En una realización, un usuario puede generar un protocolo de procesamiento con la ayuda de un motor de protocolo que proporciona al usuario una o más opciones orientadas a adaptar el protocolo para un uso particular. La adaptación puede ocurrir antes del uso del

15 protocolo. En algunas realizaciones, el protocolo puede modificarse o actualizarse mientras el protocolo está en uso.

Con la ayuda de un protocolo, un sistema procesa una muestra, que puede incluir preparar de la muestra, ensayar de la muestra y detectar uno o más componentes de interés en la muestra. En algunos casos, el sistema realiza análisis de datos con respecto a la muestra o a una pluralidad de muestras después del procesamiento. En otros casos, el sistema realiza análisis de datos durante el procesamiento. En algunas realizaciones, el análisis de datos

20 se realiza a bordo, es decir, en el sistema. En otras realizaciones, el análisis de datos se realiza usando un sistema de análisis de datos que es externo al sistema. En tal caso, los datos se dirigen al sistema de análisis mientras se está procesando la muestra o siguiendo el proceso.

Un dispositivo se puede configurar para preparar una muestra para su eliminación, o para disponer de una muestra, como una muestra biológica, después del procesamiento o ensayo de una muestra.

En realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para transmitir datos obtenidos a partir de una muestra. En realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestra puede configurarse para comunicarse a través de una red. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede incluir un módulo de comunicación que puede interactuar con la red. Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede conectar a la red a través de una conexión por cable o de forma inalámbrica. La red puede ser una red de área local (LAN) o una

30 red de área amplia (WAN) como Internet. En algunas realizaciones, la red puede ser una red de área personal. La red puede incluir la nube. El dispositivo de procesamiento de muestra puede estar conectado a la red sin requerir un dispositivo intermediario, o puede requerirse un dispositivo intermediario para conectar un dispositivo de procesamiento de muestra a una red. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede comunicarse a través de una red con otro dispositivo, que puede ser cualquier tipo de dispositivo en red, que incluye, pero no se limita a, un

35 ordenador personal, un ordenador servidor o un ordenador portátil; asistentes personales digitales (PDA) como un dispositivo con Windows CE; teléfonos como teléfonos portátiles, teléfonos inteligentes (p. ej., iPhone, Android, Blackberry, etc.), o teléfonos portátiles de reconocimiento de localización (como GPS); un dispositivo de itinerancia, como un dispositivo de itinerancia conectado a la red; un dispositivo inalámbrico como un dispositivo de correo electrónico inalámbrico u otro dispositivo capaz de comunicarse de forma inalámbrica con una red informática; o

40 cualquier otro tipo de dispositivo de red que pueda comunicarse posiblemente a través de una red y manejar transacciones electrónicas. Dicha comunicación puede incluir proporcionar datos a una infraestructura de almacenamiento en la nube o cualquier otro tipo de infraestructura de almacenamiento de datos a la que puedan acceder otros dispositivos.

Un dispositivo de procesamiento de muestra puede proporcionar datos con respecto a una muestra a, p. ej., un profesional de la salud, una localización de asistencia médica profesional, como un laboratorio o una filial del mismo. Uno o más de un laboratorio, profesional de la salud, o sujeto puede tener un dispositivo de red capaz de recibir o acceder a los datos proporcionados por el dispositivo de procesamiento de muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestra se puede configurar para proporcionar datos con respecto a una muestra a una base de datos. Se puede configurar un dispositivo de procesamiento de muestra para proporcionar datos con respecto a una

50 muestra a un sistema de registros médicos electrónicos, a un sistema de información de laboratorio, u otro sistema o software. Un dispositivo de procesamiento de muestra puede proporcionar datos en forma de un informe.

Un laboratorio, dispositivo u otra entidad o software puede realizar análisis en datos con respecto a una muestra en tiempo real. Un sistema de software puede realizar análisis químicos y/o análisis patológicos, o estos podrían distribuirse entre combinaciones de personal de laboratorio, clínico, y especializado o experto. El análisis puede

55 incluir una evaluación cualitativa y/o cuantitativa de una muestra. El análisis de los datos puede incluir una posterior evaluación cualitativa y/o cuantitativa de una muestra. Opcionalmente, se puede generar un informe basado en datos brutos, datos pre-procesados o datos analizados. Dicho informe se puede preparar para mantener la confidencialidad de los datos obtenidos de la muestra, la identidad y otra información con respecto al sujeto del que se obtuvo la muestra, el análisis de los datos y otra información confidencial. El informe y/o los datos se pueden

60 transmitir a un profesional de la salud. Un laboratorio, dispositivo u otra entidad o software puede realizar análisis de

datos. Los datos obtenidos por un dispositivo de procesamiento de muestra, o el análisis de tales datos o informes, pueden proporcionarse a una base de datos, un sistema de registros médicos electrónicos, a un sistema de información de laboratorio, a un sistema de automatización de laboratorio u otro sistema o software.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Ejemplos de componentes proteicos individuales adecuados para usar en la proporción de proteínas de fusión como se describen en esta memoria incluyen (se proporcionan las secuencias de aminoácidos usando el código de una letra para aminoácidos):

Tabla 3

| Nombre de proteína | Secuencia de proteína | SEQ ID NO: |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Proteína p50 de unión a ADN (fragmento de la proteína NF-kappa-B humana, número de acceso NP_003989, aminoácidos 40-366) | adgpylqilegpkqrgfrfryvcegpshgglpgasseknkksy pqvkienvyvgpakvivqlvtngknihlhahslvgkhcedgict vtagpkdmvvgfanlgilhvtkkkvfetlearmteacirgynp gllvhpdlaylqaegggdrqlgdrekelirqaalqqtkemdls vvrlmftaflpdstgsftrrlepvsdaiydskapnasnlkiv rmdrtagcvtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeeenggweg fgdfsptdvhrqfaivfktkpkkdinitkpasvfvqlrrksdl etsepkpflyypeikdkeevqrkrqk | 2 |
| ADN ligasa Tth (Cepa HB8 de Thermus Thermophilus, acceso YP_144363.1) | mtleearkrvnelrdliryhnyryyvladpeisdaeydrllre lkeleerfpelkspdsptlqvgarpleatfrpvrhptrmysld nafnlidelkafeerieralgrkqpfaytvehkvdglsvnllye egvlvygatrgdgevgeevtqnlltiptiprrlkgvperlevr gevympleafllrneeleergerifknprnaaagslrqkdpr takrglratfyalgglleeveregvatqfallhwlkekqfpve hgyaravgaegveavygdwlkkrralpfeadgvvkldeialw relgytaraprfaiaykfpaeeketrlldvvfqvgtrgrvtpv gilepvflegsevsrvtlhnesyieeldrigdwlvhkaggv ipevlrvlkerntgeerpirwpetcepcghrllkegvhrpcn plcpakrfeairhfasrkamdiqglgeklierllekglvkdva dlylrkedlvglermgeksaqnllrqieeskkrglerllyal glpgvgevlarnlaarfgnmdrllasleelleveevgeltar ailetldkpafrdlvrrlkeagvemeakekggealkglftvit gelsrpreevkalrrrlgkvtdsvsrktsylvvgenpgskle karalqvptlteelvrilleartqkkaeelv | 3 |
| Líder que contiene 10 His | mghhhhhhhhhssghiegras | 4 |
| Secuencia flexible rica en glicina | gssgtsgggsggg | 5 |
| Proteína CFT de unión a ADN (un híbrido de la proteína NFATc1 murina, número de acceso NP_058071, aminoácidos 390-506; seguido de un espaciador de alanina; seguido de un fragmento de la proteína NF-kappa-B humana, número de acceso NP_003989, aminoácidos 249-366) | sptsymspslpaldwqlpshsgpyelrievqpkshhrahete gsrgavkasagghpivqlhgyleneppltlqlfigtaddrllrp hafyqvhrhitgktvsttsheillsntkvleiplpenmraii dcagilklrnsdielrkgetdigrkntrvrlvfrvhipqpngr tllslqasnlkivrmrdrtagcvtggeeiyllcdkvqkddiqirf yeeeenggwegfgdfsptdvhrqfaivfktkpkkdinitkpa svfvqlrrksdletsepkpflyypeikdkeevqrkrqk | 7 |
| ADN ligasa T4 (número de acceso NP_049813) | milkilneiasigstkqkqaileknkdnellkrvrltysrgl qyyikkwpkpgiatqsfgmlltldmldfieftlatrkltnaa ieeltgyitdgkkddvevlrrvmrdlecgasvsiankvwpgl ipeqpgmlassydekginknikfpafaqlkadgarcfaevrgd elddvrlsragneylgldllkeelikmtaearqihpegvlid gelvyheqvkkpegldflfdaypenskakefaevaesrtasn giankslkgitisekaeqcmkfqvwdyvplveiyslpafrlkyd vrfskleqmtsgydkviliengvvnldakviykkyidqgle giilknidglwenarsknlykfkavidvdlkivgiyphrkdp kaggfilesecgkikvnaqsglkdkgvksheldrtrimenqn yyigkilececnqgwlksdgrtdyvklflpiairlredktkant fedvfgdfhevtgl | 8 |

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ADN ligasa Pfu (Cepa ST04 de <i>Pyrococcus furiosus</i> , acceso YP_006355162) | mrylelaqlyqklekttmklktrlvadflkvpddhlefi lilgdvfpewderelgvgeklkavamatgidaneiensvkd tgdldgesialavkkrkqksffsqpltikrvyqtlvkvaettge gsqekmkylanlfmdaepieakiartvlgmtgtvaeglrr daialafhvkvvelveraymltsdfgfvakvaklegneglakvq vqigkpkpmlaqaanikeallemggeaeifeikydgarvqv kdgdkiivysrrlenvtraipeivealkqsvkpnkaivegelv aigedgrplpfpqyvrrfrrkhniquemmkkiplelnlfdvlyv dgesmidvkvfidrrkkleeiepnngkikvaenlitkkveeaea fykkalemgheglmakrldatyepgnrgkkwklikptmenldl viigaewgegrahllgsfilgaydpetgeflevgkvgsqgftd edlvftkmlkpliikeegkrvwiepkivievtyqeiqkspky ksgfalrfpryvalrddkqpedadtieriaqlyelqermkgkv | 9 |
| ADN ligasa Pfu C23 (Supresión del aminoácido 23 C-terminal de Pfu) | mrylelaqlyqklekttmklktrlvadflkvpddhlefi lilgdvfpewderelgvgeklkavamatgidaneiensvkd tgdldgesialavkkrkqksffsqpltikrvyqtlvkvaettge gsqekmkylanlfmdaepieakiartvlgmtgtvaeglrr daialafhvkvvelveraymltsdfgfvakvaklegneglakvq vqigkpkpmlaqaanikeallemggeaeifeikydgarvqv kdgdkiivysrrlenvtraipeivealkqsvkpnkaivegelv aigedgrplpfpqyvrrfrrkhniquemmkkiplelnlfdvlyv dgesmidvkvfidrrkkleeiepnngkikvaenlitkkveeaea fykkalemgheglmakrldatyepgnrgkkwklikptmenldl viigaewgegrahllgsfilgaydpetgeflevgkvgsqgftd edlvftkmlkpliikeegkrvwiepkivievtyqeiqkspky ksgfalrfpryvalrddkqpedadtieriaqlyelqermkgkv | 10 |
| Líder rico en His, proteína p50 de unión a ADN, enlazador rico en glicina | Mghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfry vcegshggllpgasseknkksyqvkicnyvvpakvivqlvtn gknihlhahslvgkhcedgictvtagpkdmvvgfanlgilhvt kkkvftlearmteacirgynpgllvhpdlaylqaegggdrql gdrekelirqaalqtkemdlsvvrlmftafldstgstrrl epvvsdaiydskapnasnlkivrmrdtagcvtggeeiyllcdk vqkddiqirfyeeenggvwegfgdfspdvhrqfaiivfktpk ykdinikpasvfvqlrrksdletsepkpflyypeikdkeevq rkrqkqsgsgsgsggg | 11 |
| Líder rico en His, proteína CTF de unión a ADN, enlazador rico en glicina | Mghhhhhhhhhssghiegrassptsymspaldwqlpshs gpyelrievqpkshhrahayetegsrgavkasagghpivqlhgy lenepntlqlfigtaddrllrphafygvhrigtktvststhei ilsntkvleipllpennmraiidcagilklrnsdielrkgetd igrkntvrvlvfrvhppnqrntslsqasnklivrmrdtagcv tggeeiyllcdkqvqkddiqirfyeeenggvwegfgdfspdv hrqfaiivfktpkkykdinikpasvfvqlrrksdletsepkpfl yypeikdkeevqrkrqkqsgsgsgsgsggg | 12 |

Lo siguiente proporciona un ejemplo de una proteína de fusión que proporciona actividad de ADN ligasa de extremos romos termoestable:

- 5 Ligasa de fusión p50-Tth, constructo Theranos EE0217, p. ej., proteína prep RDP0078, consiste en un líder que contiene 10 His (mghhhhhhhhhssghiegras, SEQ ID NO: 4), *p50* (se muestra a continuación en *cursiva*, comenzando con *adgpy...* y terminando con *...rkrqk*, SEQ ID NO: 2), una secuencia flexible rica en glicina (gssgsgsgsgsgg, SEQ ID NO: 5) y la ADN ligasa Tth (mostrada a continuación en texto subrayado, SEQ ID NO: 3). Esta proteína de fusión tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 1):

mghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfryvcegshggllpgasseknkksyqvkicnyvvpakvivql
 vtngknihlhahslvgkhcedgictvtagpkdmvvgfanlgilhvtkkkvftlearmteacirgynpgllvhpdlaylqaegggd
 rqlgdrekelirqaalqtkemdlsvvrlmftafldstgstrrllepvvsdaiydskapnasnlkivrmrdtagcvtggeeiyllcdk
 vqkddiqirfyeeenggvwegfgdfspdvhrqfaiivfktpkkykdinikpasvfvqlrrksdletsepkpflyypeikdkeevqrk
 rkrqkqsgsgsgsggmtleearkrvnelrliyrhnyryvvladpeisdaeydrllrelkeerfpelkspdsptlqvgarpleatfr
 pvrhptrmysldnafnldelkafeerieralgrkppfaytvehkvdglsvnllyeegvlvygatrgevegevtgnlltiptiprllk
 gyperlevrgevmpieafirlneeleergerifknprnaaagslrqkdpritakrgrlatfyalggleeveregvatqfallhwkkek
 gfpvehgyaravgaegveavyqdwllkrralpfeadgvvkldeialwrelgytaraprfaiaykfaeeketrllldvfvqvgtrgr
 vtpvgilepvflegsevsvrtlhnesyieeldirigdwvlvkhaggvipevlrvlkertrgeerpipwpetcepgghrllkegkvhrccp
 nplcpakrfeairhfaskamdiqglgeklierllekgvlkvadvlyrkrkedlvglermgeksaqnlrqueeskkrglerllyalgpg
 vgevlarnlaarfgnmdrleasleelleveevgeltarailetikdpafdrvlrrlkeagvemeakekgealkgtfvtigtelsrpre
 evkallrrlgakvtidsvrsrktlylvvgenpgsklekaralgvptlteelyrllartgkkaeely

La secuencia de la proteína de fusión SEQ ID NO: 1 presentada anteriormente es un ejemplo de una proteína de fusión que se puede representar como “4-2-5-3” en la que “4” representa SEQ ID NO: 4; “2” representa SEQ ID NO: 2; “5” representa SEQ ID NO: 5; y “3” representa SEQ ID NO: 3. Dichas representaciones indican, en una orientación N-terminal a C-terminal, proteínas de fusión lineales que comprenden fusiones de las secuencias de aminoácidos indicadas por los números (que a su vez indican la correspondiente SEQ ID NO:s). Además, dichas representaciones de proteínas de fusión se presentan a continuación.

A continuación, se proporciona un ejemplo de una reacción de ligación de extremos romos realizada a 75°C. El sustrato de ADN era un ADN dúplex de 49 pb preparado con oligonucleótidos que hibridan EE0139 (SEQ ID NO: 20) y EE0140 (SEQ ID NO: 21). Este dúplex de extremos romos era capaz de hacer concatámeros tras múltiples eventos de ligación. Los resultados de los productos de reacción se separaron por tamaño en un gel de agarosa, como se muestra en la Fig. 1, demuestran que: (1) la ligasa Tth sola (carriles 2-3), aunque se sabe que es capaz de sellar mellas de ADN a 75°C, realizó muy poca o ninguna ligación de extremos romos en estas condiciones; (2) la ADN ligasa T4 con una fusión N-terminal de p50 (carriles 4-5) también realizó muy poca ligación de extremos romos en estas condiciones, aunque hubo alguna evidencia de más ligación que para Tth sola. Se creyó que esta observación era sorprendente dada la sensibilidad a la temperatura de la ligasa T4 sola; (3) la ADN ligasa Tth con una fusión N-terminal de p50 (carriles 6-7) demostró un nivel mucho más alto de ligación de extremos romos a 75°C. Por lo tanto, los resultados mostrados en la Figura 1 demuestran que las proteínas de fusión como se describen en esta memoria proporcionan una actividad de ligación de extremos romos mejorada a alta temperatura. Se cree que las proteínas de fusión homólogas a SEQ ID NO: 1 proporcionan una mejor actividad de ligación de extremos romos a alta temperatura. Por lo tanto, se cree que las proteínas de fusión que tienen una homología de secuencia superior al 90%, o superior al 95% o superior al 99% con la SEQ ID NO: 1 proporcionan actividad de ligación de ADN de extremos romos a alta temperatura.

Ejemplo 2

La proteína de fusión de SEQ ID NO: 1 (y moléculas homólogas) es un ejemplo de una ADN ligasa de extremos romos termoestable. Los ejemplos de proteínas de fusión adicionales que tienen características estructurales similares se enumeran en la siguiente tabla (Tabla 4). Se cree que estas proteínas de fusión adicionales comparten no solo características estructurales, sino también características funcionales; por lo tanto, se cree que las proteínas de fusión enumeradas en la Tabla 4 son ligasas de extremos romos termoestables. Además, se cree que las proteínas homólogas a las proteínas de fusión de la Tabla 4 son ligasas de extremos romos termoestables. El primer ejemplo enumerado, SEQ ID NO: 1, se ha discutido anteriormente, y los resultados de los experimentos de ligación que usan SEQ ID NO: 1 se muestran en la Figura 1. Como se discutió anteriormente, SEQ ID NO: 1 es una combinación de una secuencia líder que contiene 10 His (SEQ ID NO: 4), la proteína de unión a ADN p50 (SEQ ID NO: 2), una secuencia flexible rica en glicina (SEQ ID NO: 5) y ADN ligasa Tth (SEQ ID NO: 3), en la que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 está unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 que está unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 que está unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3; esta combinación se denomina “4-2-5-3” en la columna más a la izquierda de la Tabla 4. (El término “4-2-5-3” indica una proteína de fusión lineal en la que las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 3 están unidas como están escritas, desde el N-terminal (izquierda) al C-terminal (derecha)). Las combinaciones adicionales de tales componentes ilustran algunas de las muchas proteínas de fusión posibles que tienen características como se describe en esta memoria. Las otras proteínas de fusión enumeradas en la Tabla 4 incluyen combinaciones adicionales de secuencias líder (SEQ ID NO: 4) con una proteína de unión a ADN (p. ej., SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7), una secuencia flexible rica en glicina (SEQ ID NO: 5), y una ADN ligasa (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10). Por lo tanto, las proteínas de fusión ejemplares descritas en la Tabla 4 incluyen una secuencia de aminoácidos de una secuencia líder rica en histidina, una ADN ligasa y una secuencia enlazadora flexible rica en glicina (es decir, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12) unida covalentemente a una ligasa (p. ej., SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10). Se cree que estas proteínas de fusión ejemplares proporcionan aún más ligasas de ácido nucleico de extremos romos termoestables.

Tabla 4

| Proteína de fusión formada por SEQ ID NOs: | Secuencia de proteína | SEQ ID NO: |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4-2-5-3 | <p>mgghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfryvcegps hggllpgasseknkksypqvkiicnyvgpakvivqlvtngknihlhahslv gkhcedgictvtagpkdmvvgfanlgilhvtkkkvfetlearnmteacir gypngllvhpdlaylqaeggdrqlgdrekelirqaalqqtkemdlsv rlmftaflpdstgstrrrlepvsdaiydskapnasnlkivrmrdtagc vtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeenggwefgdfspdvhrqfa ivfktpkykdnitkpasvfvqlrrksdletsepkipflyypeikdkeev qrkrqkgssgtsgggsggmtleearkrvnelrdliryhnyryyvladp eisdaeydrllrelkeleerfelkspdsptlqvgarpleatfrpvrhp trmysldnafnldealkafeerieralgrkqpfaytvehkvdglsvnlly eegvlvygatrgdgevgeevtqnl11tiptiprllkgvperlevrgevym pieaflrlneeleergerifknprnaaagslrqkdpritakrglratfy alglgleeveregvatqfallhwlkekgfpvehgyaravgaegveavyq dwlkkrralpfeadgvvkladelalwrelgytaraprfaiaaykfpaeek etrllldvfvqvgtrgrvtpvgilepvflegsevsrvtlhnesyieeldi rigdvwlvhkaggvipevlrvlkerntgeerpirwpetcpecghrllke gkvhrpcnplcpakrfeairhfaskamdiqglgeklrierlllekglvkd vadlyrlrkedlvglermgeksaqnllrqieeskkrglerllyalglpg vgevlarnlaarfngmndrllleasleelleveevgeltarailetlkdp frdlvrrlkeagvemeakekggealkglftvitgelsrpreevkalrr lgakvtdsvsrktsylvvgenpgsklekaralgvptlteeelyrlllear tgkkaeelv</p> | 1 |
| 4-2-5-8 | <p>Mghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfryvcegps hggllpgasseknkksypqvkiicnyvgpakvivqlvtngknihlhahslv gkhcedgictvtagpkdmvvgfanlgilhvtkkkvfetlearnmteacir gypngllvhpdlaylqaeggdrqlgdrekelirqaalqqtkemdlsv rlmftaflpdstgstrrrlepvsdaiydskapnasnlkivrmrdtagc vtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeenggwefgdfspdvhrqfa ivfktpkykdnitkpasvfvqlrrksdletsepkipflyypeikdkeev qrkrqkgssgtsgggsggmilkiilneiasigstkqkqaileknkdnel lkrvyrltysrglqyyikkwpkpgiatqsfgm1tldmldfieftlatr kltgnaaieeltgyitdgkddvevlrrvmrdlecgasvsiankvwpg lipeqqmlassydekinknikfpafaqlkadgarcfaevrgdelddv rllsragneylgldllkeelikmtaearqihpegvldgelvyheqvkk epeglldflfdaypensakakefaevaesrtasngianslkgitisekeaq cmkfqvwyvplveiyslpafrlkydvrfskleqmtsgydkvlieny vnnldeakviykyidqglegiilknidglwenarsknlykfkvidvd lkivgiyphrkdpdkaggfilesecgkikvnagsglkdkagvksheldr trimenqnyyigkilececnqwlksdgrtdyvkflflpiairlredkka ntfedvfgdfhevtgl</p> | 13 |
| 4-2-5-9 | <p>Mghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfryvcegps hggllpgasseknkksypqvkiicnyvgpakvivqlvtngknihlhahslv gkhcedgictvtagpkdmvvgfanlgilhvtkkkvfetlearnmteacir gypngllvhpdlaylqaeggdrqlgdrekelirqaalqqtkemdlsv rlmftaflpdstgstrrrlepvsdaiydskapnasnlkivrmrdtagc vtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeenggwefgdfspdvhrqfa ivfktpkykdnitkpasvfvqlrrksdletsepkipflyypeikdkeev qrkrqkgssgtsgggsggmrylelaqlqyklettmkliktrlvadfl kkvpddhlefiypylilgdvfpewderelgvgeklilikavamatgidane iensvkdtdgldgesialavkkrkqksffsqpltikrvyqtlvkvactg egsqekkmkylanlfmdaepieakylartvlgtrmrtgvaegllrdaial afhvkvelveraymltsdfgfvakvaklegneglakvqvqigkpiqpml aqqaanikeallemggeaeifeikydgavrvhkdgdkiivysrrlenvt raipeivealkqsvkpnkaivegelvaigedgrplpfqyvlrrfrkhn iqemmkkiplelnlfdvlyvdgesmidvkkfidrrkkleeieepngkikv aenlitkkveeaeafykakalemheglmakrldatyepgnrgkkwlkik ptmenldlviigaewgegrrahllgsfilgaydpetgeflevgkvqsgf tdedlveftkmlkpliikeegkrvwiepkivievtqeiqkspkyksf alrfpryvalrddkpedadtieriaqlyelqermkgkv</p> | 14 |

| | | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <p>4-2-5-10</p> | <p>mgghhhhhhhhhssghiegrasadgpylqileqpkqrgfrfryvcegps hggllpgasseknkksypqvkicnyvgpakvivqlvtngknihlhahslv gkhcedgictvttagpkdmvvgfanlgilhvtkkkvfetlearnmteacir gypngllvhpdlaylqaeegggdrqlgdrekelirqaalqqtkemdlsvv rlmftafldstgstrrlepvsdaiydskapnasnkivmrdrtagc vtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeeenggvwegfgdfsptdvhrqfa ivfktkpykdinitkpasvfvqlrrksdletsepkpfllyypeikdkeev qrkrqkgssgtsgggsggmrylelaqlyqklekttmkliktrlvadfl kkvpddhlefiptylilgdvfpewderelgvgekllovakamatgidane iensvkdtdgdlgesialavkrkqksffsqpltikrvyqtlvkaettg egsqekkmkylanlfmdaepieakyaartvlgmtmrtgvaegllrdaial afhvkvelveraymltsdfgfvakvaklegneglakvqvqigkpkpml aqqaanikealleemgeaeifeikydgavqvhkdgdkiivysrrlenvt raiprivealkqsvkpnkaivegelvaigedgrplpfqyvllrrfrkhn iqemmkkiplnlfdvlyvdgesmidvkdifdrkkleeieepngkikv aenlitkkveeaeafykkalemgheglmakrlatyeppgnrgkkwlkik ptmenldlviigaewgegrahlhgsfilgaydpetgeflevgkvgsqf tdedlveftkmlkpliikeegkrvwiepkivievtyqeiqkspkyksqf alrfpryvalrddkqp</p> | <p>15</p> |
| <p>4-7-5-3</p> | <p>Mghhhhhhhhhssghiegrassptsymspslpaldwqlpshsgpyelr ievqpkshhrahayetegsrgavkasagghpivqlhgylenepltlqlfi gtaddrllrphafyqvhrigtktvsttsheillsntkvleiplpenm raaidcagilklnrsdielrkgetdigrkntvrllvfrvhipqpngrtl slqasnkvirmrdrtagcvtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeeengg vwegfgdfsptdvhrqfaivfktkpykdinitkpasvfvqlrrksdlet sepkpfllyypeikdkeevqrkrqkgssgtsgggsggmtleearkvrne lrdliryhnyryyvladpeisdaeydrllrelkeleerfelkspdspt lqvgarpleatfrprhptrmysldnafnldekafeerieralgrkqp faytvehkvdglsvnllyeegvlygatrgdgevgeevtqnlltiptip rrlkgvperlevrgevympieaflrlneeleergerifknprnaaagsl rqkdpritakgrlatfyalglgleeveregvatqfallhwlkekgfpv ehgyaravgaegveavyqdwllkrralpfadgvvvkldeialwrelgy taraprfaiaaykfpaeeketrllldvfvqvgtrgrvtpvgilepvflegs evsrvtlhnesyieeldirigdwlvvhkaggvipevlrvlkertrtgeer pirwpetcpecghrllkegkvhrpnplcpakrfeairhfaskamdiq glgeklierllekglvkdvadlyrlrkedlvglermgeksaqnllrqie eskkrqlerllyalglpgvgevlarnlaarfgnmdrllleasleelleve evgeltarailetlkdpafrdlvrrlkeagvemeakekggealkgltfv itgelsrpreevkallrrlgakvtdsvsrktsylvvgenpgsklekar lgvptlteelyrllleartgkkaeelv</p> | <p>16</p> |
| <p>4-7-5-8</p> | <p>Mghhhhhhhhhssghiegrassptsymspslpaldwqlpshsgpyelr ievqpkshhrahayetegsrgavkasagghpivqlhgylenepltlqlfi gtaddrllrphafyqvhrigtktvsttsheillsntkvleiplpenm raaidcagilklnrsdielrkgetdigrkntvrllvfrvhipqpngrtl slqasnkvirmrdrtagcvtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeeengg vwegfgdfsptdvhrqfaivfktkpykdinitkpasvfvqlrrksdlet sepkpfllyypeikdkeevqrkrqkgssgtsgggsggmilkiilneiasi gstkqkqaileknkdnellkrvyrltysrglqyyikkwpkpgiatqsf mltdmldfieftlatrkltgnaaieeltgyitdgkkddvevlrvmm rdlecgasvsiankvwpglipeqpgmlassydekginknikfpafaqlk adgarcfavrgdelddvrlsragnelygldllkeelikmtaearqih pegvlidgelvyheqvkkepegldfldaypensakefaevaesrtas ngiankslqgtisekeaqcmkfqvwdyvplveiyslpafrlkydvrfsk leqmtsdykvilienqvvnndeakviykkyidqglegiilknidglw enarsknlykfkveidvdlkivgiyphrkdptkaggfilesecgkikvn agsglkdkagvksheldrtrimenqnyyigkilececongwlksdgrtdy vklflpiairlredkktantfedvfgdfhevtgl</p> | <p>17</p> |

| | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <p>4-7-5-9</p> | <p>Mghhhhhhhhhssghiegrassptsymspslpaldwqlpshsgpyelr ievqpkshhrahyetegsrgavkasagghpivqlhgylenepltlqlfi gtaddrllrphafyqvhrigtktvsttsheiiisntkvleiplpenm raiidcagilklnrsdielrkgetdiqrkntvrvlvfrvhipqpngrtl slqasnkvrmrdrtagcvtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeeengg vwegfgdfsptdvhrqfaivfktkpkydinitkpasvfvqlrrksdlet sepkpfllyypeikdkeevqrkrqkgsstsgggsggmrylelaqlyqk lekttmkliktrlvadflkkvpddhlefipyililgdvfpewderelgv ekllikavamatgidaneiensvkdtdgdlgesialavkkrkqksffsq ltikrvyqtlvkvaettgegsqekmkyanlfmdaepieakyaartvl gtmrtgvaegllrdaialafhvkvvelveraymltsdfgvvaklegn eglakvqvqigkpkpmlaqaanikeallemggeaefeikydgavrvq hkdgdkiivysrrlenvtraipeivealkqsvkpnkaivegelvaiged grplpfqyvllrrfrkhnigemmkkiplelnlfdvlyvdgesmidvkfi drkkleeiiepngkikvaenlitkkveeaeafykkalemgheglmakr ldatyepgnrgkklkikptmenldlviigaewgegrahllgsfilga ydpetgeflevgkvsgftdedlveftkmlkpliikeegkrvwiepkiv ievtyqeiqkspkyksgfalrfpryvalrddkqpedadtieriaqlyel qermkgkv</p> | <p>18</p> |
| <p>4-7-5-10</p> | <p>Mghhhhhhhhhssghiegrassptsymspslpaldwqlpshsgpyelr ievqpkshhrahyetegsrgavkasagghpivqlhgylenepltlqlfi gtaddrllrphafyqvhrigtktvsttsheiiisntkvleiplpenm raiidcagilklnrsdielrkgetdiqrkntvrvlvfrvhipqpngrtl slqasnkvrmrdrtagcvtggeeiyllcdkvqkddiqirfyeeeengg vwegfgdfsptdvhrqfaivfktkpkydinitkpasvfvqlrrksdlet sepkpfllyypeikdkeevqrkrqkgsstsgggsggmrylelaqlyqk lekttmkliktrlvadflkkvpddhlefipyililgdvfpewderelgv ekllikavamatgidaneiensvkdtdgdlgesialavkkrkqksffsq ltikrvyqtlvkvaettgegsqekmkyanlfmdaepieakyaartvl gtmrtgvaegllrdaialafhvkvvelveraymltsdfgvvaklegn eglakvqvqigkpkpmlaqaanikeallemggeaefeikydgavrvq hkdgdkiivysrrlenvtraipeivealkqsvkpnkaivegelvaiged grplpfqyvllrrfrkhnigemmkkiplelnlfdvlyvdgesmidvkfi drkkleeiiepngkikvaenlitkkveeaeafykkalemgheglmakr ldatyepgnrgkklkikptmenldlviigaewgegrahllgsfilga ydpetgeflevgkvsgftdedlveftkmlkpliikeegkrvwiepkiv ievtyqeiqkspkyksgfalrfpryvalrddkqp</p> | <p>19</p> |

Las secuencias de proteínas de fusión indicadas anteriormente proporcionan ejemplos de ligasas de extremos romos que incluyen porciones de ADN ligasa. Las proteínas de fusión adicionales que se cree que son útiles como ligasas de extremos romos, y se cree que son útiles como ligasas de ácidos nucleicos de extremos romos termoestables, incluyen proteínas de fusión adicionales que comprenden variantes de las secuencias de proteínas de fusión descritas en esta memoria mediante SEQ ID NO: . En realizaciones, dichas proteínas de fusión adicionales que se cree que son útiles como ligasas de extremos romos, y que se cree que son útiles como ligasas de ácidos nucleicos de extremos romos termoestables, son variantes homólogas de las secuencias de proteínas de fusión descritas en esta memoria mediante SEQ ID NO: , p. ej., variantes homólogas que tienen más del 90%, o más del 95%, o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con una secuencia de proteína de fusión descrita en esta memoria mediante SE ID NO: .

Como se discutió anteriormente, una segunda secuencia de aminoácidos que tiene homología de secuencia con una primera secuencia de aminoácidos puede diferir desde el primer aminoácido solo por sustituciones conservativas; es decir, un residuo de la segunda secuencia de aminoácidos es o a) idéntico al residuo correspondiente en la primera secuencia de aminoácidos; o b) un miembro del mismo grupo de aminoácidos que el residuo correspondiente en la primera secuencia de aminoácidos, donde el grupo se basa en las propiedades comunes de la cadena lateral como se describe anteriormente; o c) una sustitución ejemplar o preferida (como se identificó anteriormente en la Tabla 1C anterior).

Por ejemplo, proteínas de fusión adecuadas incluyen proteínas de fusión que tienen más del 90%, o más del 95%, o más del 99%, de homología de secuencia o de identidad de secuencia con una proteína de fusión que tiene una composición 4-proteína de unión a ADN-5-ADN ligasa (escrita en la orientación de N-terminal a C-terminal), donde la "proteína de unión a ADN" indica la secuencia de aminoácidos de una proteína de unión a ADN y "ADN ligasa" indica la secuencia de aminoácidos de una ADN ligasa incluida en la proteína de fusión. Como se discutió anteriormente, ejemplos de proteínas de unión a ADN incluyen la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7; ejemplos de ADN ligasas incluyen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Ejemplo 3

Las proteínas de fusión adicionales que se cree que son útiles como ligasas de extremos romos, y se cree que son útiles como ligasas de ácidos nucleicos de extremos romos termoestables, incluyen proteínas de fusión como se describe en esta memoria, donde la proteína de unión a ADN se reemplaza por una proteína de unión a ARN y donde la ligasa comprende una proteína ARN ligasa en proteínas de fusión que tienen una composición 4-proteína de unión a ARN-5-ARN ligasa (escrita en la orientación N-terminal a C-terminal), donde "proteína de unión a ARN" indica la secuencia de aminoácidos de una proteína de unión a ARN y "ARN ligasa" indica la secuencia de aminoácidos de una ARN ligasa incluida en la proteína de fusión. En realizaciones, la ARN ligasa puede ser una ARN ligasa termoestable. Por lo tanto, una proteína de fusión como se describe en esta memoria que tiene actividad ARN ligasa, y que se cree que tiene actividad ARN ligasa termoestable, comprende un polipéptido lineal que tiene una composición que incluye secuencias de aminoácidos unidas covalentemente (en el siguiente orden N-terminal a C-terminal) SEQ ID NO: 4, proteína de unión a ARN, SEQ ID NO: 5, ARN ligasa.

Además, las proteínas de fusión de ARN ligasa adecuadas incluyen proteínas de fusión de ARN ligasa que tienen una homología de secuencia superior al 90%, o superior al 95% o superior al 99% con una proteína de fusión que tiene una composición 4-proteína de unión a ARN-5-ARN ligasa. Como se discutió anteriormente, una segunda secuencia de aminoácidos que tiene homología de secuencia con una primera secuencia de aminoácidos puede diferir desde el primer aminoácido sólo por sustituciones conservativas; es decir, un residuo en la segunda secuencia de aminoácidos es o a) idéntico al residuo correspondiente en la primera secuencia de aminoácidos; o b) un miembro del mismo grupo de aminoácidos que el residuo correspondiente en la primera secuencia de aminoácidos, donde el grupo se basa en las propiedades comunes de la cadena lateral como se describe anteriormente; o c) una sustitución ejemplar o preferida (como se identificó anteriormente en la Tabla 1C anterior).

Ejemplo 4

Las proteínas que tienen características como se describen en esta memoria incluyen proteínas que son homólogas a cualquiera de las proteínas de fusión descritas en esta memoria. Se cree que dichas proteínas son adecuadas para usar como ligasas de ácidos nucleicos, que se incluyen como ligasas de ácidos nucleicos termoestables. Por ejemplo, se cree que dichas proteínas son adecuadas para usar como ADN ligasas de extremos romos termoestables, que se incluyen como ADN ligasas de extremos romos termoestables. Se cree además que dichas proteínas son adecuadas para usar como ARN ligasas de extremos romos, que se incluyen como ARN ligasas de extremos romos termoestables.

Las proteínas que son homólogas a cualquiera de las proteínas de fusión descritas en esta memoria pueden proporcionarse aportando proteínas variantes que tienen una homología de secuencia superior al 90%, o superior al 95% o superior al 99% con una proteína de fusión descrita en esta memoria. Por ejemplo, las proteínas concretas que son homólogas a cualquiera de las proteínas de fusión descritas en esta memoria pueden proporcionarse aportando proteínas variantes que tienen más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 19 (es decir, tener más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o identidad de secuencia con una proteína de fusión de la Tabla 4).

Las proteínas de fusión como se describen en esta memoria incluyen una composición que tiene la forma general de una molécula lineal que tiene una secuencia líder rica en histidina unida covalentemente a una secuencia de proteína de unión a ácido nucleico que está unida covalentemente a una secuencia flexible rica en glicina que está unida covalentemente a una secuencia de ligasa de ácido nucleico. En realizaciones, dichas proteínas de fusión pueden ser proteínas que incluyen una o más sustituciones, inserciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de proteína de fusión proporcionada como un listado de secuencias en esta memoria. En realizaciones, dichas proteínas de fusión pueden ser proteínas que incluyen una o más sustituciones, inserciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia líder rica en histidina, una secuencia de proteína de unión a ácido nucleico, una secuencia flexible rica en glicina o una secuencia de ligasa de ácido nucleico proporcionada como un listado de secuencias en esta memoria.

Por ejemplo, las proteínas de fusión homólogas que tienen características descritas en esta memoria pueden incluir secuencias líder ricas en histidina diferentes a, aunque homólogas a, la SEQ ID NO: 4; p. ej., que tienen secuencias líder ricas en histidina que tienen más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4. Se entenderá que dichas secuencias líder homólogas ricas en histidina pueden incluir el mismo número, o pueden incluir un número mayor, o pueden incluir un número más pequeño, de residuos de aminoácidos que la SEQ ID NO: 4.

Por ejemplo, las proteínas de fusión homólogas que tienen características descritas en esta memoria pueden incluir secuencias flexibles ricas en glicina diferentes a, aunque homólogas a, la SEQ ID NO: 5; p. ej., que tienen secuencias flexibles ricas en glicina que tienen más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. Se entenderá que dichas secuencias flexibles homólogas ricas en glicina pueden incluir el mismo número, o pueden incluir un número mayor, o pueden incluir un número más pequeño, de residuos de aminoácidos que la SEQ ID NO: 5.

5 Por ejemplo, las proteínas de fusión homólogas incluyen proteínas de fusión que tienen composiciones homólogas a cualquiera de las proteínas descritas en esta memoria como 4-2-5-3, 4-2-5-8, 4-2-5-9 y 4-2-5-10, donde la secuencia "2" se reemplaza por una secuencia que tiene más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; o donde la secuencia "3", u "8", o "9", o "10" se reemplaza por una secuencia que tiene más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En realizaciones, tanto la secuencia "2" se reemplaza por una secuencia homóloga como la secuencia "3", u "8", o "9", o "10" se reemplaza por una secuencia homóloga.

10 Además, las proteínas de fusión homólogas incluyen proteínas de fusión que tienen composiciones homólogas a cualquiera de las proteínas descritas en esta memoria como 4-7-5-3, 4-7-5-8, 4-7-5-9 y 4-7-5-10, donde la secuencia "7" se reemplaza por una secuencia que tiene más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7; o donde la secuencia "3", u "8", o "9", o "10" se reemplaza por una secuencia que tiene más del 90%, o más del 95% o más del 99% de homología de secuencia o de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En realizaciones, tanto la secuencia "7" se reemplaza por una secuencia homóloga como la secuencia "3", u "8", o "9", o "10" se reemplaza por una secuencia homóloga.

20 Si bien lo anterior es una descripción completa de la realización preferida como se describe en esta memoria, es posible usar diversas alternativas, modificaciones y equivalentes. Por lo tanto, el alcance de la presente invención debería determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino que debería, en cambio, determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con su alcance completo de equivalentes. Cualquier característica, ya sea preferida o no, se puede combinar con cualquier otra característica, ya sea preferida o no. Las reivindicaciones adjuntas no deben interpretarse como que incluyen limitaciones de medios más función, a menos que dicha limitación se narre explícitamente en una reivindicación dada usando la frase "medios para". Debe entenderse que tal como se usa en la descripción en esta memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "una" y "el/la" incluye una referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También, como se usa en la descripción en esta memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, los significados de "en" incluyen "en" y "sobre" a no ser que el contexto indique expresamente lo contrario. Finalmente, tal como se usa en la descripción de esta memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, los significados de "y" y "o" incluyen tanto el conjuntivo como el disyuntivo y pueden usarse indistintamente a menos que el contexto indique expresamente lo contrario. Por lo tanto, en contextos donde se usan los términos "y" o "o", el uso de dichas conjunciones no excluye un significado "y/o" a menos que el contexto indique expresamente lo contrario.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una ADN ligasa de extremos romos termoestable que comprende una proteína de fusión que comprende, en orden N-terminal a C-terminal, una secuencia líder que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, una proteína de unión a ADN, una secuencia de aminoácidos flexible rica en glicina, y una ADN ligasa, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable es adecuada para usar en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a 60°C o más.
- 2.** La ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1, que comprende una ADN ligasa T4 con una fusión N-terminal de p50.
- 10 **3.** La ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, y SEQ ID NO: 19.
- 15 **4.** Un método para unir ADN de extremos romos a una temperatura de 60°C o más, que comprende unir ADN de extremos romos usando una ADN ligasa de extremos romos termoestable adecuada para usar en una reacción de ligación de extremos romos realizada a 60°C o más, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1.
- 5.** Un artículo de fabricación, que comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable adecuada para usar en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a 60°C o más y un recipiente, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1.
- 20 **6.** El artículo de fabricación de la reivindicación 5, que comprende además un tampón.
- 7.** Un dispositivo para analizar una muestra que contiene ADN, en donde el dispositivo comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable adecuada para usar en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a 60°C o más, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable se selecciona de una ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1.
- 25 **8.** El método de la reivindicación 4, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable es adecuada para usar en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a 75°C, y dicha ligación se realiza a 75°C.
- 30 **9.** La ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable es capaz de producir concatámeros tras múltiples eventos de ligación en una reacción de ligación de ADN de extremos romos realizada a 60°C o más.
- 10.** La ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1, en donde dicha ADN ligasa de extremos romos termoestable es adecuada para usar en un esquema de amplificación de ácido nucleico que funciona a una temperatura uniforme de 60°C o más.
- 35 **11.** La ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1, en donde dicha proteína de fusión comprende un componente seleccionado de un enlazador peptídico, una adición N-terminal, una adición C-terminal, un péptido marcador, un D-aminoácido, un péptido mimético, un azúcar y un polímero.
- 12.** La ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de aminoácidos flexible rica en glicina comprende SEQ ID NO: 5.
- 40 **13.** Un método para unir ácidos nucleicos de extremos romos a una temperatura elevada, que comprende usar una ligasa de ácido nucleico de extremos romos termoestable de la reivindicación 3 a una temperatura de 60°C o más.
- 14.** Un dispositivo para analizar una muestra que contiene ácidos nucleicos, en donde el dispositivo comprende una ADN ligasa de extremos romos termoestable de la reivindicación 1.
- 45 **15.** El dispositivo de la reivindicación 14, en donde dicha ligasa de extremos romos termoestable comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, y SEQ ID NO: 19.

| | |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|
| EE0139 | /5Phos/AATTCTCTTTAAATAAACCCCAAGGTCTCAGATTTTCATGCAGATTGTGTC (SEQ ID NO: 20) |
| EE0140 | /5Phos/GACACAATCTGCATGAAATCTGAGACCTTGGGTTTATTTAAAGAGAATT (SEQ ID NO: 21) |

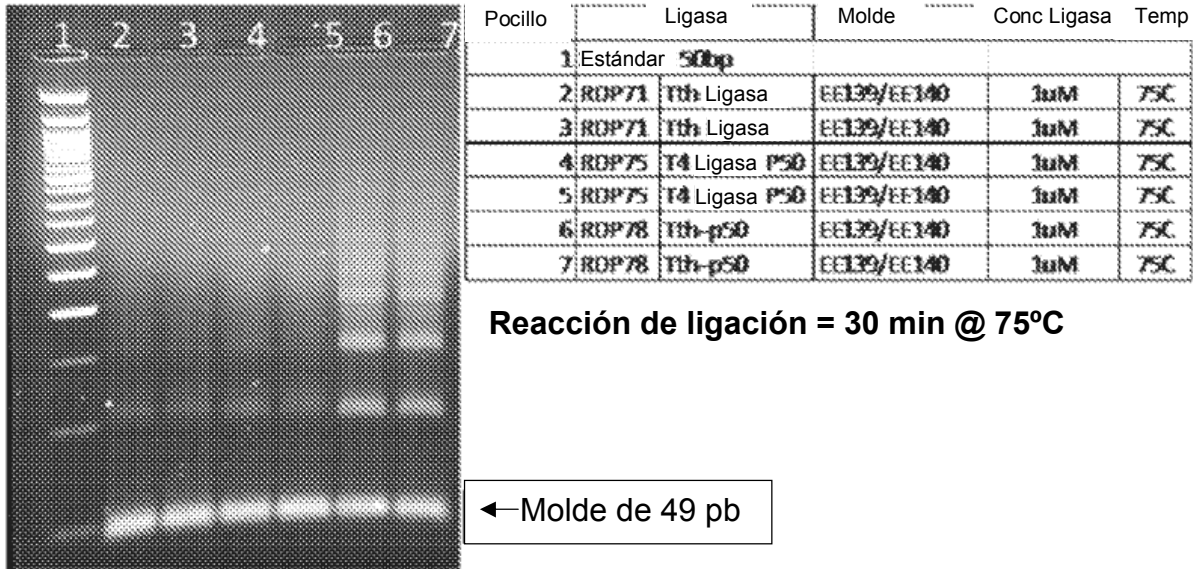


Fig. 1