

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 448**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2012 PCT/EP2012/004993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083264**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2012 E 12809109 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2788481**

54 Título: **ADN polimerasas con actividad mejorada**

30 Prioridad:

**08.12.2011 US 201161568294 P**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAUER, KEITH;  
MYERS, THOMAS, W. y  
SUKO, SHAWN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 668 448 T3

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

## DESCRIPCIÓN

ADN polimerasas con actividad mejorada

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona ADN polimerasas con actividades mejoradas, que incluyen un aumento de la eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de la transcriptasa inversa (RT) y de la polimerasa, así como el uso de dichas polimerasas en diversas aplicaciones, incluyendo la extensión y amplificación de polinucleótidos de ácidos nucleicos.

**Antecedentes de la invención**

Las ADN polimerasas son responsables de la replicación y el mantenimiento del genoma, un papel que es fundamental para transmitir con precisión la información genética de generación a generación. Las ADN polimerasas funcionan en las células como las enzimas responsables de la síntesis del ADN. Polimerizan los desoxirribonucleósidos trifosfato en presencia de un activador de metal, tal como  $Mg^{2+}$ , en un orden dictado por el molde de ADN o molde de polinucleótido que se copia. *In vivo*, las ADN polimerasas participan en un espectro de procesos de síntesis del ADN, incluyendo la replicación del ADN, reparación del ADN, recombinación y amplificación génica. Durante cada proceso de síntesis del ADN, el molde de ADN se copia una vez o, como máximo, unas pocas veces para producir réplicas idénticas. Por el contrario, *in vitro*, la replicación del ADN se puede repetir muchas veces, tal como, por ejemplo, durante la reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.683.202).

En los estudios iniciales con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se añadió la ADN polimerasa al inicio de cada tanda de replicación del ADN (véase la patente de EE. UU. n.º 4.683.202, *supra*). Posteriormente, se determinó que se podían obtener ADN polimerasas termoestables a partir de bacterias que crecen a temperaturas elevadas y que únicamente se necesita añadir estas enzimas una vez (véase la patente de EE. UU. n.º 4.889.818 y la patente de EE. UU. n.º 4.965.188). A las temperaturas elevadas usadas durante la PCR, estas enzimas no se inactivan irreversiblemente. Como resultado, se pueden llevar a cabo ciclos repetitivos de reacciones en cadena de la polimerasa sin añadir nuevas enzimas al inicio de cada proceso de adición de síntesis. Las ADN polimerasas, particularmente las polimerasas termoestables, son la clave de un gran número de técnicas en estudios de ADN recombinante y en el diagnóstico médico de enfermedades. Para aplicaciones diagnósticas, en particular, una secuencia de ácidos nucleicos diana únicamente puede ser una pequeña porción del ADN o ARN en cuestión, de modo que puede ser difícil detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana sin amplificación.

El patrón de plegamiento global de las ADN polimerasas se asemeja a la mano derecha humana y contiene tres subdominios distintos de palma, dedos y pulgar (véase Beese *et al.*, *Science* 260:352-355, 1993); Patel *et al.*, *Biochemistry* 34:5351-5363, 1995). Mientras que la estructura de los subdominios de dedos y pulgar varían en gran medida entre polimerasas que difieren en tamaño y en funciones celulares, todos los subdominios catalíticos de la palma se pueden superponer. Por ejemplo, el motivo A, que interactúa con el dNTP de entrada y estabiliza el estado de transición durante la catálisis química, se puede superponer con una desviación media de aproximadamente un Å entre las ADN polimerasas de la familia pol  $\alpha$  de mamíferos y pol I de procariontes (Wang *et al.*, *Cell* 89:1087-1099, 1997). El motivo A comienza estructuralmente en una cadena  $\beta$  antiparalela que contiene predominantemente residuos hidrófobos y continúa en una hélice  $\alpha$ . La secuencia de aminoácidos primaria de los sitios activos de la ADN polimerasa está excepcionalmente conservada. Por ejemplo, en el caso del motivo A, se retiene la secuencia DYSQIELR (SEQ ID NO: 22) en polimerasas de organismos separados por muchos millones de años de evolución, incluyendo, por ejemplo, *Thermus aquaticus*, *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli*.

Además de estar bien conservado, también se ha demostrado que el sitio activo de las ADN polimerasas es relativamente mutable, puede acomodar determinadas sustituciones de aminoácidos sin reducir significativamente la actividad de la ADN polimerasa (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.602.695). Dichas ADN polimerasas mutantes pueden ofrecer diversas ventajas selectivas, por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas y de investigación que comprenden reacciones de síntesis de ácidos nucleicos.

Existen al menos dos etapas en el proceso enzimático de la polimerización del ADN; 1) la incorporación del nucleótido de entrada y 2) la extensión del nucleótido recién incorporado. En general, se considera la lealtad o "fidelidad" global de la ADN polimerasa como un conglomerado de estas dos actividades enzimáticas, pero las etapas son distintas. Una ADN polimerasa puede incorporar erróneamente el nucleótido de entrada, pero, si no se extiende eficazmente, la velocidad de extensión disminuirá de forma importante y la formación del producto global será mínima. De forma alternativa, es posible tener una ADN polimerasa que incorpore erróneamente el nucleótido de entrada y fácilmente extienda erróneamente el emparejamiento erróneo recién formado. En este caso, la velocidad de extensión global sería alta, pero la fidelidad global sería baja. Un ejemplo de este tipo de enzima sería la ADN polimerasa ES112 (ADN polimerasa E683R Z05, véase el documento US 7.179.590) cuando se usa  $Mn^{2+}$  como el activador de ion de metal divalente. La enzima tiene una eficacia muy alta porque, a diferencia de las ADN polimerasas típicas que tienden a vacilar/bloquearse al encontrar un emparejamiento erróneo, la ADN polimerasa ES112 extiende fácilmente el emparejamiento erróneo. El fenotipo mostrado en ES112 es más pronunciado durante la etapa de RT, supuestamente

a causa de los efectos estructurales del heterodúplex ARN/ADN frente al homodúplex ADN/ADN. Un segundo ejemplo sería si la ADN polimerasa fácilmente no incorpora erróneamente (puede ser incluso menos probable incorporar erróneamente), pero sí tiene capacidad incrementada para extender erróneamente un emparejamiento erróneo. En este caso, no se altera significativamente la fidelidad para el producto global. En general, este tipo de enzima es más favorable para las reacciones de extensión que las características de ES112 en  $Mn^{2+}$  porque se mejora la fidelidad del producto. Sin embargo, este atributo se puede utilizar para permitir la extensión errónea de un cebador oligonucleotídico emparejado erróneamente, tal como sucede cuando un cebador oligonucleotídico de una secuencia única se hibrida a una diana que tiene heterogeneidad de secuencia (por ejemplo, dianas víricas), pero la velocidad de incorporación errónea normal o más baja permite la finalización de la síntesis del ADN más allá del cebador oligonucleotídico original. Un ejemplo de este tipo de ADN polimerasa es la ADN polimerasa Z05 D580G (véase la publicación de patente de EE. UU. n.º 2009/0148891). Este tipo de actividad se denomina "tolerante al emparejamiento erróneo" a causa de que es más tolerante a los emparejamientos erróneos en el cebador oligonucleotídico. Mientras que los ejemplos anteriores han analizado las reacciones de tipo de extensión del cebador, la actividad puede ser más significativa en reacciones tales como RT-PCR y PCR en las que con frecuencia se produce nuevamente la extensión del cebador. Los datos sugieren que, aunque las enzimas, tales como Z05 D580G, son más "tolerantes" a los emparejamientos erróneos, también tienen capacidad potenciada para extender los cebadores oligonucleotídicos que contienen bases modificadas (por ejemplo, bases modificadas con t-butilbencilo) o en presencia de tintes de unión a ADN, tales como SYBR Green I (véase la publicación de patente de EE. UU. n.º 2009/028053).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es una técnica usada en muchas aplicaciones para detectar y/o cuantificar dianas de ARN mediante amplificación. Para poder amplificar dianas de ARN mediante PCR, en primer lugar, es necesario transcribir de manera inversa el molde de ARN en ADNc. Típicamente, los ensayos por RT-PCR dependen de una transcriptasa inversa no termoestable (ADN polimerasa dependiente de ARN), derivada de un organismo mesófilo, para la etapa de síntesis ADNc inicial (RT). Se requiere una ADN polimerasa termoestable adicional para la amplificación del ADNc para tolerar las temperaturas elevadas requeridas para la desnaturalización del ácido nucleico en la PCR. Existen varios beneficios potenciales de usar ADN polimerasas termoactivas o termoestables generadas para realizar una transcripción inversa más eficaz para los ensayos por RT-PCR. La actividad transcriptasa inversa incrementada acoplada con la capacidad de usar temperaturas de incubación de transcripción inversa más altas, que permiten la relajación de la estructura secundaria del molde de ARN, puede dar como resultado una sensibilidad del ensayo y una eficacia de la síntesis del ADNc global más altas. Una temperatura de incubación más alta también podría incrementar la especificidad reduciendo el falso cebado en la etapa de transcripción inversa. Las enzimas con eficacia de transcripción inversa mejorada pueden simplificar el diseño del ensayo permitiendo una concentración enzimática y/o tiempos de incubación de RT reducidos. Cuando se usan dUTP y UNG, los productos de extensión no específicos que contienen dUMP que se forman durante las condiciones establecidas no restrictivas se degradan mediante UNG y no se pueden utilizar ni como cebadores ni como moldes. Cuando se usa una transcriptasa inversa no termoestable (ADN polimerasa dependiente de ARN) derivada de un organismo mesófilo, no es posible utilizar las metodologías de dUTP y UNG. (Myers, T.W. *et al.*, Amplification of RNA: High Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with *Thermus thermophilus* DNA Polymerase, en PCR Strategies, Innis, M.A., Gelfand, D.H. y Sninsky, J.J., Eds., Academic Press, San Diego, CA, 58-68, (1995)). Sin embargo, el uso de una ADN polimerasa termoactiva o termoestable de la invención para la etapa de transcripción inversa posibilita que la reacción sea completamente compatible con la utilización del sistema de prevención de transferencia de dUTP/uracil-N-glucosilasa (UNG) (Longo *et al.*, Use of Uracil DNA Glycosylase to Control Carry-over Contamination in Polymerase Chain Reactions. *Gene* 93:125-128 (1990)). Además de proporcionar un control de la contaminación por transferencia, el uso de dUTP y UNG proporciona un "inicio en caliente" para reducir la amplificación no específica (Innis y Gelfand 1999).

### Breve resumen de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. En el presente documento se proporcionan ADN polimerasas que tienen actividades mejoradas, que incluyen aumento de la eficacia de transcriptasa inversa, y que pueden incluir mejora de la tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de RT y de polimerasa, en relación con una polimerasa de control no modificada correspondiente, y procedimientos de fabricación y uso de dichas ADN polimerasas. En particular, se proporciona una ADN polimerasa mejorada que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene una eficacia de transcriptasa inversa incrementada en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es M y en la que el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, S, G y A, y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es I y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es I. La ADN polimerasa mejorada puede tener la misma actividad polimerasa dependiente de ADN o sustancialmente similar en comparación con una ADN polimerasa de control. También se divulga una ADN polimerasa mejorada que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica) a la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I. En determinados modos de realización, la ADN polimerasa comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. Se divulga además que el

aminoácido en la posición correspondiente a la posición 616 de SEQ ID NO: 1 de la polimerasa mejorada se selecciona de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, L, M o H.

También se divulga una ADN polimerasa mejorada que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica) a la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D o E. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa corresponde a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es G.

También se divulga una ADN polimerasa mejorada que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica) a la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I. En el presente documento se divulga además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, S, G y A y, en particular, que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K.

También se divulga una ADN polimerasa mejorada que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica) a la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I. También se divulga una ADN polimerasa mejorada que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica) a la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K; y en la que el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, S, G y A. En el presente documento, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 puede ser G y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 puede ser K. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa mejorada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es M, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es G y el aminoácido correspondiente a posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa tiene la misma actividad polimerasa dependiente de ADN o sustancialmente similar en comparación con la ADN polimerasa de control.

También se divulga una ADN polimerasa mejorada que tiene una eficacia de transcriptasa inversa incrementada, opcionalmente sin una disminución sustancial de la actividad polimerasa dependiente de ADN, en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa corresponde a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I, y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es I y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es I. En el presente documento, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 puede ser M y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 pueden ser K. La ADN polimerasa mejorada puede comprender además una sustitución de aminoácido en el aminoácido correspondiente a posición 580 de la SEQ ID NO: 1. El aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 puede ser cualquier aminoácido distinto de I, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 puede ser cualquier aminoácido distinto de I y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 puede ser cualquier aminoácido distinto de D o E. También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es M, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es G.

Diversas ADN polimerasas son susceptibles de mutación de acuerdo con la presente invención. Son particularmente adecuadas las polimerasas termoestables, incluyendo polimerasas termoestables naturales de diversas especies de bacterias termófilas, así como polimerasas termoestables sintéticas derivadas de dichas enzimas naturales mediante sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos u otra modificación. Las formas no modificadas ejemplares de polimerasa incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa CS5, CS6 o Z05 o una ADN polimerasa funcional que tenga al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la misma. En determinados modos de realización, la identidad de secuencia de aminoácidos es de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 % y más preferentemente de al menos un 95 %. Otras polimerasas no modificadas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de

cualquiera de las siguientes especies de bacterias termófilas (o una ADN polimerasa funcional que tenga al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha polimerasa): *Thermotoga maritima*; *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*; *Thermus flavus*; *Thermus filiformis*; *Thermus* sp. Sps17; *Thermus* sp. Z05; *Thermotoga neopolitana*; *Thermosiphon africanus*; *Thermus caldophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus caldotenax*. En determinados modos de realización, la identidad de secuencia de aminoácidos es de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 % y más preferentemente de al menos un 95 %. Las polimerasas adecuadas también incluyen las que tienen actividad transcriptasa inversa (RT) y/o la capacidad de incorporar nucleótidos no convencionales, tales como ribonucleótidos u otros nucleótidos modificados en 2'.

Mientras que las ADN polimerasas termoestables que poseen actividad de transcripción inversa eficaz son particularmente adecuadas para realizar RT-PCR, especialmente RT-PCR de enzima única, las ADN polimerasas termoactivas, pero no termoestables, que poseen actividad de transcripción inversa eficaz también son susceptibles de mutación de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los atributos de incremento de la eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de RT son útiles para la etapa de RT en una RT-PCR y esta etapa no es necesario realizarla a temperaturas que inactivarían una ADN polimerasa termoactiva, pero no termoestable. Tras la etapa de RT, para realizar la etapa de amplificación por PCR se podría añadir una ADN polimerasa termoestable o podría estar ya incluida en la mezcla de reacción. Por ejemplo, se puede combinar la ADN polimerasa mejorada descrita en el presente documento con una segunda ADN polimerasa termoestable antes de la etapa de RT en un tampón adecuado para la extensión y amplificación de moldes ADN y ARN, como se describe en los ejemplos. Ejemplos de ADN polimerasas termoestables adecuadas se describen en la patente de EE. UU. n.º 4.889.818 y en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.773.258 y 5.677.152. La segunda ADN polimerasa termoestable puede ser la ADN polimerasa AmpliTaq® (Deoxinucleósido trifosfato: ADN desoxinucleotidiltransferasa, E.C.2.7.7.7). La segunda ADN polimerasa termoestable puede ser una polimerasa termoestable inactivada reversiblemente, como se describe a continuación. La polimerasa termoestable inactivada reversiblemente puede ser la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE. UU.). Esta segunda metodología se beneficiaría especialmente del uso de una ADN polimerasa termoestable modificada químicamente (u otra tecnología HotStart para inactivar la ADN polimerasa termoestable), de modo que no sea completamente activa durante la etapa de RT. Un ejemplo de una ADN polimerasa termoactiva, pero no termoestable, que posee actividad de transcripción inversa eficaz es la ADN polimerasa de *Carboxydotherrhus hydrogeniformans* (Chy); véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.468.775 y 6.399.320.

La ADN polimerasa puede tener al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1. La identidad de secuencia de aminoácidos es de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 % y más preferentemente de al menos un 95 %. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa de la *Thermus* sp. Z05 (Z05) (es decir, SEQ ID NO: 1), y el aminoácido en la posición 616 es cualquier aminoácido distinto de I. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 616 se puede seleccionar de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, L, M o H. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 616 puede ser M. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 que comprende además una sustitución en la posición 580, y el aminoácido en la posición 580 puede ser cualquier aminoácido distinto de D o E. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 puede ser cualquier aminoácido distinto de D. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 se puede seleccionar del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 puede ser G. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 que comprende además una sustitución en la posición 709, y el aminoácido en la posición 709 puede ser cualquier aminoácido distinto de I. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 709 se puede seleccionar del grupo que consiste en K, R, S, G y A. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 709 puede ser K.

La ADN polimerasa de control puede ser una polimerasa Z05, Z05 D580G o Z05 D580G 1709K.

Las polimerasas mutantes o mejoradas pueden incluir otras modificaciones no sustitutivas. Una de dichas modificaciones es una modificación covalente reversible térmicamente que inactiva la enzima, pero que se invierte para activar la enzima tras la incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura usada típicamente para la extensión de polinucleótidos. Los reactivos ejemplares para dichas modificaciones reversibles térmicamente se describen en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.773.258 y 5.677.152.

La actividad transcriptasa inversa se puede determinar realizando amplificación por RT-PCR en tiempo real y detección de un transcrito del virus de la hepatitis C (VHC) generado a partir de las primeras 800 bases de la 5'NTR del genotipo 1b del VHC en pSP64 poli(A) (Promega). Dos o más mezclas de reacción pueden tener números valorados de copias del transcrito del virus de la hepatitis C (VHC) (por ejemplo, valoraciones 1:5, valoraciones 1:10, por ejemplo, 10 000 copias, 1000 copias, 100 copias, 10 copias, 1 copia, 0 copias en varias mezclas de reacción). La capacidad de transcriptasa inversa de una polimerasa de la invención se puede comparar con la capacidad de transcriptasa inversa de una polimerasa de referencia (por ejemplo, una polimerasa natural, no modificada o de control), durante una unidad

de tiempo preseleccionada, como se describe en el presente documento. Las polimerasas con capacidad de transcriptasa inversa mejorada amplificarán el transcrito con mayor eficacia o requerirán un número más bajo de ciclos de PCR para amplificar el transcrito (es decir, presentan un valor de  $P_c$  más bajo, como se calcula en el presente documento), en comparación con una polimerasa natural o no modificada. Además, las polimerasas con función de RT mejorada también tienen replicación mejorada de moldes de ARN largos (por ejemplo, al menos 500 o 1000 o 2000 o 5000 o más nucleótidos de longitud). La eficacia de transcriptasa inversa mejorada puede incluir un tiempo de transcripción inversa más corto en comparación con una polimerasa de control. Por lo tanto, las polimerasas con eficacia de transcriptasa inversa incrementada transcribirán de manera inversa un molde de ARN más rápidamente que una polimerasa de control o de referencia.

En otros diversos aspectos, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica una ADN polimerasa mutante o mejorada de la invención, un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y una célula huésped transformada con el vector. En determinados modos de realización, el vector es un vector de expresión. Las células huésped que comprenden dichos vectores de expresión son útiles en los procedimientos de la invención para producir la polimerasa mutante o mejorada cultivando las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante. Las polimerasas de la invención pueden estar contenidas en kits y/o mezclas de reacción. Los aspectos de los ácidos nucleicos recombinantes, células huésped, vectores, vectores de expresión, mezclas de reacción y kits son como se describe anteriormente y en el presente documento.

En otro aspecto más se proporciona un procedimiento para llevar a cabo la extensión de polinucleótidos. El procedimiento incluye, en general, poner en contacto una ADN polimerasa que tenga incremento de la eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de RT y de polimerasa de la invención con un cebador, un molde de polinucleótido y nucleósidos trifosfato en condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido. Por ejemplo, el molde de polinucleótido puede ser un molde de ARN o ADN. En determinados modos de realización, la extensión de cebador comprende una etapa de transcripción inversa de menos de aproximadamente cinco minutos. En algunos modos de realización, las condiciones adecuadas para la extensión comprenden  $Mg^{2+}$ . Los nucleótidos trifosfato pueden incluir nucleótidos no convencionales, tales como, por ejemplo, ribonucleótidos y/o nucleótidos marcados. Además, el cebador y/o el molde pueden incluir uno o más análogos de nucleótidos. En algunas variaciones, el procedimiento de extensión de polinucleótidos es un procedimiento para la amplificación de polinucleótidos que incluye poner en contacto la ADN polimerasa mutante o mejorada con un par de cebadores, el molde de polinucleótido y los nucleósidos trifosfato en condiciones adecuadas para la amplificación del polinucleótido. La reacción de extensión de polinucleótidos puede ser, por ejemplo, PCR, extensión isotérmica o secuenciación (por ejemplo, la reacción de secuenciación 454). En determinados modos de realización, el procedimiento de extensión del cebador comprende una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El molde de polinucleótido puede ser de cualquier tipo de muestra biológica.

Opcionalmente, la reacción de extensión del cebador comprende un inhibidor real o potencial de una polimerasa de referencia o no modificada. El inhibidor puede inhibir la velocidad de extensión de ácido nucleico y/o la eficacia de transcripción inversa de una polimerasa de referencia o no modificada (de control). El inhibidor puede ser hemoglobina, o un producto de degradación de la misma. Por ejemplo, el producto de degradación de hemoglobina puede ser un producto de descomposición de hemo, tal como hemina, hematoporfirina o bilirrubina. El inhibidor puede ser un quelante de hierro o un pigmento púrpura. El inhibidor puede ser heparina o melanina. El inhibidor puede ser un tinte intercalante. En el presente documento, el tinte intercalante puede ser [2-[N-bis-(3-dimetilaminopropil)-amino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinio]<sup>+</sup>. El tinte intercalante puede ser [2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinio]<sup>+</sup>. El tinte intercalante puede no ser [2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinio]<sup>+</sup>. Las condiciones adecuadas para la extensión pueden comprender  $Mg^{++}$ . Las condiciones adecuadas para la extensión pueden comprender  $Mn^{++}$ .

La presente invención también proporciona un kit útil en dicho procedimiento de extensión de polinucleótidos. El kit incluye al menos un recipiente que proporciona la ADN polimerasa mejorada de acuerdo con la invención. En determinados modos de realización, el kit incluye además uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, en variaciones específicas, el uno o más recipientes adicionales proporcionan nucleósidos trifosfato; un tampón adecuado para la extensión de polinucleótidos; y/o uno o más polinucleótidos de sonda o cebador, hibridables, en condiciones de extensión de polinucleótidos, a un molde de polinucleótido predeterminado. El molde de polinucleótido puede ser de cualquier tipo de muestra biológica.

Se proporcionan además mezclas de reacción que comprenden las polimerasas de la invención. Las mezclas de reacción también pueden contener un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos de sonda o cebador, nucleósidos trifosfato (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleósidos trifosfato, ribonucleósidos trifosfato, nucleósidos trifosfato marcados, nucleósidos trifosfato no convencionales), tampones, sales, marcadores (por ejemplo, fluoróforos). Las mezclas de reacción pueden comprender un quelante de hierro o un tinte púrpura. Las mezclas de reacción pueden comprender hemoglobina o un producto de degradación de hemoglobina. Por ejemplo, los productos de degradación de hemoglobina pueden incluir productos de descomposición de hemo, tales como hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. Las mezclas de reacción pueden comprender heparina o una sal de la misma.

Opcionalmente, la mezcla de reacción puede comprender un tinte intercalante (incluyendo, pero no limitado a los descritos anteriormente o en otra parte en el presente documento). La mezcla de reacción puede contener un ácido nucleico molde que se aísla de la sangre. El ácido nucleico molde puede ser ARN y la mezcla de reacción puede comprender heparina o una sal de la misma. La mezcla de reacción puede comprender además  $Mg^{2+}$ .

La mezcla de reacción puede comprender además una segunda ADN polimerasa termoestable. La mezcla de reacción puede comprender dos o más polimerasas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede comprender una ADN polimerasa mejorada que tenga eficacia de transcripción inversa incrementada (por ejemplo, actividad incrementada de extensión de un molde de ARN) como se describe en el presente documento, y otra polimerasa que tenga actividad polimerasa dependiente de ADN. La mezcla de reacción puede comprender una combinación de una ADN polimerasa mejorada que tenga eficacia de transcripción inversa incrementada como se describe en el presente documento y una segunda polimerasa dependiente de ADN termoestable. La segunda polimerasa dependiente de ADN termoestable puede ser una polimerasa modificada reversiblemente como se describe anteriormente, de tal manera que la enzima sea inactiva a temperaturas adecuadas para la etapa de transcripción inversa, pero se active en condiciones adecuadas, por ejemplo, a temperaturas elevadas de aproximadamente 90 °C a 100 °C durante un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 12 minutos. Las condiciones adecuadas para la activación de una polimerasa termoestable inactivada reversiblemente se proporcionan, por ejemplo, en una reacción de PCR de inicio en caliente, como se describe en los ejemplos. Ejemplos de segundas polimerasas dependientes de ADN termoestables adecuadas se describen en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.773.258 y 5.677.152, *supra*.

## Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede usar esencialmente cualquier procedimiento y material similar a los descritos en el presente documento, en la práctica o pruebas de la presente invención, únicamente se describen procedimientos y materiales ejemplares. Para los propósitos de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Los términos "un", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

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

Como ilustración adicional, un aminoácido es típicamente un ácido orgánico que incluye un grupo amino sustituido o no sustituido, un grupo carboxi sustituido o no sustituido y una o más cadenas laterales o grupos, o análogos de cualquiera de estos grupos. Las cadenas laterales ejemplares incluyen, por ejemplo, tiol, seleno, sulfonilo, alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidracina, ciano, halo, hidracida, alquenilo, alquinilo, éter, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterociclo, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina o cualquier combinación de estos grupos. Otros aminoácidos representativos incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos que comprenden reticuladores fotoactivables, aminoácidos de unión a metal, aminoácidos con marcaje de espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que contienen metal, aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interactúan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoenmascarados y/o

fotoisomerizables, aminoácidos radiactivos, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, aminoácidos modificados con otros hidratos de carbono, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos que contienen un azúcar unido por enlace a carbono, aminoácidos activos en oxidorreducción, aminoácidos que contienen aminotioácidos y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidos de un organismo y que se pueden usar en un ensayo de supervisión o diagnóstico. El término abarca orina, sedimento de orina, sangre, saliva y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como una muestra de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos y la descendencia de los mismos. El término abarca muestras que se hayan manipulado de cualquier manera después de su adquisición, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, sedimentación o enriquecimiento para determinados componentes. El término abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, líquidos biológicos y muestras de tejidos.

El término "mutante", en el contexto de las ADN polimerasas de la presente invención, significa un polipéptido, típicamente recombinante, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en relación con una ADN polimerasa funcional correspondiente.

El término "forma no modificada", en el contexto de una polimerasa mutante, es un término usado en el presente documento para los propósitos de definir una ADN polimerasa mutante de la presente invención: el término "forma no modificada" se refiere a una ADN polimerasa funcional que tiene la secuencia de aminoácidos de la polimerasa mutante, excepto en una o más posiciones de aminoácidos especificadas que caracterizan la polimerasa mutante. Por lo tanto, la referencia a una ADN polimerasa mutante en términos de (a) su forma no modificada y (b) una o más sustituciones de aminoácidos especificadas significa que, con excepción de las sustituciones de aminoácidos especificadas, la polimerasa mutante tiene por lo demás una secuencia de aminoácidos idéntica a la forma no modificada en el motivo especificado. La "polimerasa no modificada" (y, por lo tanto, también la forma modificada que tiene incremento de la eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT) puede contener mutaciones adicionales para proporcionar la funcionalidad deseada, por ejemplo, incorporación mejorada de didesoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, análogos de ribonucleótidos, nucleótidos marcados con tinte, actividad 5'-nucleasa moduladora, actividad 3'-nucleasa moduladora (o corrección de errores) o similares. En consecuencia, al llevar a cabo la presente invención como se describe en el presente documento, se predetermina la forma no modificada de una ADN polimerasa. La forma no modificada de una ADN polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa natural o una ADN polimerasa que ya se ha modificado intencionalmente. Una forma no modificada de la polimerasa es preferentemente una ADN polimerasa termoestable, tal como ADN polimerasas de diversas bacterias termófilas, así como variantes funcionales de las mismas que tienen identidad de secuencia sustancial con respecto a una polimerasa termoestable natural. Dichas variantes pueden incluir, por ejemplo, ADN polimerasas quiméricas, tales como, por ejemplo, las ADN polimerasas quiméricas descritas en las patentes de EE. UU. n.ºs 6.228.628 y 7.148.049. En determinados modos de realización, la forma no modificada de una polimerasa tiene actividad transcriptasa inversa (RT).

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y retiene suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de polinucleótidos posteriores y no se desnaturaliza (inactiva) irreversiblemente cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y se ejemplifican, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202, 4.683.195 y 4.965.188. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La desnaturalización irreversible para los propósitos del presente documento se refiere a la pérdida permanente y completa de actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de manera apropiada para formar productos de extensión de polinucleótidos que sean complementarios a una hebra de ácido nucleico molde. Las ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, especie sps17 de *Thermus*, especie Z05 de *Thermus*, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosiphon africanus*.

El término "termoactiva" se refiere a una enzima que mantiene las propiedades catalíticas a las temperaturas usadas comúnmente para la transcripción inversa o etapas de hibridación/extensión en reacciones de RT-PCR y/o PCR (es decir, 45-80 °C). Las enzimas termoestables son las que no se inactivan o desnaturalizan irreversiblemente cuando se someten a las elevadas temperaturas necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos. Las enzimas termoactivas pueden ser o no termoestables. Las ADN polimerasas termoactivas pueden ser dependientes de ADN o ARN de especies termófilas o de especies mesófilas incluyendo, pero no limitadas a, *Escherichia coli*, los virus de la leucemia murina de Moloney y los virus de la mieloblastosis aviar.

Como se usa en el presente documento, una proteína "quimérica" se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos representa un producto de fusión de subsecuencias de las secuencias de aminoácidos de al menos dos



proteínas distintas. Una proteína quimérica no se produce típicamente mediante manipulación directa de secuencias de aminoácidos, sino que, más bien, se expresa a partir de un gen "quimérico" que codifica la secuencia de aminoácidos quimérica. Por ejemplo, una forma no modificada de una ADN polimerasa mutante como se divulga en el presente documento es una proteína quimérica que consiste en una región de extremo aminico (extremo N) derivada de una ADN polimerasa de una especie *Thermus* y una región de extremo carboxílico (extremo C) derivada de ADN polimerasa de Tma. La región de extremo N se refiere a una región que se extiende desde el extremo N (posición de aminoácido 1) hacia un aminoácido interno. De manera similar, la región de extremo C se refiere a una región que se extiende desde un aminoácido interno hacia el extremo C.

El término "aptámero" se refiere a un ADN monocatenario que reconoce y se une a ADN polimerasa e inhibe eficazmente la actividad polimerasa como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.693.502. El uso de aptámero y dUTP/UNG en RT-PCR también se analiza, por ejemplo, en Smith, E.S. *et al.*, (Amplification of RNA: High-temperature Reverse Transcription and ADN Amplification with a Magnesium-activated Thermostable ADN Polymerase, en PCR Primer: A Laboratory Manual, 2.ª edición, Dieffenbach, C.W. y Dveksler, G.S., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 211-219, (2003)).

En el contexto de las ADN polimerasas mutantes, la "correspondencia" con otra secuencia (por ejemplo, regiones, fragmentos, posiciones de aminoácidos o nucleótidos, o similares) se basa en la convención de numeración de acuerdo con el número de posición de aminoácidos o nucleótidos y, a continuación, en la alineación de las secuencias de una manera que maximice el porcentaje de identidad de secuencia. Un aminoácido "correspondiente a la posición [X] de [secuencia específica]" se refiere a un aminoácido en un polipéptido de interés que se alinea con el aminoácido equivalente de una secuencia especificada. En general, como se describe en el presente documento, el aminoácido correspondiente a una posición de una polimerasa se puede determinar usando un algoritmo de alineación, tal como BLAST, como se describe a continuación. Puesto que no todas las posiciones en una "región correspondiente" dada necesitan ser idénticas, las posiciones de no emparejamiento de una región correspondiente se pueden considerar como "posiciones correspondientes". En consecuencia, como se usa en el presente documento, la referencia a una "posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido [X]" de una ADN polimerasa especificada se refiere a posiciones equivalentes, basadas en la alineación, en otras ADN polimerasas y familias y homólogos estructurales. En algunos modos de realización de la presente invención, la "correspondencia" de las posiciones de aminoácidos se determina con respecto a una región de la polimerasa que comprende uno o más motivos de la SEQ ID NO: 1. Cuando una secuencia de polipéptidos de polimerasa difiere de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, por cambios en aminoácidos o adición o eliminación de aminoácidos), puede ser que una mutación particular asociada con la actividad mejorada como se analiza en el presente documento no esté en la misma posición que en la SEQ ID NO: 1. Esto se ilustra, por ejemplo, en la tabla 1.

"Recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se ha modificado intencionadamente mediante procedimientos recombinantes. El término "ácido nucleico recombinante" en el presente documento significa un ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general, mediante la manipulación de un ácido nucleico por endonucleasas de restricción, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por lo tanto, un ácido nucleico de ADN polimerasa mutante aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que no están unidas normalmente se consideran ambos recombinantes para los propósitos de la presente invención. Se entiende que, una vez que se prepara un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula huésped, se replica de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de las manipulaciones *in vitro*; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque se replican de manera no recombinante posteriormente, todavía se consideran recombinantes para los propósitos de la invención. Una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

Un ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si está ubicado para facilitar la traducción.

El término "célula huésped" se refiere tanto a organismos procariotas y eucariotas unicelulares (por ejemplo, bacterias, levaduras y actinomicetos) como a células sueltas de animales o plantas de orden superior cuando se cultivan en cultivo celular.

El término "vector" se refiere a una porción de ADN, típicamente bicatenario, que puede tener insertada en la misma una porción de ADN exógeno. El vector puede ser, por ejemplo, de origen plasmídico. Los vectores contienen secuencias de polinucleótidos de "replicón" que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula huésped. El ADN exógeno se define como ADN heterógeno, que es ADN no encontrado de forma natural en la célula huésped, que, por ejemplo, replica la molécula del vector, codifica un marcador seleccionable o cribable, o codifica un transgén. El vector se usa para transportar el ADN exógeno o heterógeno a una célula huésped adecuada. Una vez en la célula huésped, el vector se puede replicar independientemente o coincidiendo con el ADN cromosómico del huésped y se pueden generar varias copias del vector y de su ADN insertado. Además, el vector también puede contener los

elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado en una molécula de ARNm o provocar de otro modo la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión contienen adicionalmente elementos de secuencia adyacentes al ADN insertado que incrementan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula de proteína. Por lo tanto, se pueden sintetizar rápidamente muchas moléculas de ARNm y polipéptido codificadas por el ADN insertado.

El término "nucleótido", además de hacer referencia a los monómeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido naturales, en el presente documento se entenderá que se refiere a variantes estructurales relacionadas del mismo, incluyendo derivados y análogos, que son funcionalmente equivalentes con respecto al contexto particular en el que se usa el nucleótido (por ejemplo, hibridación a una base complementaria), a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que se puede corresponder con un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo del mismo. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo, modificadas química o bioquímicamente) de los mismos y polímeros mixtos (por ejemplo, que incluyen tanto subunidades de ADN como de ARN). Las modificaciones ejemplares incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, soraleno y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada por medio de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros de nucleótidos están unidos a través de enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de los ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describe en Nielsen *et al.* (*Science* 254: 1497-1500, 1991). Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser o puede incluir un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ARN o ADN no marcado, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario, bicatenario o tricatenario y no está limitado a ninguna longitud particular. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos). Un oligonucleótido incluye típicamente desde aproximadamente seis a aproximadamente 175 unidades monoméricas de ácido nucleico, más típicamente desde aproximadamente ocho a aproximadamente 100 unidades monoméricas de ácido nucleico, y todavía más típicamente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o más unidades monoméricas de ácido nucleico). El tamaño exacto de un oligonucleótido depende de muchos factores, incluyendo el uso o función final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, pero no limitado a, aislamiento de una secuencia existente o natural, replicación o amplificación del ADN, transcripción inversa, clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa mediante un procedimiento tal como el procedimiento de fosfotriéster de Narang *et al.* (*Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979); el procedimiento de fosfodiéster de Brown *et al.* (*Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979); el procedimiento de dietilfosforamida de Beaucage *et al.* (*Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862, 1981); el procedimiento de triéster de Matteucci *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191, 1981); procedimientos de síntesis automatizados; o el procedimiento en soporte sólido de la patente de EE. UU. n.º 4.458.066 u otros procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

El término "cebador", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos dirigida por molde cuando se dispone en condiciones en las que se inicia la extensión de polinucleótidos (por ejemplo, en condiciones que comprenden la presencia de nucleósidos trifosfato requeridos (según dicta el molde que se copia) y una polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura o uno o más ciclos de temperatura adecuados (por ejemplo, como en una reacción en cadena de la polimerasa)). Como ilustración adicional, también se pueden usar los cebadores en una variedad de otros procedimientos de síntesis mediados por oligonucleótidos, incluyendo como iniciadores de la síntesis de ARN *de novo* y procedimientos relacionados con la transcripción *in vitro* (por ejemplo, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), etc.). Un cebador es típicamente un oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, oligodesoxirribonucleótido). La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero típicamente varía desde 6 a 40 nucleótidos, más típicamente desde 15 a 35 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas requieren, en general, temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero esta debe ser suficientemente complementaria para hibridarse con un molde y que se produzca la elongación del cebador. El término "par de cebadores" puede significar un conjunto de cebadores que incluye un cebador codificante 5' (a veces llamado "directo") que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar y un cebador no codificante 3' (a veces llamado "inverso") que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia

que se va a amplificar (por ejemplo, si la secuencia diana se expresa como ARN o es un ARN). Un cebador se puede marcar, si se desea, incorporando un marcador detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen <sup>32</sup>P, tintes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (usadas comúnmente en ensayos ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que hay antisueros o anticuerpos monoclonales disponibles.

El término "convencional" o "natural", cuando hace referencia a bases de ácidos nucleicos, nucleósidos trifosfato o nucleótidos, se refiere a los que se producen de forma natural en el polinucleótido que se describe (es decir, para el ADN estos son dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Adicionalmente, con frecuencia se utilizan dITP y 7-desaza-dGTP en lugar de dGTP y se puede utilizar 7-desaza-dATP en lugar de dATP en reacciones de síntesis de ADN *in vitro*, tales como secuenciación. Colectivamente, estos se pueden denominar dNTP.

El término "no convencional" o "modificado", cuando se refiere a una base de ácido nucleico, nucleósido o nucleótido, incluye modificación, derivaciones o análogos de bases, nucleósidos o nucleótidos convencionales que se producen de forma natural en un polinucleótido particular. Determinados nucleótidos no convencionales están modificados en la posición 2' del azúcar ribosa en comparación con los dNTP convencionales. Por lo tanto, aunque para el ARN los nucleótidos naturales son ribonucleótidos (es decir, ATP, GTP, CTP, UTP, colectivamente rNTP), puesto que estos nucleótidos tienen un grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar que, en comparación, está ausente en los dNTP, como se usa en el presente documento, los ribonucleótidos son nucleótidos no convencionales como sustratos para las ADN polimerasas. Como se usa en el presente documento, los nucleótidos no convencionales incluyen, pero no están limitados a, compuestos usados como terminadores para la secuenciación de ácidos nucleicos. Los compuestos terminadores ejemplares incluyen, pero no están limitados a, los compuestos que tienen una estructura 2',3'-didesoxi y se denominan didesoxinucleósidos trifosfato. Los didesoxinucleósidos trifosfato ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP se denominan colectivamente ddNTP. Ejemplos adicionales de compuestos terminadores incluyen análogos 2'-PO<sub>4</sub> de ribonucleótidos (véanse, por ejemplo, las solicitudes de EE. UU. n.ºs 2005/0037991 y 2005/0037398). Otros nucleótidos no convencionales incluyen fosforotioato dNTP ([α-S]dNTP), 5'-[α-borano]-dNTP, [α]-metilfosfonato dNTP y ribonucleósidos trifosfato (rNTP). Las bases no convencionales se pueden marcar con isótopos radiactivos, tales como <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P o <sup>35</sup>S; marcadores fluorescentes; marcadores quimioluminiscentes; marcadores bioluminiscentes; marcadores con hapteno tales como biotina; o marcadores enzimáticos tales como estreptavidina o avidina. Los marcadores fluorescentes pueden incluir tintes que están cargados negativamente, tales como tintes de la familia de la fluoresceína, o tintes que tienen carga neutra, tales como tintes de la familia de la rodamina, o tintes que están cargados positivamente, tales como tintes de la familia de la cianina. Los tintes de la familia de la fluoresceína incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los tintes de la familia de la rodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G y TAMRA. Diversos tintes o nucleótidos marcados con FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, Texas Red y TAMRA los comercializa Perkin-Elmer (Boston, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA) o Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). Los tintes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 y los comercializa GE Healthcare UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia de la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido o la base de ácido nucleico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones existentes en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o "identidad" en porcentaje en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad con respecto a una región especificada), cuando se compara y alinea para obtener la correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si son al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o al menos un 55 % idénticas. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia de prueba. Opcionalmente, la identidad existe en una región que es de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, o más típicamente en una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud.

Los términos "similitud" o "similitud en porcentaje", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales o bien similares como se define por una sustitución de aminoácidos conservadora (por ejemplo, un 60 % de similitud, opcionalmente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % similar en una región determinada) cuando se comparan y alinean para obtener la correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada

medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí si son al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o al menos un 55 % similares entre sí. Opcionalmente, esto existe de manera similar en una región que es de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o más típicamente en una región que es de al menos aproximadamente 100 a 500 o 1000 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Comúnmente se usan parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula las similitudes o identidades de secuencia en porcentaje para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionado del grupo que consiste en desde 20 a 600, habitualmente desde aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente desde aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen óptimamente. Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1970), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Ejemplos de un algoritmo que sea adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (*Nuc. Acids Res.* 25:3389-402, 1977) y Altschul *et al.* (*J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990), respectivamente. El programa informático para realizar análisis por BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud  $W$  en la secuencia de consulta que coincidan o bien satisfagan alguna puntuación umbral de valor positivo  $T$  cuando están alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos.  $T$  se refiere al umbral de puntuación de palabras de vecindad (Altschul *et al.*, *supra*). Estos resultados iniciales de palabras de vecindad actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que los contienen. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia mientras se pueda incrementar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros  $M$  (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados, siempre  $> 0$ ) y  $N$  (puntuación de penalización para los residuos de emparejamiento erróneo, siempre  $< 0$ ). Para secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa se reduce en la cantidad  $X$  con respecto a su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa se desplaza a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST  $W$ ,  $T$  y  $X$  determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores predeterminados una longitud de palabra ( $W$ ) de 11, una expectativa ( $E$ ) de 10,  $M = 5$ ,  $N = -4$  y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores predeterminados una longitud de palabra de 3, una expectativa ( $E$ ) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915, 1989) usa alineaciones ( $B$ ) de 50, una expectativa ( $E$ ) de 10,  $M = 5$ ,  $N = -4$  y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-87, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $P(N)$ ), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría por casualidad un emparejamiento entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto al ácido nucleico de referencia es menos de aproximadamente 0,2, típicamente menos de aproximadamente 0,01 y más típicamente menos de aproximadamente 0,001.

El término "eficacia de transcripción inversa" se refiere a la fracción de moléculas de ARN que se transcriben de manera inversa como ADNc en una reacción de transcripción inversa dada. En determinados modos de realización, las ADN polimerasas mutantes de la invención tienen eficacias de transcripción inversa mejoradas en relación con las formas no modificadas de estas ADN polimerasas. Es decir, estas ADN polimerasas mutantes transcriben de manera

inversa una fracción más alta de moldes de ARN que sus formas no modificadas en un conjunto particular de condiciones de reacción. Sin estar limitada por la teoría, la capacidad de una ADN polimerasa mutante descrita en el presente documento para transcribir de manera inversa una fracción más alta de moldes de ARN se puede deber a una actividad de transcripción inversa incrementada, por ejemplo, una velocidad de incorporación de nucleótidos incrementada y/o una procesividad incrementada de la enzima. La eficacia de transcripción inversa se puede medir, por ejemplo, midiendo el punto de corte (Pc) de una reacción de PCR usando un molde de ARN y comparando el valor de Pc con un valor de Pc de una reacción de control en la que se amplifica un molde de ADN de la misma secuencia (excepto que las U se reemplazan por T), en la que las amplificaciones de ARN y ADN usan un conjunto de cebadores común y la misma polimerasa, por ejemplo, como se describe en los ejemplos. Una polimerasa de prueba tiene eficacia de RT mejorada cuando la polimerasa de prueba tiene un valor de Pc disminuido en comparación con una polimerasa de control cuando se usa ARN como molde, pero tiene un valor de Pc sustancialmente sin cambios en relación con la polimerasa de control cuando se usa ADN como molde. En algunos modos de realización, una polimerasa de la invención tiene una eficacia de RT mejorada, de tal manera que el Pc es al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más unidades menos que la polimerasa de control correspondiente en el molde de ARN. La eficacia de RT mejorada de una polimerasa de prueba se puede medir como se describe en los ejemplos.

El término "tolerancia al emparejamiento erróneo" se refiere a la capacidad de una polimerasa para tolerar una secuencia que contiene emparejamiento erróneo al extender un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente de molde acoplado (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico. El término "tolerancia al emparejamiento erróneo en 3'" se refiere a la capacidad de una polimerasa para tolerar una secuencia (prácticamente complementaria) que contiene emparejamiento erróneo en la que el ácido nucleico que se va a extender (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) tiene un emparejamiento erróneo con su molde en el nucleótido de extremo 3' del cebador. Los emparejamientos erróneos con respecto al molde también se pueden localizar en el penúltimo nucleótido en 3' del cebador, o en otra posición de la secuencia del cebador.

La expresión "discriminación por emparejamiento erróneo" se refiere a la capacidad de una polimerasa para distinguir una secuencia completamente complementaria de una secuencia que contiene emparejamiento erróneo al extender un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente de molde acoplado (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico. El término "discriminación por emparejamiento erróneo en 3'" se refiere a la capacidad de una polimerasa para distinguir una secuencia completamente complementaria de una secuencia (prácticamente complementaria) que contiene emparejamiento erróneo en la que el ácido nucleico que se va a extender (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) tiene un emparejamiento erróneo en el extremo 3' del ácido nucleico en comparación con el molde al que se hibrida el ácido nucleico. El término "emparejamiento erróneo" se refiere a la existencia de uno o más apareamientos erróneos de bases (u "oposiciones de bases no complementarias") en un tramo de secuencias formadoras de dúplex (o potencialmente formadoras de dúplex) por lo demás complementarias.

El término "valor de Pc" o valor de "punto de corte" se refiere a un valor que permite la cuantificación de ácidos nucleicos diana de entrada. El valor de Pc se puede determinar de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada (Van Luu-The *et al.*, "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction", *BioTechniques*, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, págs. 287-293). En el procedimiento de la segunda derivada, un Pc corresponde al primer pico de una curva de segunda derivada. Este pico corresponde al comienzo de una fase semilogarítmica. El procedimiento de la segunda derivada calcula un valor de segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia en tiempo real, y únicamente se obtiene un valor. El procedimiento de Pc original se basa en una aproximación diferenciable definida localmente de los valores de intensidad, por ejemplo, mediante una función polinómica. A continuación, se computa la tercera derivada. El valor de Pc es la raíz más pequeña de la tercera derivada. El Pc también se puede determinar usando el procedimiento de punto de ajuste, en el que el Pc se determina mediante la intersección de una paralela a la línea umbral en la región semilogarítmica (Van Luu-The *et al.*, *BioTechniques*, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, págs. 287-293). El valor de Pc proporcionado por el instrumento LightCycler ofrecido por Roche se obtiene mediante cálculo de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada.

El término "eficacia de la PCR" se refiere a una indicación de la eficacia de amplificación de ciclo a ciclo. La eficacia de la PCR se calcula para cada condición usando la ecuación: % de eficacia de la PCR =  $(10^{(-\text{pendiente})} - 1) \times 100$ , en la que la pendiente se calculó mediante regresión lineal con el logaritmo del número de copias representado en el eje de ordenadas y el Pc representado en el eje de abscisas. La eficacia de la PCR se puede medir usando un molde de cebador perfectamente emparejado o emparejado erróneamente.

El término "velocidad de extensión de ácido nucleico" se refiere a la velocidad en la que un biocatalizador (por ejemplo, una enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similar) extiende un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente de molde o independiente de molde acoplado (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico. Como ilustración, determinadas ADN polimerasas mutantes descritas en el presente documento tienen velocidades de extensión de ácido nucleico mejoradas en relación con formas no modificadas de dichas ADN polimerasas, de tal manera que pueden extender cebadores a velocidades más altas que estas formas no modificadas en un conjunto dado de condiciones de reacción.

El término "tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT" se refiere a la capacidad de una polimerasa para mantener la actividad (actividad polimerasa o de transcripción inversa) en presencia de una cantidad de un inhibidor que inhibiría la actividad polimerasa o actividad de transcripción inversa de una polimerasa de control. En algunos modos de realización, la polimerasa mejorada puede tener actividad polimerasa o de transcripción inversa en presencia de una cantidad del inhibidor que eliminaría esencialmente la actividad polimerasa de control.

El término "sonda de 5'-nucleasa" se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un resto de marcaje emisor de luz y que se usa en una reacción de 5'-nucleasa para lograr la detección de ácidos nucleicos diana. En algunos modos de realización, por ejemplo, una sonda de 5'-nucleasa incluye solamente un único resto emisor de luz (por ejemplo, un tinte fluorescente, etc.). En determinados modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa incluyen regiones de autocomplementariedad, de tal manera que las sondas pueden formar estructuras de horquilla en condiciones seleccionadas. Como ilustración adicional, en algunos modos de realización una sonda de 5'-nucleasa comprende al menos dos restos de marcaje y emite radiación de intensidad incrementada después de que uno de los dos marcadores se escinda o se separe de otro modo del oligonucleótido. En determinados modos de realización, una sonda de 5'-nucleasa se marca con dos tintes fluorescentes diferentes, por ejemplo, un tinte indicador de extremo 5' y el resto o tinte extintor de extremo 3'. En algunos modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa se marcan en una o más posiciones distintas de, o además de, las posiciones de extremo. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce típicamente entre los dos fluoróforos, de tal manera que la emisión fluorescente del tinte indicador se extingue al menos en parte. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, una sonda de 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico molde se escinde por la actividad de nucleasa de 5' a 3' de, por ejemplo, una Taq polimerasa u otra polimerasa que tenga esta actividad, de tal manera que la emisión fluorescente del tinte indicador ya no se extingue. Sondas de 5'-nucleasa ejemplares también se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.210.015, la patente de EE. UU. n.º 5.994.056 y la patente de EE. UU. n.º 6.171.785. En otros modos de realización, una sonda de 5'-nucleasa se puede marcar con dos o más tintes indicadores diferentes y un resto o tinte extintor de extremo 3'.

El término "FRET" o "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" o "transferencia de energía por resonancia de Förster" se refiere a una transferencia de energía entre al menos dos cromóforos, un cromóforo donador y un cromóforo aceptador (denominado extintor). El donador transfiere típicamente la energía al aceptador cuando se excita el donador mediante radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptador reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente. Cuando el aceptador es un extintor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Que un fluoróforo particular actúe como un donador o como un aceptador depende de las propiedades del otro miembro del par de FRET. Los pares donador-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated ADN Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** representa una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del dominio de polimerasa de ADN polimerasas ejemplares de diversas especies de bacterias: especie Z05 de *Thermus* (Z05) (SEQ ID NO: 12), *Thermus aquaticus* (Taq) (SEQ ID NO: 13), *Thermus filiformis* (Tfi) (SEQ ID NO: 14), *Thermus flavus* (Tfl) (SEQ ID NO: 15), especie sps17 de *Thermus* (Sps17) (SEQ ID NO: 16), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEQ ID NO: 17), *Thermus caldophilus* (Tca) (SEQ ID NO: 18), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEQ ID NO: 19), *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEQ ID NO: 20), *Thermosiphon africanus* (Taf) (SEQ ID NO: 21), *Deinococcus radiodurans* (Dra) (SEQ ID NO: 23), *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (SEQ ID NO: 24) y *Bacillus caldotenax* (Bca) (SEQ ID NO: 25). Además, las regiones polipeptídicas mostradas comprenden el motivo aminoacídico X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-D-Y-S-Q-X<sub>5</sub>-E-L-R-X<sub>6</sub>-L-A-H-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-D (SEQ ID NO: 26), cuyas posiciones variables se definen adicionalmente en el presente documento. Este motivo está resaltado en negrita para cada secuencia de polimerasa. Las posiciones de aminoácidos susceptibles de mutación se indican con un asterisco (\*). Los huecos en las alineaciones se indican con un punto (.)

La **figura 2** proporciona identidades de secuencia entre las siguientes enzimas ADN polimerasa I: ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi); ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl); ADN polimerasa de *Thermus sp. sps17* (Sps17); ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth); ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca); ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra); ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma); ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne); ADN polimerasa de *Thermosiphon africanus* (Taf); ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst); y ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca). **(A)** Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05); y **(B)** identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05.

La **figura 3** proporciona identidades de secuencia entre diversas enzimas ADN polimerasa I de la especie *Thermus*: ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi); ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl); ADN polimerasa de *Thermus sp. sps17* (Sps17); ADN

polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth); y ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca). **(A)** Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05); y **(B)** identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05.

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona ADN polimerasas mejoradas en las que se han mutado uno o más aminoácidos del dominio de polimerasa en relación con una ADN polimerasa funcional. Las ADN polimerasas de la invención son enzimas activas que tienen eficacia de transcriptasa inversa incrementada (por ejemplo, en presencia de cationes divalentes de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) en relación con la forma no modificada de la polimerasa. También pueden tener incrementadas la tolerancia al emparejamiento erróneo, la velocidad de extensión y la tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT. Las ADN polimerasas mutantes se pueden usar en concentraciones más bajas para un rendimiento superior o equivalente al de las enzimas precursoras. Las ADN polimerasas mutantes pueden tener eficacia de transcriptasa inversa incrementada mientras que retienen sustancialmente la misma actividad polimerasa dependiente de ADN en relación con una polimerasa no modificada o de control. La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Las ADN polimerasas que realizan más eficazmente la transcripción inversa son útiles, por ejemplo, en una variedad de aplicaciones que implican ensayos que emplean RT-PCR para detectar y/o cuantificar dianas de ARN. Por lo tanto, las ADN polimerasas son útiles en una variedad de aplicaciones que implican la extensión de polinucleótidos, así como la transcripción inversa o amplificación de moldes de polinucleótido, que incluyen, por ejemplo, aplicaciones en estudios de ADN recombinante y en el diagnóstico médico de enfermedades. Las ADN polimerasas mutantes también son particularmente útiles, debido a su tolerancia a los emparejamientos erróneos, para detectar dianas que posiblemente tienen secuencias variables (por ejemplo, dianas víricas o marcadores genéticos de cáncer y otras enfermedades).

En el presente documento se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

$X_1-X_2-X_3-X_4$ -Asp-Tyr-Ser-Gln- $X_5$ -Glu-Leu-Arg- $X_6$ -Leu-Ala-His- $X_7-X_8-X_9$ -Asp (también denominado en el presente documento en el código de una letra como  $X_1-X_2-X_3-X_4$ -D-Y-S-Q- $X_5$ -E-L-R- $X_6$ -L-A-H- $X_7-X_8-X_9$ -D) (SEQ ID NO: 8); en el que:

$X_1$  es Leu (L) o Ile (I);

$X_2$  es Val (V), Leu (L), Ile (I) o Phe (F);

$X_3$  es Ala (A), Val (V), Ser (S) o Gly (G);

$X_4$  es Leu (L) o Ala (A);

$X_5$  es cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Lys (K), Asn (N), Gln (Q) y Thr (T);

$X_6$  es Val (V), Ile (I) o Leu (L);

$X_7$  es Leu (L), Val (V) o Ile (I);

$X_8$  es Ser (S) o Ala (A);

$X_9$  es Gly (G), Lys (K), Asp (D) o Glu (E).

En el presente documento,  $X_5$  se puede seleccionar de G, A, W, P, S, F, Y, C, D, E, V, R, L, M o H.

También se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

Leu-Val- $X_3$ -Leu-Asp-Tyr-Ser-Gln- $X_5$ -Glu-Leu-Arg-Val-Leu-Ala-His-Leu-Ser-Gly-Asp (también denominado en el presente documento en el código de una letra como L-V- $X_3$ -L-D-Y-S-Q- $X_5$ -E-L-R-V-L-A-H-L-S-G-D) (SEQ ID NO: 9); en el que:

$X_3$  es Ala (A) o Val (V); y

$X_5$  es cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Lys (K), Asn (N), Gln (Q) y Thr (T).

También se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

Leu-Val-Ala-Leu-Asp-Tyr-Ser-Gln- $X_5$ -Glu-Leu-Arg-Val-Leu-Ala-His-Leu-Ser-Gly-Asp (también denominado en el presente documento en el código de una letra como L-V-A-L-D-Y-S-Q- $X_5$ -E-L-R-V-L-

A-H-L-S-G-D) (SEQ ID NO: 10); en el que:

X<sub>5</sub> es cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Lys (K); Asn (N), Gln (Q) y Thr (T).

5 También se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

Leu-Val-Ala-Leu-Asp-Tyr-Ser-Gln-X<sub>5</sub>-Glu-Leu-Arg-Val-Leu-Ala-His-Leu-Ser-Gly-Asp (también  
denominado en el presente documento en el código de una letra como L-V-A-L-D-Y-S-Q-X<sub>5</sub>-E-L-R-V-L-  
A-H-L-S-G-D) (SEQ ID NO: 11); en el que:

10

X<sub>5</sub> es Met (M).

El aminoácido en la posición X<sub>3</sub> de la SEQ ID NO: 8 o 9 puede no ser Val (V). El aminoácido en la posición X<sub>3</sub> de la  
SEQ ID NO: 8 o 9 puede no ser Asp (D). El aminoácido en la posición X<sub>3</sub> de la SEQ ID NO: 8 o 9 puede ser Ala (A).

15

También se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener los motivos anteriores (por ejemplo, las  
SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11), opcionalmente en combinación con motivos adicionales descritos a continuación. Por  
ejemplo, la ADN polimerasa comprende además el motivo de la SEQ ID NO: 29 y/o la SEQ ID NO: 38.

20

Este motivo está presente en el dominio de los "dedos" (hélice alfa L) de muchas ADN polimerasas dependientes de  
ADN de tipo de la familia A, particularmente ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas (Li *et al.*, *EMBO*  
*J.* 17:7514-7525, 1998). Por ejemplo, la figura 1 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de una región  
del dominio de los "dedos" de las ADN polimerasas de diversas especies de bacterias: *Bacillus caldotenax*, *Bacillus*  
*stearothermophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermosiphon africanus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga*  
*neopolitana*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus sp. sps17*,  
25 *Thermus sp. Z05* y *Thermus thermophilus*. Como se muestra, la secuencia natural correspondiente al motivo anterior  
está presente en cada una de estas polimerasas, indicando una función conservada de esta región de la polimerasa.  
La figura 2 proporciona identidades de secuencia entre estas ADN polimerasas.

30

En consecuencia, la divulgación proporciona una polimerasa que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10 u 11, que tiene  
actividad y/o características mejoradas descritas en el presente documento, y en la que la ADN polimerasa es por lo  
demás una ADN polimerasa natural, tal como, por ejemplo, una polimerasa de cualquiera de las especies de bacterias  
termófilas enumeradas anteriormente o es sustancialmente idéntica a dicha ADN polimerasa natural. Por ejemplo, la  
polimerasa puede comprender la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y es al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a la  
35 SEQ ID NO: 1. En una variación, la forma no modificada de la polimerasa es de una especie del género *Thermus*.  
También se divulga que la polimerasa no modificada es de una especie termófila distinta de *Thermus*, por ejemplo,  
*Thermotoga*. La secuencia de aminoácidos y ácido nucleico completa para numerosas ADN polimerasas  
termoestables está disponible. Las secuencias de cada una de las polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus*  
*thermophilus* (Tth), especie Z05 de *Thermus* (SEQ ID NO: 1), especie *Thermus*, *Thermotoga maritima* (Tma) y  
40 *Thermosiphon africanus* (Taf) se han publicado en la publicación de patente internacional PCT n.º WO 92/06200. En  
particular, el documento WO 92/06200 divulga la secuencia de aminoácidos natural de una ADN polimerasa  
termoestable derivada de la especie Z05 de *Thermus* (SEQ ID NO: 1) de la siguiente manera:



ES 2 668 448 T3

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

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
 290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
 305 310 315 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg  
 325 330 335

Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
 340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp  
 355 360 365

Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
 370 375 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
 385 390 395 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln  
 405 410 415

Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
 420 425 430

Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
 435 440 445

Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu  
 450 455 460

Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
 465 470 475 480

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
 485 490 495  
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
 500 505 510  
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
 515 520 525  
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
 530 535 540  
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
 545 550 555 560  
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
 580 585 590  
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
 595 600 605  
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
 610 615 620  
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
 625 630 635 640  
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
 645 650 655  
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
 660 665 670  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 680 685  
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 695 700  
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 730 735  
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 740 745 750  
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 755 760 765  
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 775 780

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
785 790 795 800

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
805 810 815

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
820 825 830

Lys Gly

5 La secuencia para la ADN polimerasa de *Thermus flavus* se ha publicado en Akhmetzjanov y Vakhitov (*Nucleic Acids Research* 20:5839, 1992). La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus caldophilus* se encuentra en el n.º de acceso a EMBL/GenBank U62584. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* se puede recuperar del n.º 42380 del depósito de ATCC usando, por ejemplo, los procedimientos proporcionados en la patente de EE. UU. n.º 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la tabla 1. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana* es del n.º de acceso a la base de datos de patentes GeneSeq R98144 y el documento PCT WO 97/09451. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Bacillus caldotenax* se describe, por ejemplo, en Uemori *et al.* (*J Biochem (Tokio)* 113 (3):401-410, 1993; véase también el n.º de acceso a la base de datos Swiss-Prot Q04957 y los n.ºs de acceso a GenBank D12982 y BAA02361). Ejemplos de formas no modificadas de ADN polimerasas que se pueden modificar como se describe en el presente documento se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 6.228.628; 6.346.379; 7.030.220; 6.881.559; 6.794.177; 6.468.775 y en las patentes de EE. UU. n.ºs 7.148.049; 7.179.590; 7.410.782; 7.378.262.

15 También son susceptibles de las mutaciones descritas en el presente documento ADN polimerasas funcionales que se han modificado previamente (por ejemplo, mediante sustitución, adición o eliminación de aminoácidos). Dichas polimerasas modificadas funcionales retienen el motivo de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (o un motivo de la SEQ ID NO: 9, 10 u 11) y opcionalmente el motivo de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. Por lo tanto, las ADN polimerasas no modificadas adecuadas también incluyen variantes funcionales de polimerasas naturales. Dichas variantes tienen típicamente una similitud o identidad de secuencia sustancial con respecto a la polimerasa natural, típicamente de al menos un 80 % de identidad de secuencia y más típicamente de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia.

25 Una polimerasa, además de tener un dominio de polimerasa que comprende la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, también puede comprender un dominio de nucleasa (por ejemplo, correspondiente a las posiciones 1 a 291 de Z05).

30 Una polimerasa puede ser una polimerasa quimérica, es decir, que comprende regiones de polipéptidos de dos o más enzimas. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas quiméricas se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.228.628. Son particularmente adecuadas las ADN polimerasas de la familia CS quiméricas, que incluyen las polimerasas CS5 y CS6 y variantes de las mismas que tienen una identidad sustancial de secuencia de aminoácidos (típicamente al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos y más típicamente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos) y, por lo tanto, se pueden modificar para que contengan la SEQ ID NO: 8. Las ADN polimerasas CS5 y CS6 son enzimas quiméricas derivadas de las ADN polimerasas de *Thermus* sp. Z05 y *Thermotoga maritima* (*Tma*). Comprenden el dominio de 5'-nucleasa de extremo N de la enzima de *Thermus* y los dominios de polimerasa y exonucleasa 3'-5' de extremo C de la enzima de *Tma*. Estas enzimas tienen actividad transcriptasa inversa eficaz, pueden extender cebadores que contienen análogos de nucleótidos y pueden incorporar alfa-fosforotioato dNTP, dUTP, dTTP y también dNTP marcados de la familia de los tintes de fluoresceína y cianina. Las polimerasas CS5 y CS6 también son enzimas de PCR activadas por Mg<sup>2+</sup> eficaces. Las polimerasas quiméricas CS5 y CS6 se describen adicionalmente, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.148.049.

45 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos únicos. Las ADN polimerasas proporcionadas en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio activo en relación con la polimerasa no modificada. Las sustituciones de aminoácidos pueden comprender al menos la posición X<sub>5</sub> del motivo expuesto en la SEQ ID NO: 8 (o un motivo de la SEQ ID NO: 9, 10 u 11). La sustitución de aminoácidos en esta posición confiere incremento de la eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT, produciendo una ADN polimerasa mutante con un incremento de la eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT en relación con la polimerasa no modificada. Típicamente, el aminoácido en la posición X<sub>5</sub> está sustituido por un aminoácido que no se corresponde con la secuencia natural en el motivo expuesto en la SEQ ID NO: 8 (o un motivo de la SEQ ID NO: 9, 10 u 11). Por lo tanto, típicamente, el aminoácido en la posición X<sub>5</sub>, si está sustituido, no es Ile (I), ya que la Ile se produce en esta posición en las polimerasas naturales. Véase, por ejemplo, la figura 1. Las sustituciones de aminoácidos incluyen G, A, W, P, S, T, F,

Y, C, N, Q, D, E, K, V, R, L, M o H en la posición X<sub>5</sub>. Las sustituciones de aminoácidos en la posición X<sub>5</sub> no incluyen I, K, N, Q o T. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir metionina (M) en la posición X<sub>5</sub>. Otras sustituciones de aminoácidos adecuadas en uno o más de los sitios identificados se pueden determinar usando, por ejemplo, procedimientos conocidos de mutagénesis dirigida a sitio y determinación del rendimiento de extensión de polinucleótidos en ensayos descritos adicionalmente en el presente documento o conocidos de otro modo por los expertos en la técnica.

La polimerasa divulgada en el presente documento puede comprender la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y puede comprender además uno o más cambios de aminoácidos adicionales (por ejemplo, mediante sustitución, adición o eliminación de aminoácidos) en comparación con una polimerasa natural. Dichas polimerasas retienen el motivo aminoacídico de la SEQ ID NO: 8 (o un motivo de la SEQ ID NO: 9, 10 u 11) y comprenden además el motivo aminoacídico de la SEQ ID NO: 38 (correspondiente a la mutación D580X de Z05 (SEQ ID NO:1)) de la siguiente manera:

Thr-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-Pro-Asn-Leu-Gln-Asn (también denominado en el presente documento en el código de una letra como T-G-R-L-S-S-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-P-N-L-Q-N) (SEQ ID NO: 38); en el que X<sub>7</sub> es Ser (S) o Thr (T); y X<sub>8</sub> es cualquier aminoácido que no sea Asp (D) o Glu (E).

La mutación caracterizada por la SEQ ID NO: 38 se analiza en más detalle, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2009/0148891. Dichas polimerasas variantes funcionales típicamente tendrán una identidad o similitud de secuencia sustancial con la polimerasa natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), típicamente al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos y más típicamente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

También se divulgan polimerasas que comprenden la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y que comprenden además el motivo aminoacídico de la SEQ ID NO: 29 (correspondiente a la mutación I709X de Z05 (SEQ ID NO:1)) de la siguiente manera:

X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-Gly-Tyr-Val-X<sub>14</sub>-Thr-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra como X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-G-Y-V-X<sub>14</sub>-T-L) (SEQ ID NO: 29); en el que:

X<sub>1</sub> es Ala (A), Asp (D), Ser (S), Glu (E), Arg (R) o Gln (Q);

X<sub>2</sub> es Trp (W) o Tyr (Y);

X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Leu (L) o Met (M);

X<sub>4</sub> es Glu (E), Ala (A), Gln (Q), Lys (K), Asn (N) o Asp (D);

X<sub>5</sub> es Lys (K), Gly (G), Arg (R), Gln (Q), His (H) o Asn (N);

X<sub>6</sub> es Thr (T), Val (V), Met (M) o Ile (I);

X<sub>7</sub> es Leu (L), Val (V) o Lys (K);

X<sub>8</sub> es Glu (E), Ser (S), Ala (A), Asp (D) o Gln (Q);

X<sub>9</sub> es Glu (E) o Phe (F);

X<sub>10</sub> es Gly (G) o Ala (A);

X<sub>11</sub> es Arg (R) o Lys (K);

X<sub>12</sub> es Lys (K), Arg (R), Glu (E), Thr (T) o Gln (Q);

X<sub>13</sub> es Arg (R), Lys (K) o His (H); y

X<sub>14</sub> es Glu (E), Arg (R) o Thr (T).

Dichas polimerasas variantes funcionales típicamente tendrán una identidad o similitud de secuencia sustancial con la polimerasa natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), típicamente al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos y más típicamente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

También se divulgan ADN polimerasas que comprenden una sustitución de aminoácidos en la posición X<sub>5</sub> (por

ejemplo, como en un motivo seleccionado de la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11) y que comprenden una sustitución de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 38 y la SEQ ID NO: 29.

5 En el presente documento se puede sustituir el aminoácido en la posición X<sub>5</sub> por un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, y el aminoácido en la posición X<sub>8</sub> (de la SEQ ID NO: 38) se puede sustituir por un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 38. Por lo tanto, el aminoácido en la posición X<sub>5</sub> puede ser cualquier aminoácido distinto de Ile (I) y el aminoácido en la posición X<sub>8</sub> puede ser cualquier aminoácido distinto de Asp (D) o Glu (E). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (N), arginina (R) y lisina (K) en la posición X<sub>8</sub> de la SEQ ID NO: 38. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir independientemente metionina (M) en la posición X<sub>5</sub> de la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y glicina (G) en la posición X<sub>8</sub> de la SEQ ID NO: 38.

15 El aminoácido en la posición X<sub>5</sub> se puede sustituir por un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, y el aminoácido en la posición X<sub>3</sub> se puede sustituir por un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 29. Por lo tanto, el aminoácido en la posición X<sub>5</sub> puede ser cualquier aminoácido distinto de Ile (I) y el aminoácido en la posición X<sub>3</sub> puede ser cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Leu (L) o Met (M). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir lisina (K), arginina (R), serina (S), glicina (G) o alanina (A) en la posición X<sub>3</sub> de la SEQ ID NO: 29. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir independientemente metionina (M) en la posición X<sub>5</sub> de la SEQ ID NO: 8, 9, 10 o 11 y lisina (K) en la posición X<sub>3</sub> de la SEQ ID NO: 29.

20 Otras sustituciones de aminoácidos adecuadas en uno o más de los sitios identificados se pueden determinar usando, por ejemplo, procedimientos conocidos de mutagénesis dirigida a sitio y determinación del rendimiento de extensión de polinucleótidos en ensayos descritos adicionalmente en el presente documento o conocidos de otro modo por los expertos en la técnica, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos descritas en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.ºs 2009/0148891 y 2009/0280539.

30 Dado que la longitud precisa de las ADN polimerasas varía, las posiciones de aminoácidos precisas correspondientes a cada una de X<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 8), X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 38) y X<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 29) pueden variar dependiendo de la polimerasa mutante particular usada. Los programas de alineación de secuencias de aminoácidos y ácido nucleico están fácilmente disponibles (véanse, por ejemplo, los remitidos *supra*) y, dados los motivos particulares identificados en el presente documento, sirven para ayudar a la identificación de los aminoácidos exactos (y codones correspondientes) para la modificación de acuerdo con la presente invención. Las posiciones correspondientes a cada una de X<sub>5</sub>, X<sub>8</sub> y X<sub>3</sub> se muestran en

35 la Tabla 1 para ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas y ADN polimerasas termoestables de especies termófilas ejemplares.

40 **Tabla 1.** Posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones X<sub>5</sub> (por ejemplo, de las SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11), X<sub>8</sub> (de la SEQ ID NO: 38) y X<sub>3</sub> (de la SEQ ID NO: 29) del motivo en polimerasas ejemplares.

<u>Organismo o secuencia quimérica</u>	<u>Posición de aminoácido</u>		
	X <sub>5</sub>	X <sub>8</sub> (de la SEQ ID NO: 38)	X <sub>3</sub> (de la SEQ ID NO: 29)
Consenso (SEQ ID NO:)			
<i>T. thermophilus</i>	616	580	709
<i>T. caldophilus</i>	616	580	709
<i>T. sp. Z05 (1)</i>	616	580	709
<i>T. aquaticus</i>	614	578	707
<i>T. flavus</i>	613	577	706
<i>T. filliformis</i>	612	576	705
<i>T. sp. sps17</i>	612	576	705
<i>T. maritima</i>	677	640	770
<i>T. neapolitana</i>	677	640	770
<i>T. africanus</i>	676	639	769
<i>B. caldotenax</i>	658	621	751
<i>B. stearothermophilus</i>	657	620	750
CS5	677	640	770
CS6	677	640	770

La ADN polimerasa puede derivar de la ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma (por ejemplo, que porta la mutación D580G o similar). Como se menciona anteriormente, en la ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05, la posición X<sub>5</sub> corresponde a isoleucina (I) en la posición 616; la posición X<sub>8</sub> corresponde a aspartato (D) en la posición 580 y la posición X<sub>3</sub> corresponde a isoleucina (I) en la posición 709. La polimerasa mutante puede comprender al menos una sustitución de aminoácido, con respecto a una ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (o una ADN polimerasa que es sustancialmente idéntica, por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1), en 1616, D580 y/o 1709. Por lo tanto, típicamente, el aminoácido en la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 no es I. El aminoácido en la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 se puede seleccionar de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, L, M o H. El residuo de aminoácido en la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es M en la invención. Los residuos de aminoácido en la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se pueden seleccionar de leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (N), arginina (R) y lisina (K). Por lo tanto, el residuo de aminoácido en la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es glicina (G). Además, el aminoácido en la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 no es I. También se divulga que el aminoácido en la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 se selecciona de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, L, M o H. El aminoácido en la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K, R, S, G o A en la invención. Más específicamente, el aminoácido en la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K.

Los mutantes de ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 ejemplares incluyen los que comprenden las sustituciones de aminoácidos I616M y/o I709K (o I709R, I709S, I709G, I709A) y/o D580G. La ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácido I616M y D580G. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácido I616M e I709K. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácido I616M, I709K y D580G. La ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácido seleccionadas independientemente de I616M, I709K y/o D580G.

También se divulga que el aminoácido correspondiente a la posición 604 de la SEQ ID NO: 1 es Ala (A). En el presente documento, el aminoácido correspondiente a la posición 604 de la SEQ ID NO: 1 puede no ser Glu (E). El aminoácido correspondiente a la posición 604 de la SEQ ID NO: 1 puede no ser Val (V). El aminoácido correspondiente a la posición 610 de la SEQ ID NO: 1 puede ser Ala (A). El aminoácido correspondiente a la posición 610 de la SEQ ID NO: 1 puede no ser Asp (D) o Val (V). El aminoácido correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 no es Lys (K), Asn (N), Gln (Q) o Thr (T). También se divulga que el aminoácido correspondiente a la posición 617 de la SEQ ID NO: 1 puede ser Glu (E). El aminoácido correspondiente a la posición 617 de la SEQ ID NO: 1 puede no ser Gly (G) o Asp (D).

Las sustituciones del aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 descritas anteriormente pueden dar como resultado ADN polimerasas que tienen una eficacia de transcripción inversa mejorada (es decir, incrementada), actividad de RT-PCR incrementada (por ejemplo, amplificación más eficaz de un molde de ARN sin comprometer la eficacia de la PCR en un molde de ADN), aumento de la eficacia de RT-PCR en presencia de Mg<sup>2+</sup>, actividad transcriptasa inversa incrementada en presencia de inhibidores (por ejemplo, productos de descomposición de hemoglobina, tales como hemina y/o heparina), velocidad de extensión incrementada y tolerancia al emparejamiento erróneo en 3' mejorada en comparación con una polimerasa de control (véase la solicitud de patente de EE. UU. n.º 61/474.160). Por lo tanto, se espera que las polimerasas mejoradas que comprenden sustituciones en el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 descritas en el presente documento también tengan las propiedades mejoradas descritas anteriormente.

Además de las mutaciones y sustituciones descritas en el presente documento, las ADN polimerasas de la presente invención también pueden incluir otras modificaciones no sustitutivas. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, modificaciones covalentes conocidas en la técnica para conferir una ventaja adicional en aplicaciones que comprenden extensión de polinucleótidos. Por ejemplo, una de dichas modificaciones es una modificación covalente reversible térmicamente que inactiva la enzima, pero que se invierte para activar la enzima tras la incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura usada típicamente para la extensión de polinucleótidos. Los reactivos ejemplares para dichas modificaciones reversibles térmicamente se describen en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.773.258 y 5.677.152.

Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden construir mutando las secuencias de ADN que codifican la polimerasa no modificada correspondiente (por ejemplo, una polimerasa natural o una variante correspondiente de la que deriva la polimerasa de la invención), tal como usando técnicas denominadas comúnmente mutagénesis dirigida a sitio. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la forma no modificada de la polimerasa se pueden mutar mediante una variedad de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *PCR Strategies* (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) en el capítulo 14; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

A modo de ejemplo no limitante, se puede emplear el sistema de dos cebadores, utilizado en el kit de mutagénesis dirigida a sitio por transformador de Clontech, para introducir mutantes dirigidos a sitio en un polinucleótido que codifica

una forma no modificada de la polimerasa. Después de la desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores al plásmido; uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida a sitio deseada, el otro contiene una mutación en otro punto del plásmido que da como resultado la eliminación de un sitio de restricción. A continuación, se lleva a cabo la síntesis de la segunda hebra, enlazando firmemente estas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de *E. coli*. El ADN plasmídico se aísla de las bacterias transformadas, se restringe con la enzima de restricción pertinente (linealizando de este modo los plásmidos no mutados) y, a continuación, se retransforma en *E. coli*. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin la necesidad de subclonar o generar fagómidos monocatenarios. El firme enlace de las dos mutaciones y la linealización posterior de los plásmidos no mutados dan como resultado una eficacia de mutación alta y permiten un cribado mínimo. Después de la síntesis del cebador de sitio de restricción inicial, este procedimiento requiere el uso de únicamente un nuevo tipo de cebador por sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, se puede sintetizar un conjunto de cebadores oligonucleotídicos "degenerados diseñados" para introducir simultáneamente todas las mutaciones deseadas en un sitio dado. Los transformantes se pueden cribar mediante secuenciación del ADN plasmídico a través de la región mutagenizada para identificar y clasificar clones mutantes. A continuación, cada ADN mutante se puede restringir y analizar mediante electroforesis, tal como, por ejemplo, en un gel de potenciación de la detección de mutaciones (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) para confirmar que no se han producido otras alteraciones en la secuencia (mediante comparación por desplazamiento de banda con respecto al control no mutagenizado). De forma alternativa, se puede secuenciar toda la región de ADN para confirmar que no se ha producido ningún acontecimiento mutacional adicional fuera de la región diana.

Las ADN polimerasas con más de un aminoácido sustituido se pueden generar de diversas maneras. En el caso de aminoácidos localizados cerca entre sí en la cadena polipeptídica, se pueden mutar simultáneamente usando un oligonucleótido que codifique todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos están localizados a cierta distancia entre sí (separados en más de diez aminoácidos, por ejemplo), es más difícil generar un único oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, se puede emplear uno de dos procedimientos alternativos. En el primer procedimiento se genera un oligonucleótido separado para cada aminoácido que se va a sustituir. A continuación, los oligonucleótidos se hibridan simultáneamente al ADN molde monocatenario y la segunda hebra de ADN que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Un procedimiento alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es como se describe para los mutantes únicos: se usa el ADN que codifica la polimerasa no modificada para el molde, se hibrida un oligonucleótido que codifica la primera o primeras sustituciones de aminoácidos deseadas a este molde y, a continuación, se genera la molécula de ADN de heterodúplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como molde. Por lo tanto, este molde ya contiene una o más mutaciones. A continuación, el oligonucleótido que codifica las sustituciones de aminoácidos deseadas adicionales se hibrida a este molde y la cadena de ADN resultante codifica ahora mutaciones tanto de la primera como de la segunda ronda de mutagénesis. Este ADN resultante se puede usar como un molde en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente. De forma alternativa, se puede utilizar el procedimiento de mutagénesis de sitio múltiple de Seyfang y Jin (*Anal. Biochem.* 324:285-291, 2004).

En consecuencia, también se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de las ADN polimerasas de la presente invención. Usando un ácido nucleico de la presente invención, que codifica una ADN polimerasa, se pueden preparar una variedad de vectores. En la práctica de la invención se puede usar cualquier vector que contenga replicón y secuencias de control que deriven de una especie compatible con la célula huésped. En general, los vectores de expresión incluyen regiones de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción enlazadas de forma funcional al ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa. El término "secuencias de control" hace referencia a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada de forma funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Además, el vector puede contener un elemento retrorregulador positivo (PRE) para potenciar la semivida del ARNm transcrito (véase Gelfand *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.666.848). Las regiones de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción, en general, son apropiadas para la célula huésped usada para expresar la polimerasa. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir, por ejemplo, secuencias promotoras, sitios de unión a ribosoma, secuencias de inicio y parada de la transcripción, secuencias de inicio y parada de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. En modos de realización típicos, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias de inicio y parada de la transcripción. Los vectores también incluyen típicamente una región de policonector que contiene varios sitios de restricción para la inserción de ADN exógeno. En determinados modos de realización se usan "señales de fusión" para facilitar la purificación y, si se desea, la retirada posterior de la secuencia identificadora/señal, por ejemplo, el "identificador His". Sin embargo, en general son innecesarias cuando se purifica una proteína termoactiva y/o termoestable de un huésped mesófilo (por ejemplo, *E. coli*) en el que se puede emplear una "etapa de calor". La construcción de vectores adecuados que contienen ADN que codifica secuencias de replicación, secuencias reguladoras, genes de selección de fenotipo y la polimerasa de interés se preparan usando procedimientos de ADN recombinante estándar. Los plásmidos aislados, vectores víricos y fragmentos de ADN se escinden, adaptan y ligan entre sí en un orden específico para generar los vectores deseados, como se conoce bien en la técnica (véase, por



ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, NY, 2.<sup>a</sup> ed. 1989)).

El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y varían con la célula huésped usada. Los genes de selección adecuados pueden incluir, por ejemplo, genes que codifiquen resistencia a tetraciclina y/o ampicilina, que posibilita que las células transformadas con estos vectores crezcan en presencia de estos antibióticos.

Un ácido nucleico que codifica una ADN polimerasa se puede introducir en una célula, ya sea solo o en combinación con un vector. Por "introducir en" o equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la posterior integración, amplificación y/o expresión del ácido nucleico. El procedimiento de introducción viene dictado en gran medida por el tipo de célula seleccionada como diana. Los procedimientos ejemplares incluyen precipitación con CaPO<sub>4</sub>, fusión de liposomas, LIPOFECTIN®, electroporación, infección vírica y similares.

Los procariotas se pueden usar típicamente como células huésped para las etapas de clonación iniciales. Son particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la producción de moldes de ADN monocatenario usados para la mutagénesis dirigida a sitio, para cribar simultáneamente muchos mutantes y para la secuenciación de ADN de los mutantes generados. Las células huésped procariotas adecuadas incluyen la cepa 94 de *E. coli* K12 (ATCC n.º 31,446), la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC n.º 27.325), la cepa DG116 de *E. coli* K12 (ATCC n.º 53.606), *E. coli* X1776 (ATCC n.º 31.537) y *E. coli* B; sin embargo, se pueden usar como huésped muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539 y muchas otras especies y géneros de procariotas, que incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacterias como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans* y diversas especies de *Pseudomonas*. Las células huésped procarióticas u otras células huésped con paredes celulares rígidas se transforman típicamente usando el procedimiento de cloruro de calcio como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *supra*. De forma alternativa, se puede usar electroporación para la transformación de estas células. Las técnicas de transformación de procariotas se exponen, por ejemplo, en Dower, en *Genetic Engineering, Principles and Methods* 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 204:63, 1991. Los plásmidos usados típicamente para la transformación de *E. coli* incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 y Bluescript M13, que se describen todos en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook *et al.*, *supra*. Sin embargo, también están disponibles muchos otros vectores adecuados.

Las ADN polimerasas de la presente invención se producen típicamente cultivando una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la ADN polimerasa. Los procedimientos de cultivo de células huésped transformadas en condiciones adecuadas para la expresión de proteínas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). Las células huésped adecuadas para la producción de las polimerasas a partir de vectores plasmídicos que contienen promotor pL de lambda incluyen la cepa DG116 de *E. coli* (ATCC n.º 53606) (véase la patente de EE. UU. n.º 5.079.352 y Lawyer, F.C. *et al.*, PCR Methods and Applications 2:275-87, 1993). Después de la expresión, la polimerasa se puede recoger y aislar. Los procedimientos para purificar la ADN polimerasa termoestable se describen, por ejemplo, en Lawyer *et al.*, *supra*. Una vez purificada, se puede someter a prueba la capacidad de las ADN polimerasas para tener eficacia de RT mejorada, tolerancia al emparejamiento erróneo incrementada, velocidad de extensión incrementada y/o tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT incrementada (por ejemplo, como se describe en los ejemplos).

Las ADN polimerasas mejoradas de la presente invención se pueden usar para cualquier propósito en el que dicha actividad enzimática sea necesaria o deseada. En consecuencia, en otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos de extensión de polinucleótidos (por ejemplo, PCR) usando las polimerasas. Las condiciones adecuadas para la extensión de polinucleótidos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, véase también Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (4.<sup>a</sup> edición, John Wiley & Sons 1999)). En general, un cebador se hibrida a un ácido nucleico diana para formar un complejo cebador-molde. El complejo cebador-molde se pone en contacto con la ADN polimerasa y nucleósidos trifosfato en un ambiente adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos al extremo 3' del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido complementario al ácido nucleico diana. El cebador puede incluir, por ejemplo, uno o más análogos de nucleótidos. Además, los nucleósidos trifosfato pueden ser nucleótidos convencionales, nucleótidos no convencionales (por ejemplo, ribonucleótidos o nucleótidos marcados) o una mezcla de los mismos. En algunas variaciones, la reacción de extensión de polinucleótidos comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. Las condiciones adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos usando una ADN polimerasa y un par de cebadores también se conocen en la técnica (por ejemplo, procedimientos de amplificación por PCR); (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *supra*; PCR Applications: Protocols for Functional Genomics (Innis *et al.* eds., Academic Press 1999)). En otros modos de realización que no son mutuamente excluyentes, la reacción de extensión de polinucleótidos comprende la transcripción inversa de un molde de ARN (por ejemplo, RT-PCR). En algunos modos de realización, las polimerasas mejoradas encuentran uso en la secuenciación 454 (Margulies, M *et al.* 2005, Nature, 437, 376-380).

Opcionalmente, la reacción de extensión del cebador comprende un inhibidor real o potencial de una polimerasa de referencia o no modificada. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir la velocidad de extensión de ácido nucleico y/o la

eficacia de transcripción inversa de una polimerasa de referencia o no modificada (de control). En el presente documento, el inhibidor puede ser hemoglobina o un producto de degradación de la misma. Por ejemplo, el producto de degradación de hemoglobina puede ser un producto de descomposición de hemo, tal como hemina, hematoporfirina o bilirrubina. El inhibidor puede ser un quelante de hierro o un pigmento púrpura. El inhibidor puede ser heparina. El inhibidor puede ser un tinte intercalante. El inhibidor puede ser melanina, que se ha descrito como un inhibidor de la polimerasa (véase, por ejemplo, Ekhardt *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 271(3):726-30 (2000)).

Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de moldes de polinucleótido aislados de muestras que comprenden inhibidores de la polimerasa, por ejemplo, tales como sangre. Por ejemplo, las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de hemoglobina, un componente principal de la sangre, o en presencia de un producto de degradación de hemoglobina. La hemoglobina se puede degradar en diversos productos de descomposición de hemo, tales como hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. Por lo tanto, se pueden usar ADN polimerasas de la presente invención para extender moldes en presencia de productos de degradación de hemoglobina, incluyendo, pero no limitados a, hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. En el presente documento, el producto de degradación de hemoglobina puede ser hemina. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de hemina aproximadamente 0,5 a 20,0  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 0,5 a 10,0  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 0,5 a 5,0  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1,0 a 10,0  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1,0 a 5,0  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 2,0 a 2,0 5,0  $\mu\text{M}$ , o aproximadamente 2,0 a 3,0  $\mu\text{M}$ . Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de hemina al menos aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0 o más de 20  $\mu\text{M}$ . Los productos de descomposición de hemoglobina incluyen quelantes de hierro y pigmentos púrpura. Por lo tanto, las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de quelantes de hierro y/o pigmentos púrpura. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de cantidades de productos de degradación de hemoglobina que inhibirían la extensión del mismo molde por una ADN polimerasa de referencia o de control.

Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de heparina. La heparina está presente comúnmente como un anticoagulante en muestras aisladas de sangre. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de aproximadamente 1,0 a 400 ng/ $\mu\text{l}$ , de 1,0 a 300 ng/ $\mu\text{l}$ , de 1,0 a 200 ng/ $\mu\text{l}$ , de 5,0 a 400 ng/ $\mu\text{l}$ , de 5,0 a 300 ng/ $\mu\text{l}$ , de 5,0 a 200 ng/ $\mu\text{l}$ , de 10,0 a 400 ng/ $\mu\text{l}$ , de 10,0 a 300 ng/ $\mu\text{l}$  o de 10,0 a 200 ng/ $\mu\text{l}$  de heparina. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ng/l o más de 400 ng/l de heparina. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de cantidades de heparina que inhibirían la extensión del mismo molde por una ADN polimerasa de referencia o de control.

Una polimerasa mejorada de la invención se puede usar en una reacción de transcripción inversa. La reacción de transcripción inversa se puede llevar a cabo en una mezcla que contenga el molde de ARN, uno o más cebadores y una ADN polimerasa termoestable de la invención. La mezcla de reacción contiene típicamente los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato estándar (dNTP) y un tampón que contiene un catión divalente y un catión monovalente. Los cationes ejemplares incluyen, por ejemplo,  $\text{Mg}^{2+}$ , aunque otros cationes, tales como  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ , pueden activar ADN polimerasas. La reacción de transcripción inversa se puede llevar a cabo con una ADN polimerasa termoactiva de la invención. La polimerasa mejorada de la invención puede permitir una amplificación más eficaz de moldes de ARN sin comprometer la amplificación eficaz de un molde de ADN en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , como se describe en los ejemplos.

La polimerasa mejorada puede tener una eficacia de transcripción inversa incrementada en comparación con una polimerasa de control. No se apreció previamente que las sustituciones en el aminoácido correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 pudieran dar como resultado una eficacia de RT incrementada. Por lo tanto, las ADN polimerasas que tienen una sustitución de Ile (I) por Met (M) en el aminoácido correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 pueden tener una eficacia de RT incrementada.

La ADN polimerasa que tiene una eficacia de transcripción inversa incrementada puede comprender una sustitución de Ile (I) por Met (M) en el aminoácido correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1, y puede tener al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1.

La polimerasa mejorada puede tener eficacia de transcripción inversa incrementada usando un molde de ARN sin una disminución sustancial de la actividad polimerasa usando un molde de ADN. Por lo tanto, la ADN polimerasa mejorada puede tener una eficacia de RT incrementada sin una disminución sustancial de la actividad polimerasa dependiente de ADN cuando se compara con una polimerasa de control. La ADN polimerasa mejorada descrita en el presente documento puede tener actividad polimerasa dependiente de ADN que sea sustancialmente la misma que la de una polimerasa de control. Por lo tanto, la ADN polimerasa mejorada descrita en el presente documento puede tener actividad polimerasa dependiente de ADN que sea al menos aproximadamente un 90 % de la actividad de una polimerasa de control, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más de la actividad de una polimerasa de control. La actividad polimerasa dependiente de ADN se puede medir, por ejemplo,

amplificando un molde de ADN y determinando los valores de  $P_c$  como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la ADN polimerasa puede tener una eficacia de RT mejorada medida como un valor de  $P_c$  disminuido en comparación con una polimerasa de control cuando se usa ARN como molde, pero puede tener un valor de  $P_c$  sustancialmente sin cambios en relación con la polimerasa de control cuando se usa ADN como molde. Por ejemplo, cuando se amplifica un molde de ADN, la ADN polimerasa mejorada puede tener un valor de  $P_c$  que difiere en menos de 1,0, menos de 0,5, menos de 0,4, menos de 0,3, menos de 0,2 o menos de 0,1 en comparación con una polimerasa de control. La actividad polimerasa dependiente de ADN se puede determinar como se describe en los ejemplos.

Una polimerasa mejorada de la invención puede incrementar la eficacia de transcripción inversa reduciendo el tiempo de reacción requerido para extender un molde de ARN. Por ejemplo, una polimerasa mejorada descrita en el presente documento puede reducir significativamente el tiempo de reacción requerido para transcribir ARN a ADNc en comparación con una polimerasa de control, incrementando de este modo la eficacia de transcriptasa inversa. Sin estar limitada por la teoría, la polimerasa mejorada puede incrementar la eficacia de RT, por ejemplo, incrementando la actividad de la enzima sobre un molde de ARN, así como incrementando la velocidad de incorporación de nucleótidos y/o incrementando la procesabilidad de la polimerasa, reduciendo eficazmente de este modo el tiempo de extensión de un molde de ARN o población de moldes de ARN. Los tiempos de reacción para la etapa de RT inicial son típicamente del orden de 30 minutos o más a 65 grados Celsius cuando se usa una polimerasa no modificada o de control. Por lo tanto, la polimerasa mejorada puede ser capaz de transcribir un molde de ARN en ADNc en menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 8 minutos, menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 4 minutos, menos de aproximadamente 3 minutos o menos de aproximadamente 2 minutos a 65 grados Celsius. La polimerasa mejorada puede ser capaz de transcribir un molde de ARN derivado del transcrito JP2-5 del virus de la hepatitis C (VHC), que contiene las primeras 800 bases de la 5'NTR del genotipo 1b del VHC, en ADNc en menos tiempo o más rápido que una polimerasa de control. Por ejemplo, la polimerasa mejorada puede ser capaz de transcribir 240 bases del molde de ARN de JP2-5 del VHC en ADNc de longitud completa en aproximadamente 15 segundos menos, 30 segundos menos, un minuto menos, dos minutos menos, 3 minutos menos, 4 minutos menos, 5 minutos menos o aproximadamente 10 minutos menos que una polimerasa de control en idénticas condiciones de reacción. La polimerasa mejorada puede ser capaz de transcribir 240 bases del molde de ARN de JP2-5 del VHC en ADNc de longitud completa más rápido que una polimerasa de control, por ejemplo, en aproximadamente 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 45 segundos o 60 segundos o más rápido que una polimerasa de control en condiciones de reacción idénticas. Las condiciones de reacción pueden ser las descritas en los ejemplos. Una polimerasa mejorada descrita en el presente documento se puede poner en contacto con un molde de ARN a 65 grados Celsius durante aproximadamente 2 minutos en la mezcla de reacción descrita anteriormente. La etapa de extensión puede ir seguida de amplificación por PCR del molde extendido, como se describe en los ejemplos.

La actividad de RT más eficaz en ADN polimerasas termoestables se ha logrado usando  $Mn^{2+}$  como el activador de iones de metal divalentes. Sin embargo, se conoce bien que cuando el  $Mn^{2+}$  está presente en las reacciones, la fidelidad de las ADN polimerasas es más baja. A menos se esté tratando de generar mutaciones, en general se favorece mantener una fidelidad más alta. Afortunadamente, la mayoría de las aplicaciones convencionales de secuenciación, PCR y RT-PCR, no requieren condiciones de alta fidelidad porque los sistemas de detección buscan, en general, una población de productos. Con la llegada de la siguiente generación de secuenciación, la PCR digital, etc., la fidelidad del producto es más importante y los procedimientos que permiten una síntesis de ADN de fidelidad más alta son críticos. Conseguir una actividad de RT eficaz usando  $Mg^{2+}$  como activador de iones de metal divalentes es una excelente manera de incrementar sustancialmente la fidelidad de la ADN polimerasa y permitir una copia más fiable de la diana de ácido nucleico. En consecuencia, la polimerasa mejorada de la invención puede permitir una extensión y/o amplificación eficaces de moldes de ARN usando  $Mg^{2+}$  como activador de iones de metal divalentes, como se describe en los ejemplos.

Debido a que las polimerasas descritas en el presente documento también pueden tener tolerancia al emparejamiento erróneo incrementada, las polimerasas encuentran uso en procedimientos en los que es probable la variación del molde diana y, no obstante, se desea que el molde aún se amplifique independientemente de la variación en el molde diana. Un ejemplo de dichos moldes puede incluir, por ejemplo, secuencias víricas, bacterianas o de otros patógenos. Puede ser deseable determinar simplemente si un sujeto (humano o animal no humano) tiene una infección vírica u otra infección, independientemente de la variante vírica precisa que ha infectado al sujeto. Como ejemplo, se puede usar un par de cebadores para amplificar el VHC usando una polimerasa de la invención y detectar la presencia del VHC incluso si el virus particular que infecta al sujeto tiene una mutación que da como resultado un emparejamiento erróneo en el sitio de hibridación del cebador.

Los ácidos nucleicos diana pueden proceder de una fuente biológica o sintética. La diana puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. En general, cuando se generan amplicones, los amplicones estarán compuestos de ADN, aunque también se pueden incorporar ribonucleótidos o nucleótidos sintéticos en el amplicón. Cuando se desea detectar un ARN, el procedimiento de amplificación implica típicamente el uso de transcripción inversa, incluyendo, por ejemplo, PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

Las secuencias diana específicas pueden incluir, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV), parvovirus B19, virus de

Epstein-Barr, virus de la hepatitis C (VHC), virus del papiloma humano (VPH), virus de la encefalitis japonesa (VEJ), virus del Nilo Occidental (VNO), virus de la encefalitis de San Luis (VESL), virus de la encefalitis del valle de Murray y virus Kunjin), ácidos nucleicos bacterianos (por ejemplo, *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Plasmodium falciparum*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*), micobacterias, ácidos nucleicos fúngicos o ácidos nucleicos de animales o plantas. Los ácidos nucleicos diana pueden ser ácidos nucleicos de animales (por ejemplo, humanos) o pueden derivar de una muestra animal (por ejemplo, humana) (es decir, puede haber ácidos nucleicos de organismos víricos u otros patógenos presentes en una muestra de una biopsia animal, muestra de sangre, muestra de orina, muestra fecal, saliva, etc.). Los ácidos nucleicos diana son, por ejemplo, regiones genéticas humanas que pueden incluir variantes asociadas con la enfermedad (por ejemplo, cáncer, diabetes, etc.). Debido a que las polimerasas de la invención pueden tener tolerancia al emparejamiento erróneo, dichas enzimas pueden ser particularmente útiles, por ejemplo, cuando puede haber una diversidad de secuencias relacionadas en una secuencia diana. Como ejemplo, la invención se puede usar para detectar patógenos víricos, en la que los patógenos víricos tienen suficiente variación en sus genomas para hacer difícil o imposible diseñar un conjunto único o pequeño de cebadores que amplifiquen la mayoría o todos los genomas víricos posibles o marcadores genéticos de cáncer u otras enfermedades en los que se sabe que se produce o es probable que se produzca una variación en la secuencia.

Otros procedimientos para detectar productos de extensión o productos de amplificación que usan las polimerasas mejoradas descritas en el presente documento incluyen el uso de tintes de unión a nucleótidos bicatenarios fluorescentes o tintes intercalantes de nucleótidos bicatenarios fluorescentes. Los ejemplos de tintes de unión a ADN bicatenario fluorescentes incluyen SYBR-green (Molecular Probes). Los tintes de unión a ADN bicatenario se pueden usar junto con el análisis de curvas de fusión para medir productos de extensión del cebador y/o productos de amplificación. El análisis de curvas de fusión se puede realizar en un instrumento de PCR en tiempo real, tal como el instrumento ABI 5700/7000 (formato de 96 pocillos) o ABI 7900 (formato de 384 pocillos) con programa informático integrado (SDS 2.1). De forma alternativa, el análisis de curvas de fusión se puede realizar como un análisis de criterio de valoración. Los procedimientos ejemplares de análisis de puntos de fusión se describen en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2006/0172324.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan kits para su uso en procedimientos de extensión del cebador descritos en el presente documento. En el presente documento, el kit se puede compartimentar para facilitar su uso y contiene al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa mejorada de acuerdo con la presente invención. También se pueden incluir uno o más recipientes adicionales que proporcionan un reactivo o reactivos adicionales. El kit también puede incluir un tubo de extracción sanguínea, recipiente o unidad que comprende heparina o una sal de la misma, o libera heparina en solución. La unidad de extracción sanguínea puede ser un tubo heparinizado. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualquier reactivo u otros elementos reconocidos por el experto en la técnica para su uso en procedimientos de extensión del cebador de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, incluyendo reactivos para su uso, por ejemplo, en procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de marcaje de ADN. Por ejemplo, el kit puede incluir además un recipiente que proporciona un cebador codificante 5' hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado, o un par de cebadores que comprende el cebador codificante 5' y un cebador no codificante 3' correspondiente. El kit puede incluir uno o más recipientes que proporcionan nucleósidos trifosfato (convencionales y/o no convencionales). Más específicamente, el kit puede incluir alfa-fosforotioato dNTP, dUTP, dITP y/o dNTP marcados, tales como, por ejemplo, dNTP marcados con familias de tintes de fluoresceína y cianina. El kit también puede incluir uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión del cebador.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan mezclas de reacción que comprenden las polimerasas con eficacia de transcriptasa inversa incrementada, tolerancia al emparejamiento erróneo incrementada, velocidad de extensión incrementada y/o tolerancia a los inhibidores de polimerasa y RT incrementada como se describe en el presente documento. Las mezclas de reacción pueden comprender además reactivos para su uso, por ejemplo, en procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de marcaje de ADN. Por ejemplo, las mezclas de reacción pueden comprender un tampón adecuado para una reacción de extensión del cebador. Las mezclas de reacción también pueden contener un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos de sonda o cebador, nucleósidos trifosfato (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos marcados, nucleótidos no convencionales), sales (por ejemplo,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), marcadores (por ejemplo, fluoróforos). Las mezclas de reacción pueden contener un cebador codificante 5' hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado o un par de cebadores que comprende el cebador codificante 5' y un cebador no codificante 3' correspondiente. Las mezclas de reacción pueden contener alfa-fosforotioato dNTP, dUTP, dITP y/o dNTP marcados, tales como, por ejemplo, dNTP marcados con familias de tintes de fluoresceína y cianina. Las mezclas de reacción pueden comprender un quelante de hierro o un tinte púrpura. Las mezclas de reacción pueden comprender hemoglobina o un producto de degradación de hemoglobina. Por ejemplo, los productos de degradación de hemoglobina pueden incluir productos de descomposición de hemo, tales como hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. Las mezclas de reacción pueden comprender heparina o una sal de la misma. La mezcla de reacción puede contener un ácido nucleico molde que se aísla de la sangre. El ácido nucleico molde puede ser ARN y la mezcla de reacción puede comprender heparina o una sal de la misma.

La mezcla de reacción puede comprender dos o más polimerasas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede comprender una primera ADN polimerasa que tenga eficacia de transcriptasa inversa incrementada en comparación con una polimerasa de control y una segunda ADN polimerasa que tenga actividad polimerasa dependiente de ADN. La segunda ADN polimerasa puede ser una polimerasa natural o no modificada, o puede ser una polimerasa mejorada que tenga actividad polimerasa dependiente de ADN incrementada. Dichas mezclas de reacción son útiles para la amplificación de moldes de ARN (por ejemplo, RT-PCR) proporcionando tanto una polimerasa que tiene actividad transcriptasa inversa incrementada como una polimerasa que tiene actividad polimerasa dependiente de ADN.

## EJEMPLOS

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

### **Ejemplo 1: Generación de genoteca**

En resumen, las etapas en este procedimiento de cribado incluyen la generación de genotecas, expresión y purificación parcial de las enzimas mutantes, cribado de las enzimas frente a las propiedades deseadas, secuenciación de ADN, purificación de clones y caracterización adicional de mutantes candidatos seleccionados. Cada una de estas etapas se describe más adelante.

**Generación de genotecas de clones:** Un ácido nucleico que codificaba el dominio de polimerasa de la ADN polimerasa Z05 D580G\_I709K se sometió a PCR propensa a errores (mutagénica) entre los sitios de restricción Bsp I y Bgl II de un plásmido que incluía esta secuencia de ácido nucleico. Los cebadores usados para esto se dan a continuación:

Cebador directo: 5'-CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3' (SEQ ID NO: 30); y,

Cebador inverso: 5'-ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTA-3' (SEQ ID NO: 31)

La PCR se realizó usando una concentración de Mg<sup>2+</sup> de 1,8 mM para generar una genoteca con una tasa de mutación deseada. Las condiciones del tampón fueron bicina 50 mM pH 8,2, KOAc 115 mM, glicerol al 8 % p/v y 0,2 mM de cada dNTP. Se utilizó una enzima de PCR de inicio en caliente GeneAmp® AccuRT a 0,15 U/μl. Comenzando con 5 x 10<sup>5</sup> copias de ADN plasmídico de Z05 D580G\_I709K linealizado por volumen de reacción de 50 μl, se desnaturalizaron las reacciones usando una temperatura de 94 °C durante 60 segundos, a continuación, se realizaron 30 ciclos de amplificación usando una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 15 segundos, una temperatura de hibridación de 60 °C durante 15 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C durante 120 segundos y seguidos de una extensión final a una temperatura de 72 °C durante 5 minutos.

El amplicón resultante se purificó con un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EE. UU.) y se cortó con Bsp I y Bgl II; a continuación, se volvió a purificar con un kit de purificación de PCR QIAquick. Se preparó un plásmido de vector de Z05 D580G\_I709K cortando con las mismas dos enzimas de restricción y tratando con fosfatasa alcalina, recombinante (RAS, n.º cat. 03359123001) y se purificó con un kit de purificación de PCR QIAquick. El vector cortado y el inserto mutado se mezclaron en una proporción 1:3 y se trataron con ADN ligasa T4 durante 5 minutos a temperatura ambiente (kit Quick Ligation™ de NEB). Las ligaciones se purificaron con un kit de purificación de PCR QIAquick y se transformaron en una cepa huésped de *E. coli* mediante electroporación.

Se sembraron en placas alícuotas de los cultivos expresados en medio selectivo de ampicilina para determinar el número de transformantes únicos en cada transformación. Las transformaciones se agruparon y almacenaron a -70 °C hasta -80 °C en presencia de glicerol como crioprotector.

A continuación, la genoteca se extendió en placas de agar selectivas a ampicilina de gran formato. Las colonias individuales se transfirieron a placas de 384 pocillos que contenían caldo Luria 2X con ampicilina y glicerol al 10 % p/v usando un colector automatizado de colonias (QPix2, Genetix Ltd). Estas placas se incubaron durante la noche a 30 °C para permitir que los cultivos crecieran y, a continuación, se almacenaron a -70 °C hasta -80 °C. El glicerol añadido al caldo Luria 2X era suficientemente bajo para permitir el crecimiento del cultivo, pero suficientemente alto para proporcionar crioprotección. Se prepararon varios miles de colonias de esta manera para su uso posterior.

**Preparación de genotecas de extractos, parte 1 - fermentación:** A partir de las genotecas de clones descritas anteriormente, se preparó una genoteca correspondiente de extractos parcialmente purificados adecuados para propósitos de cribado. La primera etapa de este procedimiento fue preparar cultivos de expresión a pequeña escala de cada clon. Estos cultivos se cultivaron en un formato de 96 pocillos; por lo tanto, había 4 placas de cultivo de expresión para cada placa de la genoteca de 384 pocillos. Se transfirieron 0,5 μl de cada pocillo de la placa de la genoteca de clones a un pocillo de una placa de siembra de 96 pocillos que contenía 150 μl de medio A (véase la tabla 3 a continuación). Esta placa de siembra se agitó durante la noche a 1150 rpm a 30 °C en una estufa/agitador de placas iEMS (ThermoElectron). A continuación, estos cultivos de siembra se usaron para inocular el mismo medio, esta vez inoculando 20 μl en 250 μl de medio A en placas de 96 pocillos de gran formato (Nunc n.º 267334). Estas

placas se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación. El plásmido de expresión contenía elementos de control de la transcripción, que permiten la expresión a 37 °C, pero no a 30 °C. Después de la incubación durante la noche, los cultivos expresaron la proteína del clon a típicamente un 1-10 % de la proteína celular total. Las células de estos cultivos se recogieron mediante centrifugación. Estas células se congelaron (-20 °C) o bien se procesaron inmediatamente, como se describe a continuación.

**Tabla 2.** Medio A (esterilizado por filtración antes de su uso)

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

10 **Preparación de la genoteca de extractos, parte 2 - extracción:** Los sedimentos celulares de la etapa de fermentación se resuspendieron en 25 µl de tampón de lisis (tabla 3 a continuación) y se transfirieron a placas de termociclador de 384 pocillos y se precintaron. Obsérvese que el tampón contenía lisozima para ayudar en la lisis celular y DNasa para retirar el ADN del extracto. Para lisar las células, las placas se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, se congelaron durante la noche a -20 °C y se incubaron de nuevo a 37 °C durante 15 minutos. Se añadió sulfato de amonio (1,5 µl de una solución 2 M) y las placas se incubaron a 75 °C durante 15 minutos para precipitar e inactivar las proteínas contaminantes, incluyendo las nucleasas añadidas de manera exógena. Las placas se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de termociclador de 384 pocillos nueva. Estas placas de extractos se congelaron a -20 °C para su uso posterior en cribados.

20 Cada pocillo contenía aproximadamente 0,5-3 µM de la enzima polimerasa de la genoteca de mutantes.

**Tabla 3.** Tampón de lisis

Componente	Concentración o porcentaje
Tris pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	6 mM
Tween 20	0,5 % v/v
Lisozima (a partir de polvo)	1 mg/ml
DNasa I	0,05 unidades/µl

25 **Ejemplo 2: Identificación de ADN polimerasas mutantes con eficacia de transcripción inversa mejorada**

**Cribado de genotecas de extractos para una eficacia de transcripción inversa mejorada:** La genoteca de extractos se cribó comparando los valores de P<sub>c</sub> (punto de corte) de las curvas de crecimiento generadas por la actividad 5'-nucleasa fluorescente (TaqMan) de extractos enzimáticos en bruto en un sistema de RT-PCR a partir de la amplificación de un amplicón de 240 pares de bases del transcrito JP2-5 del virus de la hepatitis C (VHC), que contenía las primeras 800 bases de la 5'NTR del genotipo 1b del VHC en pSP64 poli(A) (Promega).

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador cinético LC 480 de Roche en formato de 384 pocillos, conteniendo cada pocillo 3 µl de un extracto enzimático único diluido 10 veces con tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y Tween-20 al 0,1 % añadido a 12 µl de mezcla maestra de RT-PCR descrita en la tabla 4. Las condiciones de termociclado fueron: 2 minutos a 50 °C (etapa de "UNG"); 2 minutos a 65 °C (etapa de "RT"); 5 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, seguidos de 62 °C durante 30 segundos; y 45 ciclos de 91 °C durante 15 segundos, seguidos de 62 °C durante 30 segundos.

Tabla 4

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Tricina pH 8,3	50 mM
KOAc	60 mM
Glicerol	5 % (v/v)
DMSO	2 % (v/v)
Cebador 1	200 nM
Cebador 2	200 nM
Sonda TaqMan	100 nM
Aptámero	200 nM
dATP	200 $\mu$ M
dCTP	200 $\mu$ M
dGTP	200 $\mu$ M
dUTP	400 $\mu$ M
UNG	0,2 unidades/ $\mu$ l
ARN diana	6666 copias/ $\mu$ l
Mg(OAc) <sub>2</sub>	2 mM

5 Aproximadamente 5000 clones se cribaron usando el protocolo anterior. Se seleccionaron 40 clones del grupo original para un nuevo cribado basándose en los valores de punto de corte (Pc) más tempranos y valores de meseta fluorescente por encima de un corte arbitrario calculado mediante el procedimiento de cuantificación absoluta/máximo de la 2.<sup>a</sup> derivada. Los pocillos de cultivo correspondientes a los extractos superiores se muestrearon en medio de cultivo reciente y se cultivaron nuevamente para producir nuevas placas de cultivo que contenían los mejores mutantes, así como una serie de cultivos de Z05 D580G\_I709K precursores que se usarían para controles comparativos. A continuación, se usaron estas placas de cultivo para preparar nuevos extractos en bruto que se cribaron de nuevo con la misma diana de ARN y condiciones como se describe previamente para el cribado original. La tabla 5 muestra los valores de Pc promedio obtenidos a partir del incremento de señales fluorescentes debido a la hidrólisis en 5' de una sonda marcada con FAM. Los resultados muestran que el clon 0686-C21 amplifica la diana de ARN con mayor eficacia que el precursor Z05 D580G\_I709K.

Tabla 5

<u>Clon</u>	<u>Pc promedio</u>
0686-C21	20,9
Z05 D580G_I709K	28,0

20 La secuencia de ADN de la región mutada del gen de la polimerasa se secuenció para determinar las mutaciones que estaban presentes en cualquier clon individual. El clon 0686-C21 se eligió para pruebas adicionales, de modo que la proteína polimerasa mutante se expresó en cultivo en matraz, se purificó hasta la homogeneidad y se cuantificó.

25 **Uso del mutante Z05 D580G\_I709K en RT-PCR basada en Mg<sup>2+</sup>:** Los resultados de secuenciación revelaron que la polimerasa expresada por el clon 0686-C21 llevaba la mutación I616M, además de las mutaciones D580G e I709K precursoras. El mutante Z05 D580G\_I709K\_I616M purificado se comparó con el Z05 D580G\_I709K precursor en RT-PCR basada en Mg<sub>2+</sub> TaqMan. Las eficacias de transcripción inversa y PCR se midieron comparando los valores de Pc de las amplificaciones del transcrito de ARN JP2-5 y del plásmido lineal de ADN pJP2-5 digeridos con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Los oligonucleótidos y las condiciones de mezcla maestra (tabla 4) fueron los mismos que se usaron en el cribado original. Cada reacción tenía 100 000 copias de ARN de transcrito JP2-5, 30 100 000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5 o 1000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5. Se amplificaron todas las dianas con el cebador 1 y el cebador 2, como se describe anteriormente, en reacciones por duplicado para generar un amplicón de 240 pares de bases. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Light Cycler 480 de Roche con un volumen de reacción de 15  $\mu$ l. Los puntos de corte (Pc) se calcularon mediante el procedimiento de cuantificación absoluta/máximo de la 2.<sup>a</sup> derivada y se promediaron. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando un intervalo de concentraciones de ADN polimerasa desde 5 nM hasta 40 nM. Las condiciones de termociclado fueron: 2 minutos a 50 °C (etapa de "UNG"); 2 minutos a 65 °C (etapa de "RT"); 5 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, seguidos de 62 °C durante 30 segundos; y 45 ciclos de 91 °C durante 15 segundos, seguidos de 62 °C

durante 30 segundos. La tabla 6 muestra los valores de Pc obtenidos a partir del incremento de señales fluorescentes debido a la escisión de la sonda TaqMan en condiciones de enzima 20 nM.

Tabla 6

Enzima	Pc de 10 <sup>5</sup> copias de ARN	Pc de 10 <sup>5</sup> copias de ADN	Pc de 10 <sup>3</sup> copias de ADN
Z05 D580G_I709K	28,8	17,5	24,4
Z05 D580G_I709K_I616M	19,9	17,4	24,3

Los resultados indican que Z05 D580G\_I709K\_I616M mutante permite una amplificación más eficaz de la diana de ARN sin comprometer la eficacia de la PCR en una diana de ADN, en comparación con la enzima precursora D580G\_I709K.

**Ejemplo 3: Mezclado de la ADN polimerasa mutante Z05 D580G\_I709K\_I616M con la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® en RT-PCR basada en Mg<sup>2+</sup>**

El mutante Z05 D580G\_I709K\_I616M purificado (0686-C21) se mezcló con ADN polimerasa AmpliTaq Gold® ("TaqGold") en una mezcla maestra TaqGold tamponada con Tris-HCl modificada (tabla 7) y se usó para amplificar moldes de ARN y ADN en RT-PCR basada en Mg<sup>2+</sup> TaqMan®.

Tabla 7

Componente	Concentración
Tris-HCl pH 8,0	50 mM
KOAc, pH 7,0	70 mM
Glicerol	5 % (v/v)
DMSO	2 % (v/v)
Cebador 1	200 nM
Cebador 2	200 nM
Sonda TaqMan	100 nM
Aptámero	200 nM
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
UNG	0,2 unidades/µl
Mg(OAc) <sub>2</sub>	2 mM

Las eficacias de transcripción inversa y PCR se midieron comparando los valores de Pc de las amplificaciones del transcrito de ARN JP2-5 y del plásmido lineal de ADN pJP2-5 digeridos con la endonucleasa de restricción EcoRI. Cada reacción tenía 100 000 copias de ARN de transcrito JP2-5, 100 000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5 o 1000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5. Se amplificaron todas las dianas con el cebador 1 y el cebador 2, como se describe anteriormente, en reacciones por duplicado para generar un amplicón de 240 pares de bases. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Light Cycler 480 de Roche con un volumen de reacción de 15 µl. Los puntos de corte (Pc) se calcularon mediante el procedimiento de cuantificación absoluta/máximo de la 2.<sup>a</sup> derivada y se promediaron. La amplificación de cada uno de los moldes de ARN y ADN se llevó a cabo con las siguientes condiciones de enzimas separadas: 10 nM de Z05 D580G\_I709K\_I616M mezclada con 0,5 U/µl de TaqGold; 0,5 U/µl de TaqGold; 20 nM de Z05 D580G\_I709K\_I616M. Las condiciones de termociclado fueron: 2 minutos a 50 °C (etapa de "UNG"); 2 minutos a 55 °C, 4 minutos a 60 °C, 60 minutos a 65 °C (etapa de "RT" a tres temperaturas); 10 minutos a 95 °C (etapa de activación de "TaqGold"); 5 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, seguidos de 62 °C durante 30 segundos; y 45 ciclos de 91 °C durante 15 segundos, seguidos de 62 °C durante 30 segundos. La tabla 8 muestra los valores de Pc obtenidos a partir del incremento de señales fluorescentes debido a la escisión de la sonda TaqMan para las tres condiciones de enzimas diferentes.



Tabla 8

Enzima(s)	Pc de 10 <sup>5</sup> copias de ARN	Pc de 10 <sup>5</sup> copias de ADN	Pc de 10 <sup>3</sup> copias de ADN
TaqGold	N/S	17,7	25,1
Z05 D580G_I709K_I616M	N/S	N/S	N/S
Mezcla Z05 D580G_I709K_I616M / TaqGold	20,0	17,6	24,9
N/S = sin señal			

5 Los resultados indican que la combinación del mutante Z05 D580G\_I709K\_I616M con TaqGold permite la amplificación eficaz de la diana de ARN sin comprometer la eficacia de la PCR en la diana de ADN. La condición de control de TaqGold confirma el hecho comúnmente conocido de que la polimerasa Taq amplifica los moldes de ARN con una eficacia escasa. El control Z05 D580G\_I709K\_I616M sugiere que la ADN polimerasa mutante no puede amplificar las dianas de ARN o ADN en esta mezcla maestra tamponada basada en Tris con este perfil térmico modificado.

10 Se entiende que los ejemplos y modos de realización descritos en el presente documento son únicamente para propósitos ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a expertos en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> ADN polimerasas con actividad mejorada
- <130> 27284 WO-Hs
- 10 <140> Aún no aginado  
<141> Aún no asignado
- <150> US 61/568.294  
<151> 08-12-2011
- 15 <160> 39
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 20 <210> 1  
<211> 834  
<212> PRT  
<213> *Thermus sp.*
- 25 <220>  
<223> ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (Z05)

<400> 1  
Met 1 Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
1 5 10 15  
Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
20 25 30  
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
35 40 45  
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
50 55 60  
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
65 70 75 80  
Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
85 90 95  
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
100 105 110  
Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
115 120 125  
Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
130 135 140  
Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
145 150 155 160  
Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
165 170 175  
Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
180 185 190  
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
195 200 205  
Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
210 215 220  
Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
225 230 235 240  
Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
245 250 255  
Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
260 265 270  
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
275 280 285  
Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
290 295 300

ES 2 668 448 T3

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
 305 310 315 320  
 Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg  
 325 330 335  
 Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
 340 345 350  
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp  
 355 360 365  
 Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
 370 375 380  
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
 385 390 395 400  
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln  
 405 410 415  
 Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
 420 425 430  
 Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
 435 440 445  
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu  
 450 455 460  
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
 465 470 475 480  
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
 485 490 495  
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
 500 505 510  
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
 515 520 525  
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
 530 535 540  
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
 545 550 555 560  
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
 580 585 590  
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
 595 600 605  
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
 610 615 620  
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
 625 630 635 640  
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
 645 650 655  
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
 660 665 670  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 680 685  
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 695 700  
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 730 735  
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 740 745 750  
  
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 755 760 765  
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 775 780  
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
 785 790 795 800  
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
 805 810 815  
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Glu Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
 820 825 830

Lys Gly

<210> 2

<211> 832

5 <212> PRT

<213> *Thermus aquaticus*

<220>

<223> ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

10

<400> 2

Met	Arg	Gly	Met	Leu	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gly	Arg	Val	Leu	Leu
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	His	His	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Phe	His	Ala	Leu	Lys	Gly
			20					25					30		
Leu	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Ala
		35					40					45			
Lys	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Asp	Ala	Val	Ile	Val
	50					55					60				
Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	His	Glu	Ala	Tyr	Gly	Gly
65				70						75				80	
Tyr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln	Leu
				85					90					95	
Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu
			100					105					110		
Val	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys
		115					120					125			
Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Asp
	130					135					140				
Leu	Tyr	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Arg	Ile	His	Val	Leu	His	Pro	Glu	Gly
145					150					155					160
Tyr	Leu	Ile	Thr	Pro	Ala	Trp	Leu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro
				165					170					175	
Asp	Gln	Trp	Ala	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Glu	Ser	Asp	Asn
			180					185					190		
Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu
		195					200					205			
Glu	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg	Leu
	210					215					220				
Lys	Pro	Ala	Ile	Arg	Glu	Lys	Ile	Leu	Ala	His	Met	Asp	Asp	Leu	Lys
225					230					235					240
Leu	Ser	Trp	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val
				245					250					255	
Asp	Phe	Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Phe
			260					265					270		
Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu
		275					280					285			
Glu	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Glu	Gly
	290					295					300				
Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Glu	Pro	Met	Trp	Ala	Asp
305					310					315					320
Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly	Arg	Val	His	Arg	Ala	Pro
				325					330					335	
Glu	Pro	Tyr	Lys	Ala	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys	Glu	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu
			340					345					350		
Ala	Lys	Asp	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Glu	Gly	Leu	Gly	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Asn
	370					375					380				
Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp	Thr	Glu
385					390					395					400
Glu	Ala	Gly	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	Phe	Ala	Asn	Leu
				405					410					415	
Trp	Gly	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	Arg	Glu
			420					425					430		

ES 2 668 448 T3

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly  
 435 440 445  
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala  
 450 455 460  
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp  
 485 490 495  
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg  
 500 505 510  
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile  
 515 520 525  
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr  
 530 535 540  
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu  
 545 550 555 560  
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser  
 565 570 575  
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln  
 580 585 590  
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala  
 595 600 605  
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly  
 610 615 620  
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr  
 625 630 635 640  
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro  
 645 650 655  
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly  
 660 665 670  
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu  
 675 680 685  
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg  
 690 695 700  
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val  
 705 710 715 720  
 Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg  
 725 730 735  
 Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro  
 740 745 750 755  
 Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu  
 755 760 765  
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His  
 770 775 780  
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala  
 785 790 795 800  
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro  
 805 810 815  
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 820 825 830

<210> 3  
 <211> 830  
 <212> PRT  
 <213> *Thermus filiformis*

<220>  
 <223> ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)

<400> 3  
 Met Leu Pro Leu Leu Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly  
 1 5 10 15  
 His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr  
 20 25 30  
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu



ES 2 668 448 T3

Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile  
 580 585 590  
 Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 595 600 605  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 610 615 620  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr  
 625 630 635 640  
 Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met  
 645 650 655  
 Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser  
 660 665 670  
 Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala  
 675 680 685  
 Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp  
 690 695 700  
 Ile Ala Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr  
 705 710 715 720  
 Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys  
 725 730 735  
 Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln  
 740 745 750  
 Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro  
 755 760 765  
 Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Gln Val His Asp Glu  
 770 775 780  
 Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Gln Leu  
 785 790 795 800  
 Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ser Val Pro Leu Glu  
 805 810 815  
 Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 820 825 830

<210> 4

<211> 831

5 <212> PRT

<213> *Thermus flavus*

<220>

<223> ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

10

<400> 4

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

ES 2 668 448 T3

		195					200					205			
Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	His	Leu	Asp	Gln	Val	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln	Ala	Gly	Met	Glu	Ala	Leu	Ala	Leu
225					230					235					240
Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Gln	Val	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp
				245					250					255	
Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	Phe	Leu
			260					265					270		
Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Glu
		275					280					285			
Gly	Pro	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Glu	Gly	Ala
	290					295					300				
Phe	Leu	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp	Ala	Glu	Leu
305					310					315					320
Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Trp	Glu	Gly	Arg	Leu	His	Arg	Ala	Gln	Asp
				325					330					335	
Pro	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys	Gly	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	Ala
			340					345					350		
Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Phe	Pro
		355					360					365			
Glu	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Asn	Thr
	370					375					380				
Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp	Thr	Glu	Asp
385					390					395					400
Ala	Gly	Glu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Phe	Gln	Thr	Leu	Lys
				405					410					415	
Glu	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Arg	Leu	Trp	Leu	Tyr	Glu	Glu	Val	
			420					425					430		
Glu	Lys	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Ala	Thr	Gly	Val
		435					440					445			
Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Glu	Val	Glu	Ala
	450					455					460				
Glu	Val	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Pro
465					470				475						480
Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Asp	Glu
				485					490					495	
Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Ile	Gly	Lys	Thr	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser
			500					505					510		
Thr	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Val
		515					520					525			
Asp	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Arg	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Thr	Tyr
	530					535					540				
Ile	Asp	Pro	Leu	Pro	Ala	Leu	Val	His	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Leu	His
545					550					555					560
Thr	Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser
				565					570					575	
Asp	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Thr	Pro	Leu	Gly	Gln	Arg
			580					585					590		
Ile	Arg	Arg	Ala	Phe	Val	Ala	Glu	Gly	Trp	Val	Leu	Val	Val	Leu	
		595					600					605			
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp
	610					615					620				
Glu	Asn	Leu	Ile	Arg	Val	Phe	Gln	Glu	Gly	Arg	Asp	Ile	His	Thr	Gln
625					630					635					640
Thr	Ala	Ser	Trp	Met	Phe	Gly	Val	Ser	Pro	Glu	Gly	Val	Asp	Pro	Leu
				645					650					655	
Met	Arg	Arg	Ala	Ala	Lys	Thr	Ile	Asn	Phe	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Met
			660					665					670		
Ser	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala
		675					680					685			
Val	Ala	Phe	Ile	Glu	Arg	Tyr	Phe	Gln	Ser	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Ala
	690					695					700				
Trp	Ile	Glu	Gly	Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg	Arg	Arg	Gly	Tyr	Val	Glu
705					710					715					720
Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Val	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Arg	Val
				725					730					735	



ES 2 668 448 T3

Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val  
 740 745 750  
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe  
 755 760 765  
 Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp  
 770 775 780  
 Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala  
 785 790 795 800  
 Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu  
 805 810 815  
 Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 820 825 830

<210> 5  
 <211> 830  
 <212> PRT  
 <213> *Thermus sp.*

5

<220>  
 <223> ADN polimerasa de *Thermus sp.* sps17 (Sps17)

10

<400> 5  
 Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly  
 1 5 10 15  
 His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr  
 20 25 30  
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu  
 35 40 45  
 Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp  
 50 55 60  
 Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile  
 85 90 95  
 Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly  
 100 105 110  
 Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys Ala Glu Arg  
 115 120 125  
 Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln  
 130 135 140  
 Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp  
 165 170 175  
 Val Glu Tyr Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp Asn Leu Pro Gly  
 180 185 190  
 Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Trp  
 195 200 205  
 Gly Ser Leu Glu Ala Ile Leu Lys Asn Leu Asp Gln Val Lys Pro Glu  
 210 215 220  
 Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Asn Asn Leu Asp Lys Leu Gln Met Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Trp Glu Gly Leu Lys Ala Phe Leu Glu  
 260 265 270  
 Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu Ala  
 275 280 285  
 Pro Lys Glu Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Gly Gly Ala Phe  
 290 295 300  
 Leu Gly Phe Leu Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Leu Ala Gly Ala Lys Glu Gly Arg Val His Arg Ala Glu Asp Pro  
 325 330 335  
 Val Gly Ala Leu Lys Asp Leu Lys Glu Ile Arg Gly Leu Leu Ala Lys  
 340 345 350  
 Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ile Pro Pro Gly

ES 2 668 448 T3

		355					360				365				
Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Gly	Asn	Thr	Asn
	370					375					380				
Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp	Lys	Glu	Asp	Ala
385					390					395					400
Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	Trp	Gln	Ala	Leu	Tyr	Pro
				405					410					415	
Arg	Val	Ala	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	Arg	Glu	Val	Glu	
			420				425					430			
Arg	Pro	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala	Thr	Gly	Val	Arg
		435					440					445			
Leu	Asp	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Glu	Val	Ala	Phe	Glu
	450					455					460				
Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Val	His	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Pro	Phe
465					470					475					480
Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Asp	Glu	Leu
				485					490				495		
Gly	Leu	Pro	Pro	Ile	Gly	Lys	Thr	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser	Thr
			500					505					510		
Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Val	Gly
		515					520						525		
Arg	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile
	530					535						540			
Asp	Pro	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	His	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Leu	His	Thr
545					550					555					560
Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
				565					570					575	
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Thr	Pro	Leu	Gly	Gln	Arg	Ile
			580					585					590		
Arg	Lys	Ala	Phe	Ile	Ala	Glu	Glu	Gly	His	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Asp
		595					600					605			
Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu
	610					615						620			
Asn	Leu	Ile	Arg	Val	Phe	Arg	Glu	Gly	Lys	Asp	Ile	His	Thr	Glu	Thr
625					630					635					640
Ala	Ala	Trp	Met	Phe	Gly	Val	Pro	Pro	Glu	Gly	Val	Asp	Gly	Ala	Met
				645					650					655	
Arg	Arg	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Met	Ser
				660				665					670		
Ala	His	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Ala
		675					680						685		
Ala	Phe	Ile	Glu	Arg	Tyr	Phe	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys	Val	Arg	Ala	Trp
	690					695					700				
Ile	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Glu	Thr
705					710					715					720
Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Val	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Arg	Val	Lys
				725					730					735	
Ser	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Met	Ala	Phe	Asn	Met	Pro	Val	Gln
			740					745					750		
Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Met	Val	Lys	Leu	Phe	Pro
		755					760					765			
Arg	Leu	Arg	Pro	Leu	Gly	Val	Arg	Ile	Leu	Leu	Gln	Val	His	Asp	Glu
	770					775					780				
Leu	Val	Leu	Glu	Ala	Pro	Lys	Ala	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Gln	Leu
785					790					795					800
Ala	Lys	Glu	Thr	Met	Glu	Gly	Val	Tyr	Pro	Leu	Ser	Val	Pro	Leu	Glu
				805					810					815	
Val	Glu	Val	Gly	Met	Gly	Glu	Asp	Trp	Leu	Ser	Ala	Lys	Ala		
			820					825					830		

<210> 6

<211> 834

5 <212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<220>

ES 2 668 448 T3

<223> ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

<400> 6

Met	Glu	Ala	Met	Leu	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gly	Arg	Val	Leu	Leu
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	His	His	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Leu	Lys	Gly
			20					25					30		
Leu	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Ala
		35					40					45			
Lys	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe
	50				55						60				
Val	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	His	Glu	Ala	Tyr	Glu
65				70					75						80
Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln
				85					90					95	
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Leu
			100					105					110		
Glu	Val	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys
		115					120					125			
Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg
	130					135					140				
Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
145				150						155					160
Gly	His	Leu	Ile	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Arg
			165						170					175	
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
		180						185					190		
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu
		195					200					205			
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg
	210					215					220				
Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
225				230						235					240
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu
			245						250					255	
Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
			260					265					270		
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
	275						280					285			
Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro
	290					295					300				
Glu	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp
305				310						315					320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp	Gly	Arg	Val	His	Arg
			325						330					335	
Ala	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Gly
		340						345					350		
Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu	Gly	Leu	Asp
		355					360					365			
Leu	Val	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro
	370					375					380				
Ser	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp
385				390						395					400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	His	Arg
			405						410					415	
Asn	Leu	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Lys	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr
			420					425					430		
His	Glu	Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala
		435					440					445			
Thr	Gly	Val	Arg	Arg	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Glu
	450					455					460				
Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Ala
465				470						475					480
Gly	His	Pro	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu
				485					490					495	
Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly
			500					505					510		

ES 2 668 448 T3

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
 515 520 525  
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
 530 535 540  
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
 545 550 555 560  
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu  
 580 585 590  
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
 595 600 605  
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
 610 615 620  
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
 625 630 635 640  
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val  
 645 650 655  
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
 660 665 670  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 680 685  
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 695 700  
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 730 735  
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 740 745 750  
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 755 760 765  
 Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 775 780  
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
 785 790 795 800  
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
 805 810 815  
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
 820 825 830  
 Lys Gly

<210> 7  
 <211> 834  
 <212> PRT  
 <213> *Thermus caldophilus*

<220>  
 <223> ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

<400> 7  
 Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60  
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
 85 90 95  
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu

ES 2 668 448 T3

			100					105				110			
Glu	Val	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys
		115					120					125			
Asn	Pro	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg
	130					135					140				
Asp	Leu	Asp	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
145					150					155					160
Gly	His	Leu	Ile	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	Gln	Lys	Tyr	Gly	Leu	Lys
			165						170					175	
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
		180						185					190		
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu
		195					200					205			
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg
	210					215					220				
Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
225					230					235					240
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu
			245						250					255	
Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
			260					265					270		
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
		275					280					285			
Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro
	290					295					300				
Glu	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp
305					310					315					320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp	Gly	Arg	Val	His	Arg
			325						330					335	
Ala	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Gly
			340					345					350		
Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu	Gly	Leu	Asp
		355					360					365			
Leu	Val	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro
	370					375					380				
Ser	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp
385					390					395					400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	His	Arg
			405					410						415	
Asn	Leu	Leu	Lys	Arg	Leu	Gln	Gly	Glu	Glu	Lys	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr
			420					425					430		
His	Glu	Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala
		435					440					445			
Thr	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Glu
	450					455					460				
Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Ala
465					470					475					480
Gly	His	Pro	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu
			485						490					495	
Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly
			500					505					510		
Lys	Arg	Ser	Thr	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Ala	His
		515					520					525			
Pro	Ile	Val	Glu	Lys	Ile	Leu	Gln	His	Arg	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys
	530					535					540				
Asn	Thr	Tyr	Val	Asp	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Val	His	Pro	Asn	Thr	Gly
545					550					555					560
Arg	Leu	His	Thr	Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu
			565						570					575	
Ser	Ser	Ser	Asp	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Thr	Pro	Leu
			580					585					590		
Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe	Val	Ala	Glu	Ala	Gly	Trp	Ala	Leu
		595					600					605			
Val	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	Leu
	610					615					620				
Ser	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ile	Arg	Val	Phe	Gln	Glu	Gly	Lys	Asp	Ile

ES 2 668 448 T3

625 His Thr Gln Thr Ala 630 Ser Trp Met Phe Gly 635 Val Pro Pro Glu Ala 640  
 645 Arg Arg Ala Ala Lys 650 Thr Val Asn Phe Gly 655 Val Leu  
 Asp Pro Leu Met 660 Arg Arg Ala Ala Lys 665 Thr Val Asn Phe Gly 670 Val Leu  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
 675 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
 690 Val Arg Ala Trp Ile Glu 695 Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
 705 Tyr Val Glu Thr Leu Phe 710 Lys Thr Leu Glu Glu Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
 725 Ala Arg Val Lys 740 Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
 Met Pro Val 755 Gln Gly Thr Ala Ala 760 Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
 Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg 775 Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
 770 Val His Asp Glu Leu Leu 790 Leu Glu Ala Pro Gln Ala Gly Ala Glu Glu  
 785 Val Ala Ala Leu Ala 805 Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met 825 Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
 820 Lys Gly 830

- <210> 8
- <211> 20
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> motivo de ADN polimerasa sintético
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)...(1)
- <223> Xaa = Leu o Ile
- 15
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)...(2)
- <223> Xaa = Val, Leu, Ile o Phe
- 20
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa = Ala, Val, Ser o Gly
- 25
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)...(4)
- <223> Xaa = Leu o Ala
- 30
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (9)...(9)
- <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Ile, Lys, Asn, Gln o Thr
- 35
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (13)...(13)
- <223> Xaa = Val, Ile o Leu
- 40

ES 2 668 448 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (17)...(17)  
 <223> Xaa = Leu, Val o Ile  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (18)...(18)  
 <223> Xaa = Ser o Ala  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (19)...(19)  
 <223> Xaa = Gly, Lys, Asp o Glu  
 15  
 <400> 8  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Ser Gln Xaa Glu Leu Arg Xaa Leu Ala His  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Asp  
 20  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> motivo de ADN polimerasa sintético  
 25  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)...(3)  
 <223> Xaa = Ala o Val  
 30  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Ile, Lys, Asn, Gln o Thr  
 35  
 <400> 9  
 Leu Val Xaa Leu Asp Tyr Ser Gln Xaa Glu Leu Arg Val Leu Ala His  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Gly Asp  
 20  
 40  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> motivo de ADN polimerasa sintético  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)...(9)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Ile, Lys, Asn, Gln o Thr  
 50  
 <400> 10  
 Leu Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Xaa Glu Leu Arg Val Leu Ala His  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Gly Asp  
 20  
 55  
 <210> 11

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> motivo de ADN polimerasa sintético

<400> 11  
 Leu Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Met Glu Leu Arg Val Leu Ala His  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Gly Asp  
 20

10 <210> 12  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (Z05)

<400> 12  
 Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu Val Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe  
 35

20 <210> 13  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

30 <400> 13  
 Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe  
 35

35 <210> 14  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)

<400> 14  
 Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe  
 35

45 <210> 15  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



ES 2 668 448 T3

<220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

5 <400> 15  
 Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe  
 35

<210> 16  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus sp. sps17* (Sps17)

15 <400> 16  
 Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe  
 35

20 <210> 17  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

<400> 17  
 Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu Val Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe  
 35

30 <210> 18  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

<400> 18  
 Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu Val Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe

40 <210> 19  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)

ES 2 668 448 T3

<400> 19  
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 20 25 30  
 Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe  
 35

5 <210> 20  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

<400> 20  
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asp Trp Trp Ile Val Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 20 25 30  
 Glu Asn Leu Val Lys Ala Phe  
 35

15 <210> 21  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

<400> 21  
 Arg Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Val Ser Lys Asp  
 20 25 30  
 Glu Asn Leu Leu Lys Ala Phe  
 35

25 <210> 22  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> motivo A del sitio activo de ADN polimerasa conservado sintético

35 <400> 22  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg  
 1 5

40 <210> 23  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

<400> 23

ES 2 668 448 T3

Arg Lys Gly Phe Ile Ala Glu Asp Gly Phe Thr Leu Ile Ala Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Leu Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Pro  
 20 25 30  
 Leu Met Gln Gln Ala Phe  
 35

5 <210> 24  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)

<400> 24  
 Arg Gln Ala Phe Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp  
 20 25 30  
 Asp Asn Leu Ile Glu Ala Phe  
 35

15 <210> 25  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> región del dominio de polimerasa sintético de ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)

<400> 25  
 Arg Gln Ala Phe Val Pro Ser Glu Ser Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp  
 20 25 30  
 Asp Asn Leu Met Glu Ala Phe  
 35

25 <210> 26  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> motivo consenso natural de la región del dominio de polimerasa sintético

35 <220>  
 <221> VARIANTE

<222> (1)...(1)  
 <223> Xaa = Leu o Ile

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)...(2)  
 <223> Xaa = Val, Leu, Ile o Phe

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)...(3)  
 <223> Xaa = Ala, Val, Ser o Gly

50 <220>  
 <221> VARIANTE

<222> (4)...(4)  
 <223> Xaa = Leu o Ala

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (13)...(13)  
 <223> Xaa = Val, Ile o Leu

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (17)...(17)  
 <223> Xaa = Leu, Val o Ile

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (18)...(18)  
 <223> Xaa = Ser o Ala

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (19)...(19)  
 <223> Xaa = Gly, Lys, Asp o Glu

<400> 26  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Xaa Leu Ala His  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Asp  
 20

25 <210> 27  
 <211> 893  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADN polimerasa quimérica sintética CS5 derivada del dominio de 5'-nucleasa del extremo N de *Thermus sp.* Z05 y los dominios de 3'-5' exonucleasa y polimerasa del extremo C de ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*

35 <400> 27  
 Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60  
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu

ES 2 668 448 T3

65	Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln
					85					90					95	
	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Leu
				100					105					110		
	Glu	Val	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys
			115					120					125			
	Lys	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg
		130					135					140				
	Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
		145				150					155					160
	Gly	His	Leu	Ile	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Lys
				165						170					175	
	Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
			180						185					190		
	Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu
			195					200					205			
	Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg
		210					215					220				
	Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
		225				230					235					240
	Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu
				245						250					255	
	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
			260						265					270		
	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
		275						280					285			
	Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	Asp	Leu
		290				295						300				
	Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe
		305				310					315					320
	Ala	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asp	Cys	Asp	Ile
				325						330					335	
	Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro
			340						345					350		
	Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Lys
		355						360					365			
	Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Val	Gly	Gln
		370					375					380				
	Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Pro
		385				390					395					400
	Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Pro
				405					410						415	
	Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly
			420						425					430		
	Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Pro	Leu
		435						440					445			
	Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Ala	Asn	Tyr
		450				455					460					
	Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser
		465				470					475					480
	Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	Ile	Glu
				485						490					495	
	Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Tyr
			500						505					510		
	Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys
			515					520					525			
	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe
		530					535					540				
	Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu
		545				550					555					560
	Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr
				565						570					575	
	Arg	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Gly	Glu	His	Glu	Ile	Ile	Pro
			580						585					590		
	Leu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile

ES 2 668 448 T3

	595					600					605				
Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Met	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Ile	His	Ala
	610					615					620				
Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
	625				630					635					640
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile
				645					650					655	
Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Pro	Asn	Trp	Trp	Ile	Val	Ser	Ala
			660					665					670		
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp
		675					680					685			
Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	His	Thr	Leu
	690					695					700				
Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Glu
	705				710					715					720
Met	Arg	Arg	Ala	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val
				725					730					735	
Thr	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Lys	Glu	Ala
			740					745					750		
Glu	Lys	Met	Ile	Val	Asn	Tyr	Phe	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Asp
		755					760					765			
Tyr	Ile	Gln	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg
	770					775					780				
Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Lys	Arg	Asp	Ile	Pro	Gln	Leu	Met	Ala	Arg	Asp
	785				790					795					800
Arg	Asn	Thr	Gln	Ala	Glu	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Thr	Pro	Ile
				805					810					815	
Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Glu	Ile	Asp
			820					825					830		
Arg	Glu	Leu	Lys	Glu	Arg	Lys	Met	Arg	Ser	Lys	Met	Ile	Ile	Gln	Val
		835					840					845			
His	Asp	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Pro	Asn	Glu	Glu	Lys	Asp	Ala	Leu
	850				855						860				
Val	Glu	Leu	Val	Lys	Asp	Arg	Met	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Val
	865				870				875						880
Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Gly	Lys	Thr	Trp	Ser			
				885					890						

<210> 28  
 <211> 893  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADN polimerasa quimérica sintética CS6 derivada del dominio de 5'-nucleasa del extremo N de *Thermus sp.* Z05 y los dominios de 3'-5' exonucleasa y polimerasa del extremo C de ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*

<400> 28  
 Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
 20 25 30  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
 50 55 60  
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
 85 90 95  
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
 100 105 110

ES 2 668 448 T3

Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
 115 120 125  
 Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
 130 135 140  
 Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
 145 150 155  
 Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
 165 170 175  
 Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
 180 185 190  
 Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
 195 200 205  
 Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
 210 215 220  
 Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
 245 250 255  
 Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
 260 265 270  
 Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
 275 280 285  
 Leu Leu Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu  
 290 295 300  
 Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe  
 305 310 315 320  
 Ala Ile Ala Leu Ala Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile  
 325 330 335  
 Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350  
 Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys  
 355 360 365  
 Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln  
 370 375 380  
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro  
 385 390 395 400  
 Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro  
 405 410 415  
 Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly  
 420 425 430  
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu  
 435 440 445  
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr  
 450 455 460  
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu  
 485 490 495  
 Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
 500 505 510  
 Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys  
 515 520 525  
 Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe  
 530 535 540  
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
 545 550 555 560  
 Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr  
 565 570 575  
 Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro  
 580 585 590  
 Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 595 600 605  
 Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala  
 610 615 620  
 Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 625 630 635 640

Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile  
 645 650 655  
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
 660 665 670  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 675 680 685  
 Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu  
 690 695 700  
 Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu  
 705 710 715 720  
 Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val  
 725 730 735  
 Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala  
 740 745 750  
 Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp  
 755 760 765  
 Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg  
 770 775 780  
 Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile  
 805 810 815  
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp  
 820 825 830  
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Gln Val  
 835 840 845  
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu  
 850 855 860  
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val  
 865 870 875 880  
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser  
 885 890

- <210> 29
- <211> 19
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> motivo de ADN polimerasa sintético
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)...(1)
- 15 <223> Xaa = Ala, Asp, Ser, Glu, Arg o Gln
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)...(2)
- 20 <223> Xaa = Trp o Tyr
  
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Ile, Leu o Met
  
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)...(4)
- <223> Xaa = Glu, Ala, Gln, Lys, Asn o Asp
  
- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (5)...(5)
- <223> Xaa = Lys, Gly, Arg, Gln, His o Asn
  
- 35 <220>



- <221> VARIANTE
- <222> (6)...(6)
- <223> Xaa = Thr, Val, Met o Ile
  
- 5 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (7)...(7)
- <223> Xaa = Leu, Val o Lys
  
- 10 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)...(8)
- <223> Xaa = Glu, Ser, Ala, Asp o Gln
  
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (9)...(9)
- <223> Xaa = Glu o Phe
  
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (10)...(10)
- <223> Xaa = Gly o Ala
  
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (11)...(11)
- <223> Xaa = Arg o Lys
  
- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (12)...(12)
- <223> Xaa = Lys, Arg, Glu, Thr o Gln
  
- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (13)...(13)
- <223> Xaa = Arg, Lys o His
  
- 40 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (17)...(17)
- <223> Xaa = Glu, Arg o Thr
  
- 45 <400> 29
- Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Val
- 1 5 10 15
- Xaa Thr Leu
  
- <210> 30
- <211> 21
- 50 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> cebador directo de amplificación por PCR propensa a errores (mutagénica) sintético
- 55 <400> 30
- ctacctcctg gaccctcca a 21
  
- <210> 31
- 60 <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso de amplificación por PCR propensa a errores (mutagénica) sintético

<400> 31

ataaccaact ggtagtggcg tgtaa

25

5

<210> 32

<211> 921

<212> PRT

<213> *Deinococcus radiodurans*

10

<220>

<223> ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

<400> 32

Met	Ala	Asp	Ala	Ser	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Pro	Asp	Ala	Leu	Val	Leu
1				5					10					15	
Ile	Asp	Gly	His	Ala	Leu	Ala	Phe	Arg	Ser	Tyr	Phe	Ala	Leu	Pro	Pro
			20					25					30		
Leu	Asn	Asn	Ser	Lys	Gly	Glu	Met	Thr	Asp	Ala	Ile	Val	Gly	Phe	Met
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Arg	Gln	Lys	Ser	Asn	Gln	Val	Ile	Val
	50					55					60				
Val	Phe	Asp	Pro	Pro	Val	Lys	Thr	Leu	Arg	His	Glu	Gln	Tyr	Glu	Gly
65					70					75				80	
Tyr	Lys	Ser	Gly	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Arg	Gly	Gln	Ile
				85				90						95	
Asn	Arg	Ile	Arg	Ala	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu
			100					105					110		
Glu	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Arg	Met
		115					120					125			
Ala	Glu	Gly	Lys	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Val	Thr	Ser	Asp	Arg	Asp
	130					135				140					
Ala	Tyr	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	His	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Asn	Asp	Phe
145					150					155					160
Ser	Leu	Ile	Gly	Pro	Ala	Gln	Val	Glu	Glu	Lys	Tyr	Gly	Val	Thr	Val
				165				170						175	
Arg	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Ser	Asp	Asn
			180					185					190		
Ile	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Ile	Gly	Pro	Lys	Thr	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu
		195					200					205			
Gln	Glu	Tyr	Gly	Thr	Leu	Glu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	His	Ala	Gly
	210					215					220				
Thr	Leu	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu
225					230					235					240
Asn	Val	Lys	Phe	Ser	His	Asp	Leu	Ser	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Leu	Pro
				245					250					255	
Leu	Asp	Ile	Glu	Phe	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Pro	Asp	Asn	Pro	Leu	Val
			260					265					270		
Thr	Glu	Asp	Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	His	Ser	Leu	Arg	Pro	Met
		275					280					285			
Ile	Leu	Gly	Leu	Asn	Gly	Pro	Glu	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Pro	Asp	Asp
	290					295					300				
Leu	Leu	Glu	Arg	Glu	His	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala
305					310					315					320
Ala	Leu	Pro	Ala	Phe	Ser	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Glu	Trp	Gln	Thr	Pro
				325					330					335	
Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Trp	Gly	Tyr	Val	Leu	Ser	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu
			340					345					350		
Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Gly	Val	Ala	Arg
		355					360					365			
Pro	Ala	Arg	Val	Ser	Glu	Pro	Asp	Glu	Trp	Ala	Gln	Ala	Glu	Ala	Pro
	370					375					380				
Glu	Asn	Leu	Phe	Gly	Glu	Leu	Leu	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Leu	Thr	Lys
385					390					395					400

15

ES 2 668 448 T3

Lys Glu Gln Lys Ala Leu Glu Lys Ala Gln Lys Asp Ala Glu Lys Ala  
 405 410 415  
 Arg Ala Lys Leu Arg Glu Gln Phe Pro Ala Thr Val Asp Glu Ala Glu  
 420 425 430  
 Phe Val Gly Gln Arg Thr Val Thr Ala Ala Ala Ala Lys Ala Leu Ala  
 435 440 445  
 Ala His Leu Ser Val Arg Gly Thr Val Val Glu Pro Gly Asp Asp Pro  
 450 455 460  
 Leu Leu Tyr Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ala Asn Thr Asn Met Pro Val  
 465 470 475 480  
 Val Ala Lys Arg Tyr Leu Asp Arg Glu Trp Pro Ala Asp Ala Pro Thr  
 485 490 495  
 Arg Ala Ala Ile Thr Gly His Leu Val Arg Glu Leu Pro Pro Leu Leu  
 500 505 510  
 Asp Asp Ala Arg Arg Lys Met Tyr Asp Glu Met Glu Lys Pro Leu Ser  
 515 520 525  
 Gly Val Leu Gly Arg Met Glu Val Arg Gly Val Gln Val Asp Ser Asp  
 530 535 540  
 Phe Leu Gln Thr Leu Ser Ile Gln Ala Gly Val Arg Leu Ala Asp Leu  
 545 550 555 560  
 Glu Ser Gln Ile His Glu Tyr Ala Gly Glu Glu Phe His Ile Arg Ser  
 565 570 575  
 Pro Lys Gln Leu Glu Thr Val Leu Tyr Asp Lys Leu Glu Leu Ala Ser  
 580 585 590  
 Ser Lys Lys Thr Lys Leu Thr Gly Gln Arg Ser Thr Ala Val Ser Ala  
 595 600 605  
 Leu Glu Pro Leu Arg Asp Ala His Pro Ile Ile Pro Leu Val Leu Glu  
 610 615 620  
 Phe Arg Glu Leu Asp Lys Leu Arg Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Ile Pro  
 625 630 635 640  
 Asn Leu Val Asn Pro His Thr Gly Arg Leu His Thr Thr Phe Ala Gln  
 645 650 655  
  
 Thr Ala Val Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Leu Asn Pro Asn Leu Gln  
 660 665 670  
 Asn Ile Pro Ile Arg Ser Glu Leu Gly Arg Glu Ile Arg Lys Gly Phe  
 675 680 685  
 Ile Ala Glu Asp Gly Phe Thr Leu Ile Ala Ala Asp Tyr Ser Gln Ile  
 690 695 700  
 Glu Leu Arg Leu Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Pro Leu Met Gln Gln  
 705 710 715 720  
 Ala Phe Val Glu Gly Ala Asp Ile His Arg Arg Thr Ala Ala Gln Val  
 725 730 735  
 Leu Gly Leu Asp Glu Ala Thr Val Asp Ala Asn Gln Arg Arg Ala Ala  
 740 745 750  
 Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu  
 755 760 765  
 Ser Asn Asp Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Glu Ala Ala Thr Phe Ile Glu  
 770 775 780  
 Ile Tyr Phe Ala Thr Tyr Pro Gly Ile Arg Arg Tyr Ile Asn His Thr  
 785 790 795 800  
 Leu Asp Phe Gly Arg Thr His Gly Tyr Val Glu Thr Leu Tyr Gly Arg  
 805 810 815  
 Arg Arg Tyr Val Pro Gly Leu Ser Ser Arg Asn Arg Val Gln Arg Glu  
 820 825 830  
 Ala Glu Glu Arg Leu Ala Tyr Asn Met Pro Ile Gln Gly Thr Ala Ala  
 835 840 845  
 Asp Ile Met Lys Leu Ala Met Val Gln Leu Asp Pro Gln Leu Asp Ala  
 850 855 860  
 Ile Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu Leu Ile Glu  
 865 870 875 880  
 Ala Pro Leu Asp Lys Ala Glu Gln Val Ala Ala Leu Thr Lys Lys Val  
 885 890 895  
 Met Glu Asn Val Val Gln Leu Lys Val Pro Leu Ala Val Glu Val Gly  
 900 905 910  
 Thr Gly Pro Asn Trp Phe Asp Thr Lys  
 915 920

<210> 33  
 <211> 892  
 <212> PRT  
 <213> *Thermosipho africanus*

5

<220>  
 <223> ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

<400> 33  
 Met Gly Lys Met Phe Leu Phe Asp Gly Thr Gly Leu Val Tyr Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Tyr Ala Ile Asp Gln Ser Leu Gln Thr Ser Ser Gly Leu His Thr  
 20 25 30  
 Asn Ala Val Tyr Gly Leu Thr Lys Met Leu Ile Lys Phe Leu Lys Glu  
 35 40 45  
 His Ile Ser Ile Gly Lys Asp Ala Cys Val Phe Val Leu Asp Ser Lys  
 50 55 60  
 Gly Gly Ser Lys Lys Arg Lys Asp Ile Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Asn  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Ser Thr Pro Asp Leu Leu Leu Glu Gln Ile Pro Tyr Val Glu  
 85 90 95  
 Glu Leu Val Asp Ala Leu Gly Ile Lys Val Leu Lys Ile Glu Gly Phe  
 100 105 110  
 Glu Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ser Lys Lys Phe Glu Ser Asp  
 115 120 125  
 Phe Glu Lys Val Asn Ile Ile Thr Gly Asp Lys Asp Leu Leu Gln Leu  
 130 135 140  
 Val Ser Asp Lys Val Phe Val Trp Arg Val Glu Arg Gly Ile Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Leu Val Leu Tyr Asp Arg Asn Lys Val Ile Glu Lys Tyr Gly Ile Tyr  
 165 170 175  
 Pro Glu Gln Phe Lys Asp Tyr Leu Ser Leu Val Gly Asp Gln Ile Asp  
 180 185 190  
 Asn Ile Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Lys Lys Thr Ala Val Ser Leu  
 195 200 205  
 Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Leu Glu Asn Val Leu Lys Asn Ile Asn Leu  
 210 215 220  
 Leu Thr Glu Lys Leu Arg Arg Leu Leu Glu Asp Ser Lys Glu Asp Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Lys Ser Ile Glu Leu Val Glu Leu Ile Tyr Asp Val Pro Met Asp  
 245 250 255  
 Val Glu Lys Asp Glu Ile Ile Tyr Arg Gly Tyr Asn Pro Asp Lys Leu  
 260 265 270  
 Leu Lys Val Leu Lys Lys Tyr Glu Phe Ser Ser Ile Ile Lys Glu Leu  
 275 280 285  
 Asn Leu Gln Glu Lys Leu Glu Lys Glu Tyr Ile Leu Val Asp Asn Glu  
 290 295 300  
 Asp Lys Leu Lys Lys Leu Ala Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Lys Thr Phe  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Asp Thr Glu Thr Thr Ser Leu Asp Pro Phe Glu Ala Lys Leu  
 325 330 335  
 Val Gly Ile Ser Ile Ser Thr Met Glu Gly Lys Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350  
 Val Ser His Phe Gly Ala Lys Asn Ile Ser Lys Ser Leu Ile Asp Lys  
 355 360 365  
 Phe Leu Lys Gln Ile Leu Gln Glu Lys Asp Tyr Asn Ile Val Gly Gln  
 370 375 380  
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Glu Ile Phe Lys Ser Met Gly Phe Ser Pro  
 385 390 395 400  
 Asn Val Pro His Phe Asp Thr Met Ile Ala Tyr Leu Leu Asn Pro  
 405 410 415  
 Asp Glu Lys Arg Phe Asn Leu Glu Glu Leu Ser Leu Lys Tyr Leu Gly  
 420 425 430  
 Tyr Lys Met Ile Ser Phe Asp Glu Leu Val Asn Glu Asn Val Pro Leu  
 435 440 445

10

ES 2 668 448 T3

Phe Gly Asn Asp Phe Ser Tyr Val Pro Leu Glu Arg Ala Val Glu Tyr  
 450 455 460  
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Val Thr Tyr Arg Ile Phe Arg Lys Leu Gly  
 465 470 475  
 Arg Lys Ile Tyr Glu Asn Glu Met Glu Lys Leu Phe Tyr Glu Ile Glu  
 485 490 495  
 Met Pro Leu Ile Asp Val Leu Ser Glu Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
 500 505 510  
 Phe Asp Glu Glu Tyr Leu Lys Glu Leu Ser Lys Lys Tyr Gln Glu Lys  
 515 520 525  
 Met Asp Gly Ile Lys Glu Lys Val Phe Glu Ile Ala Gly Glu Thr Phe  
 530 535 540  
 Asn Leu Asn Ser Ser Thr Gln Val Ala Tyr Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
 545 550 555 560  
 Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Lys Thr Ala Thr Gly Lys Phe Ser Thr Asn  
 565 570 575  
 Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu Ser Lys Glu His Glu Ile Ala Lys Leu  
 580 585 590  
 Leu Leu Glu Tyr Arg Lys Tyr Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp  
 595 600 605  
  
 Ser Ile Pro Leu Ser Ile Asn Arg Lys Thr Asn Arg Val His Thr Thr  
 610 615 620  
 Phe His Gln Thr Gly Thr Ser Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asn Pro  
 625 630 635 640  
 Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Arg Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile Arg  
 645 650 655  
 Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Leu Gly Ala Asp  
 660 665 670  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Val Ser Lys Asp Glu  
 675 680 685  
 Asn Leu Leu Lys Ala Phe Lys Glu Asp Leu Asp Ile His Thr Ile Thr  
 690 695 700  
 Ala Ala Lys Ile Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Gln Met  
 705 710 715 720  
 Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ala Ile Ile Tyr Gly Val Ser  
 725 730 735  
 Pro Tyr Gly Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu Thr Lys  
 740 745 750  
 Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr  
 755 760 765  
 Leu Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr  
 770 775 780  
 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Leu Arg Ser Lys Asn Gly  
 785 790 795 800  
 Asn Arg Val Gln Glu Gly Glu Arg Ile Ala Val Asn Thr Pro Ile Gln  
 805 810 815  
 Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ile Ala Met Ile Asn Ile His Asn  
 820 825 830  
 Arg Leu Lys Lys Glu Asn Leu Arg Ser Lys Met Ile Leu Gln Val His  
 835 840 845  
 Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Asn Glu Leu Glu Ile Val Lys  
 850 855 860  
 Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro  
 865 870 875 880  
 Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu  
 885 890

<210> 34  
 <211> 893  
 <212> PRT  
 <213> *Thermotoga maritima*

5

<220>  
 <223> ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)

10

ES 2 668 448 T3

<400> 34

Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr  
 20 25 30  
 Asn Ala Thr Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Arg Phe Ile Lys Asp  
 35 40 45  
 His Ile Ile Val Gly Lys Asp Tyr Val Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys  
 50 55 60  
 Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Gln Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Thr Pro Asp Leu Leu Ile Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Lys  
 85 90 95  
 Leu Val Glu Ala Leu Gly Met Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Tyr Glu  
 100 105 110  
 Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Lys Gly Leu Pro Leu Phe  
 115 120 125  
 Asp Glu Ile Phe Ile Val Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val  
 130 135 140  
 Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Leu Tyr Asp Ala Gln Lys Val Lys Glu Lys Tyr Gly Val Glu Pro  
 165 170 175  
 Gln Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ile Asp Asn  
 180 185 190  
 Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu  
 195 200 205  
 Glu Lys Tyr Lys Asp Leu Glu Asp Ile Leu Asn His Val Arg Glu Leu  
 210 215 220  
 Pro Gln Lys Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Asn Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Leu Ser Lys Lys Leu Ala Ile Leu Glu Thr Asn Val Pro Ile Glu Ile  
 245 250 255  
 Asn Trp Glu Glu Leu Arg Tyr Gln Gly Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Leu  
 260 265 270  
 Pro Leu Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln  
 275 280 285  
 Leu Tyr Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu  
 290 295 300  
 Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe  
 305 310 315 320  
 Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile  
 325 330 335  
 Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro  
 340 345 350  
 Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys  
 355 360 365  
 Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln  
 370 375 380  
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro  
 385 390 395 400  
 Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro  
 405 410 415  
 Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly  
 420 425 430  
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu  
 435 440 445  
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr  
 450 455 460  
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu  
 485 490 495  
 Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
 500 505 510  
 Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys  
 515 520 525

ES 2 668 448 T3

Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe  
 530 535  
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
 545 550  
 Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr  
 565 570  
 Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro  
 580 585 590

Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 595 600  
 Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala  
 610 615 620  
 Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 625 630 635 640  
 Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile  
 645 650 655  
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
 660 665 670  
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
 675 680 685  
 Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val His Thr Leu  
 690 695 700  
 Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu  
 705 710 715 720  
 Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val  
 725 730 735  
 Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala  
 740 745 750  
 Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp  
 755 760 765  
 Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg  
 770 775 780  
 Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile  
 805 810 815  
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp  
 820 825 830  
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val  
 835 840 845  
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu  
 850 855 860  
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val  
 865 870 875 880  
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser  
 885 890

<210> 35

<211> 893

5 <212> PRT

<213> *Thermotoga neopolitana*

<220>

<223> ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

10

<400> 35

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

ES 2 668 448 T3

65					70					75				80	
Pro	Lys	Thr	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Gln	Gln	Leu	Pro	Tyr	Ile	Lys	Arg
				85					90					95	
Leu	Ile	Glu	Ala	Leu	Gly	Phe	Lys	Val	Leu	Glu	Leu	Glu	Gly	Tyr	Glu
			100					105					110		
Ala	Asp	Asp	Ile	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Ala	Arg	Phe	Leu
		115					120					125			
Met	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Asp	Lys	Asp	Met	Leu	Gln	Leu	Val
	130					135					140				
Asn	Glu	Lys	Ile	Lys	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Lys	Gly	Ile	Ser	Asp	Leu
145				150						155				160	
Glu	Leu	Tyr	Asp	Ser	Lys	Lys	Val	Lys	Glu	Arg	Tyr	Gly	Val	Glu	Pro
				165					170					175	
His	Gln	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Asp	Ile	Asp	Asn
			180					185					190		
Ile	Pro	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Gln	Leu	Leu
		195					200					205			
Gly	Lys	Tyr	Arg	Asn	Leu	Glu	Tyr	Ile	Leu	Glu	His	Ala	Arg	Glu	Leu
	210					215					220				
Pro	Gln	Arg	Val	Arg	Lys	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Arg	Glu	Val	Ala	Ile
225					230					235				240	
Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Thr	Asn	Ala	Pro	Val	Glu	Val
				245					250					255	
Asp	Trp	Glu	Glu	Met	Lys	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Asp	Lys	Arg	Lys	Leu	Leu
			260					265					270		
Pro	Ile	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Phe	Ala	Ser	Ile	Met	Lys	Glu	Leu	Gln
		275					280					285			
Leu	Tyr	Glu	Glu	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Tyr	Glu	Ile	Val	Lys	Asp	His
	290					295					300				
Lys	Thr	Phe	Glu	Asp	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Pro	Ser	Phe
305					310					315				320	
Ala	Leu	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asn	Cys	Glu	Ile
				325					330					335	
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro
			340					345					350		
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	His	Asn	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu	Val	Leu	Ser
		355					360					365			
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser	Lys	Ile	Val	Gly	Gln
	370					375					380				
Asn	Leu	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Ile	Ser	Pro
385					390					395				400	
Val	Tyr	Pro	His	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Pro
				405					410					415	
Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	Ser	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly
			420					425					430		
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Ser	Pro	Leu
		435					440						445		
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Tyr
	450					455					460				
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Ile	Leu	Ser
465					470					475				480	
Met	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Glu	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Ile	Glu
				485					490					495	
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Phe	Asn	Trp	Val	Tyr
			500					505					510		
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys
		515					520						525		
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Tyr	Gln	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe
	530					535					540				
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Asn	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu
545					550					555				560	
Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr
				565					570					575	
Arg	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Asn	Glu	His	Glu	Ile	Val	Pro
			580					585					590		
Leu	Ile	Leu	Glu	Phe	Arg	Lys	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile



ES 2 668 448 T3

		595					600					605				
Asp	Thr	Leu	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Phe	His	Ala	
	610					615					620					
Ser	Phe	His	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp	
625					630					635					640	
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile	
				645					650					655		
Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Pro	Asp	Trp	Trp	Ile	Val	Ser	Ala	
			660					665					670			
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp	
		675					680					685				
Glu	Asn	Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	His	Thr	Leu	
	690					695					700					
Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Asn	Glu	Glu	
705					710					715					720	
Met	Arg	Arg	Val	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	
				725					730					735		
Thr	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Ile	Pro	Val	Lys	Glu	Ala	
			740					745					750			
Glu	Lys	Met	Ile	Ile	Ser	Tyr	Phe	Thr	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Ser	
		755					760					765				
Tyr	Ile	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg	
	770					775					780					
Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Lys	Arg	Asp	Ile	Pro	Gln	Leu	Met	Ala	Arg	Asp	
785					790					795					800	
Lys	Asn	Thr	Gln	Ser	Glu	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Thr	Pro	Ile	
				805					810					815		
Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Asp	Ile	Asp	
			820					825					830			
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Asn	Met	Lys	Ser	Arg	Met	Ile	Ile	Gln	Val	
		835					840					845				
His	Asp	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Pro	Asp	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu	
	850				855					860						
Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asn	Lys	Met	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Val	
865					870					875					880	
Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Gly	Lys	Ser	Trp	Ser				
				885					890							

<210> 36  
 <211> 876  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus stearothermophilus*

5

<220>  
 <223> ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)

10

<400>	36																
Met	Lys	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Val	Ala	Tyr	Arg		
1				5					10					15			
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Asn	Asp	Lys	Gly	Ile	His	Thr		
			20					25					30				
Asn	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Thr	Met	Met	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu		
		35					40					45					
Glu	Gln	Pro	Thr	His	Ile	Leu	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr		
	50					55					60						
Phe	Arg	His	Glu	Thr	Phe	Gln	Asp	Tyr	Lys	Gly	Gly	Arg	Gln	Gln	Thr		
65					70					75					80		
Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Phe	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Lys		
				85					90					95			
Ala	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Tyr	Glu	Leu	Asp	His	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp		
			100					105					110				
Ile	Ile	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Ala	Val		
		115					120					125					
Lys	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Gln		
	130					135					140						
Val	Thr	Val	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Tyr		

ES 2 668 448 T3

145	Thr	Pro	Glu	Thr	Val	150	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	155	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	160	Ile
	Val	Asp	Leu	Lys	165	Gly	Leu	Met	Gly	Asp	170	Lys	Ser	Asp	Asn	Ile	175	Pro	Gly
	Val	Pro	Gly	Ile	180	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	185	Val	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	190	Phe
	Gly	Thr	Val	Glu	Asn	195	Val	Leu	Ala	Ser	200	Ile	Asp	Glu	Ile	Lys	Gly	205	Glu
	Lys	Leu	Lys	Glu	Asn	210	Leu	Arg	Gln	Tyr	215	Arg	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	220	Ser
	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	225	Ile	Cys	Arg	Asp	230	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	235	Leu
	Asp	Asp	Ile	Val	Tyr	245	Lys	Gly	Glu	Asp	250	Arg	Glu	Lys	Val	Val	Ala	255	Leu
	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	260	Phe	Gln	Ser	Phe	265	Leu	Asp	Lys	Met	Ala	Val	270	Gln
	Thr	Asp	Glu	Gly	Glu	275	Lys	Pro	Leu	Ala	280	Gly	Met	Asp	Phe	Ala	Ile	285	Ala
	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	290	Glu	Met	Leu	Ala	295	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	300	Val
	Glu	Val	Val	Gly	Asp	305	Asn	Tyr	His	His	310	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	315	Ala
	Leu	Ala	Asn	Glu	Arg	325	Gly	Arg	Phe	Phe	330	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	335	Leu
	Ala	Asp	Pro	Lys	Phe	340	Leu	Ala	Trp	Leu	345	Gly	Asp	Glu	Thr	Lys	Lys	350	Lys
	Thr	Met	Phe	Asp	Ser	355	Lys	Arg	Ala	Ala	360	Val	Ala	Leu	Lys	Trp	Lys	365	Gly
	Ile	Glu	Leu	Arg	Gly	370	Val	Val	Phe	Asp	375	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	380	Leu
	Leu	Asp	Pro	Ala	Gln	385	Ala	Ala	Gly	Asp	390	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Lys	395	Met
	His	Gln	Tyr	Glu	Ala	405	Val	Arg	Ser	Asp	410	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	415	Gly
	Ala	Lys	Arg	Thr	Val	420	Pro	Asp	Glu	Pro	425	Thr	Leu	Ala	Glu	His	Leu	430	Ala
	Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	435	Ile	Trp	Ala	Leu	440	Glu	Glu	Pro	Leu	Met	Asp	445	Glu
	Leu	Arg	Arg	Asn	Glu	450	Gln	Asp	Arg	Leu	455	Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	460	Pro
	Leu	Ala	Gly	Ile	Leu	465	Ala	Asn	Met	Glu	470	Phe	Thr	Gly	Val	Lys	Val	475	Asp
	Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	485	Gln	Met	Gly	Ala	490	Glu	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	495	Gln
	Ala	Val	Glu	Arg	Ile	500	Tyr	Glu	Glu	Ala	505	Leu	Ala	Gly	Gln	Glu	Phe	510	Ile
	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	515	Leu	Gly	Thr	Val	520	Leu	Phe	Asp	Lys	Leu	Gln	525	Leu
	Pro	Val	Leu	Lys	Lys	530	Thr	Lys	Thr	Gly	535	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ala	Asp	540	Val
	Leu	Glu	Lys	Leu	Ala	545	Pro	His	His	Glu	550	Ile	Val	Glu	His	Ile	Leu	555	His
	Tyr	Arg	Gln	Leu	Gly	565	Lys	Leu	Gln	Ser	570	Thr	Tyr	Ile	Glu	Gly	Leu	575	Leu
	Lys	Val	Val	His	Pro	580	Val	Thr	Gly	Lys	585	Val	His	Thr	Met	Phe	Asn	590	Gln
	Ala	Leu	Thr	Gln	Thr	595	Gly	Arg	Leu	Ser	600	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Asn	605	Gln
	Asn	Ile	Pro	Ile	Arg	610	Leu	Glu	Glu	Gly	615	Arg	Lys	Ile	Arg	Gln	Ala	620	Phe
	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	625	Asp	Trp	Leu	Ile	630	Phe	Ala	Ala	Asp	Tyr	Ser	635	Gln
	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	645	Leu	Ala	His	Ile	650	Ala	Glu	Asp	Asp	Asn	Leu	655	Ile
	Glu	Ala	Phe	Arg	Arg	660	Gly	Leu	Asp	Ile	665	His	Thr	Lys	Thr	Ala	Met	670	Asp

ES 2 668 448 T3

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

<210> 37

<211> 877

5 <212> PRT

<213> *Bacillus caldotenax*

<220>

<223> ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)

10

<400> 37

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

ES 2 668 448 T3

Asp	Asp	Ile	Ala	245	Tyr	Gln	Gly	Glu	250	Arg	Glu	Lys	Val	255	Val	Ala	Leu	
Phe	Lys	Glu	Leu	260	Gly	Phe	Gln	Ser	265	Phe	Leu	Glu	Lys	270	Met	Glu	Ser	Pro
Ser	Ser	Glu	Glu	275	Glu	Lys	Pro	Leu	280	Ala	Lys	Met	Ala	285	Phe	Thr	Leu	Ala
Asp	Arg	Val	Thr	290	Glu	Glu	Met	Leu	295	Ala	Asp	Lys	Ala	300	Ala	Leu	Val	Val
305	Val	Val	Glu	310	Glu	Asn	Tyr	His	315	Ala	Pro	Ile	Val	320	Gly	Ile	Ala	
Val	Val	Asn	Glu	325	His	Gly	Arg	Phe	330	Phe	Leu	Arg	Pro	335	Glu	Thr	Ala	Leu
Ala	Asp	Pro	Gln	340	Phe	Val	Ala	Trp	345	Leu	Gly	Asp	Glu	350	Thr	Lys	Lys	Lys
Ser	Met	Phe	Asp	355	Ser	Lys	Arg	Ala	360	Ala	Val	Ala	Leu	365	Lys	Trp	Lys	Gly
370	Glu	Leu	Cys	375	Gly	Val	Ser	Phe	380	Asp	Leu	Leu	Leu	385	Ala	Ala	Tyr	Leu
385	Leu	Asp	Pro	390	Gln	Gly	Val	Asp	395	Asp	Val	Ala	Ala	400	Ala	Ala	Lys	Met
Lys	Gln	Tyr	Glu	405	Ala	Val	Arg	Pro	410	Asp	Glu	Ala	Val	415	Tyr	Gly	Lys	Gly
Ala	Lys	Arg	Ala	420	Val	Pro	Asp	Glu	425	Pro	Val	Leu	Ala	430	Glu	His	Leu	Val
Arg	Lys	Ala	Ala	435	Ala	Ile	Trp	Ala	440	Leu	Glu	Arg	Pro	445	Phe	Leu	Asp	Glu
450	Leu	Arg	Arg	455	Asn	Glu	Gln	Asp	460	Arg	Leu	Leu	Val	465	Glu	Leu	Gln	Pro
465	Leu	Ser	Ser	470	Ile	Leu	Ala	Glu	475	Met	Glu	Phe	Ala	480	Gly	Val	Lys	Val
Thr	Lys	Arg	Leu	485	Glu	Gln	Met	Gly	490	Glu	Glu	Leu	Ala	495	Glu	Gln	Leu	Arg
Thr	Val	Glu	Gln	500	Arg	Ile	Tyr	Glu	505	Leu	Ala	Gly	Gln	510	Glu	Phe	Asn	Ile
Asn	Ser	Pro	Lys	515	Gln	Leu	Gly	Val	520	Ile	Leu	Phe	Glu	525	Lys	Leu	Gln	Leu
530	Pro	Val	Leu	535	Lys	Lys	Ser	Lys	540	Thr	Gly	Tyr	Ser	545	Thr	Ser	Ala	Asp
545	Leu	Glu	Lys	550	Leu	Pro	Tyr	His	555	Glu	Ile	Val	Glu	560	Asn	Ile	Leu	Gln
Leu	Glu	Lys	Leu	565	Ala	Pro	Tyr	His	570	Glu	Ile	Val	Glu	575	Asn	Ile	Leu	Gln
His	Tyr	Arg	Gln	580	Leu	Gly	Lys	Leu	585	Gln	Ser	Thr	Tyr	590	Ile	Glu	Gly	Leu
Leu	Lys	Val	Val	595	Arg	Pro	Asp	Thr	600	Lys	Lys	Val	His	605	Thr	Ile	Phe	Asn
Gln	Ala	Leu	Thr	610	Gln	Thr	Gly	Arg	615	Leu	Ser	Ser	Thr	620	Glu	Pro	Asn	Leu
Gln	Asn	Ile	Pro	625	Ile	Arg	Leu	Glu	630	Glu	Glu	Gly	Arg	635	Lys	Ile	Arg	Gln
Phe	Val	Pro	Ser	640	Glu	Ser	Asp	Trp	645	Leu	Ile	Phe	Ala	650	Ala	Ala	Asp	Tyr
Gln	Ile	Glu	Leu	655	Arg	Val	Leu	Ala	660	His	Ile	Ala	Glu	665	Asp	Asp	Asn	Leu
Met	Glu	Ala	Phe	670	Arg	Arg	Asp	Leu	675	Asp	Ile	His	Thr	680	Lys	Thr	Ala	Met
Asp	Ile	Phe	Gln	685	Val	Ser	Glu	Asp	690	Glu	Val	Thr	Pro	695	Asn	Met	Arg	Arg
Gln	Ala	Lys	Ala	700	Val	Asn	Phe	Gly	705	Ile	Val	Tyr	Gly	710	Ile	Ser	Asp	Tyr
705	Gly	Leu	Ala	715	Gln	Asn	Leu	Asn	720	Ile	Ser	Arg	Lys	725	Glu	Ala	Ala	Glu
Ile	Glu	Arg	Tyr	730	Phe	Glu	Ser	Phe	735	Pro	Gly	Val	Lys	740	Arg	Tyr	Met	Glu
Asn	Ile	Val	Gln	745	Glu	Ala	Lys	Gln	750	Lys	Gly	Tyr	Val	755	Thr	Thr	Leu	Leu
His	Arg	Arg	Arg	760	Tyr	Leu	Pro	Asp	765	Ile	Thr	Ser	Arg	770	Asn	Phe	Asn	Val

ES 2 668 448 T3

```

      770              775              780
Arg  Ser  Phe  Ala  Glu  Arg  Met  Ala  Met  Asn  Thr  Pro  Ile  Gln  Gly  Ser
785  790  805  810  815  820  825  830  835  840  845  850  855  860  865  870
Ala  Ala  Asp  Ile  Ile  Lys  Lys  Ala  Met  Ile  Asp  Leu  Asn  Ala  Arg  Leu
Lys  Glu  Glu  Arg  Leu  Gln  Ala  Arg  Leu  Leu  Leu  Gln  Val  His  Asp  Glu
Leu  Ile  Leu  Glu  Ala  Pro  Lys  Glu  Glu  Met  Glu  Arg  Leu  Cys  Arg  Leu
Val  Pro  Glu  Val  Met  Glu  Gln  Ala  Val  Thr  Leu  Arg  Val  Pro  Leu  Lys
Val  Asp  Tyr  His  Tyr  Gly  Ser  Thr  Trp  Tyr  Asp  Ala  Lys
865              870              875

```

5 <210> 38  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> motivo de polimerasa sintético correspondiente a la mutación D580X de Z05

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7)...(7)  
 <223> Xaa = Ser o Thr

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)...(8)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Asp o Glu

25 <400> 38  
 Thr Gly Arg Leu Ser Ser Xaa Xaa Pro Asn Leu Gln Asn  
 1 5 10

30 <210> 39  
 <211> 831  
 <212> PRT  
 <213> *Carboxydothemus hydrogenoformans*

35 <220>  
 <223> ADN polimerasa de *Carboxydothemus hydrogenoformans* (Chy)

```

<400> 39
Met  Gly  Lys  Val  Val  Leu  Val  Asp  Gly  Asn  Ser  Leu  Leu  His  Arg  Ala
1 5 10 15
Phe  Phe  Ala  Leu  Pro  Pro  Leu  Lys  Thr  Thr  Lys  Gly  Glu  Pro  Thr  Gly
20 25 30
Ala  Val  Tyr  Glu  Phe  Leu  Thr  Met  Leu  Phe  Arg  Val  Ile  Lys  Asp  Glu
35 40 45
Lys  Pro  Glu  Tyr  Leu  Ala  Val  Ala  Phe  Asp  Ile  Ser  Arg  Lys  Thr  Phe
50 55 60
Arg  Thr  Glu  Gln  Phe  Thr  Ala  Tyr  Lys  Gly  His  Arg  Lys  Glu  Ala  Pro
65 70 75 80
Asp  Glu  Leu  Val  Pro  Gln  Phe  Ala  Leu  Val  Arg  Glu  Val  Leu  Lys  Val
85 90 95
Leu  Asn  Val  Pro  Tyr  Ile  Glu  Leu  Asp  Gly  Tyr  Glu  Ala  Asp  Asp  Ile
100 105 110
Ile  Gly  His  Leu  Ser  Arg  Ala  Phe  Ala  Gly  Gln  Gly  His  Glu  Val  Val
115 120 125
Ile  Tyr  Thr  Ala  Asp  Arg  Asp  Met  Leu  Gln  Leu  Val  Asp  Glu  Lys  Thr
130 135 140
Val  Val  Tyr  Leu  Thr  Lys  Lys  Gly  Ile  Thr  Glu  Leu  Val  Lys  Met  Asp

```

ES 2 668 448 T3

145	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	150	Glu	Asn	Tyr	Gly	Leu	155	Lys	Pro	Lys	Gln	Leu	160	Val
	Asp	Val	Lys	Gly	165	Leu	Met	Gly	Asp	Pro	170	Ser	Asp	Asn	Ile	Pro	175	Gly	Val
	Pro	Gly	Ile	Gly	180	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	185	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	200	Tyr	Gly
	Ser	Val	Glu	Glu	195	Val	Leu	Ala	Arg	Lys	205	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro	210	Lys	Leu
	Arg	Glu	Lys	Leu	210	Ala	Glu	His	Glu	Asn	215	Leu	Ala	Lys	Ile	Ser	220	Lys	Gln
	Leu	Ala	Thr	Ile	225	Leu	Arg	Glu	Ile	Pro	230	Leu	Glu	Ile	Ser	Leu	235	Glu	Asp
	Leu	Lys	Val	Lys	245	Glu	Pro	Asn	Tyr	Glu	250	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	255	Phe	Leu
	His	Leu	Glu	Phe	260	Lys	Ser	Phe	Leu	Lys	265	Glu	Ile	Glu	Pro	Lys	270	Ile	Lys
	Lys	Glu	Tyr	Gln	275	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	280	Val	Gln	Val	Glu	Thr	285	Val	Glu
	Thr	Glu	Gly	Gln	290	Ile	Ala	Val	Val	Phe	295	Ser	Asp	Gly	Phe	Tyr	300	Val	Asp
	Asp	Gly	Glu	Lys	305	Thr	Lys	Phe	Tyr	Ser	310	Leu	Asp	Arg	Leu	Asn	315	Glu	Ile
	Glu	Glu	Ile	Phe	325	Arg	Asn	Lys	Lys	Ile	330	Ile	Thr	Asp	Asp	Ala	335	Lys	Gly
	Ile	Tyr	His	Val	340	Cys	Leu	Glu	Lys	Gly	345	Leu	Thr	Phe	Pro	350	Glu	Val	Cys
					355						360					365			
	Phe	Asp	Ala	Arg	Ile	Ala	Ala	Tyr	Val	Leu	Asn	Pro	Ala	Asp	Gln	Asn			
	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Val	Tyr	Glu			
	Asp	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Arg	Gly	Leu	Phe	370	Tyr	Leu	Lys	Lys	Glu	400	Met	
	Met	Arg	Lys	Ile	Phe	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	410	Arg	Leu	Phe	Tyr	Glu	415	Ile	
	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Pro	Val	Leu	Ala	Gln	420	Met	Glu	His	Thr	Gly	430	Ile	
	Gln	Val	Asp	Arg	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Met	425	Ser	Leu	Glu	Leu	Gly	445	Glu	
	Gln	Ile	Glu	Glu	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Tyr	440	Val	Leu	Ala	Gly	Glu	450	Glu	
	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Pro	Arg	Gln	Leu	Gly	455	Val	Ile	Leu	Phe	Glu	460	Lys	
	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Ile	Lys	Lys	Thr	Lys	470	Thr	Gly	Tyr	Ser	Thr	475	Asp	
	Ala	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Phe	480	His	Glu	Ile	Ile	Gly	485	Lys	
	Ile	Leu	Asn	Tyr	Arg	Gln	Leu	Met	Lys	Leu	490	Lys	Ser	Thr	Tyr	Thr	495	Asp	
	Gly	Leu	Met	Pro	Leu	Ile	Asn	Glu	Arg	Thr	500	Lys	Leu	His	Thr	Thr	505	Asp	
	Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Arg	510	Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	515	Pro	
	Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Pro	Ile	Arg	Leu	Glu	520	Leu	Gly	Arg	Lys	Leu	525	Arg	
	Lys	Met	Phe	Ile	Pro	Ser	Pro	Gly	Tyr	Asp	530	Tyr	Ile	Val	Ser	Ala	535	Asp	
	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ala	540	His	Phe	Ser	Glu	Glu	545	Pro	
	Lys	Leu	Ile	Glu	Ala	Tyr	Gln	Lys	Gly	Glu	550	Asp	Ile	His	Arg	Lys	555	Thr	
	Ala	Ser	Glu	Val	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Glu	560	Val	Thr	Pro	Glu	Met	565		
	Arg	Ala	His	Ala	Lys	Ser	Val	Asn	Phe	Gly	570	Ile	Val	Tyr	Gly	Ile	575	Ser	
	Asp	Phe	Gly	Leu	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Ile	580	Pro	Arg	Glu	Val	Ala	585	Gly	

ES 2 668 448 T3

Lys	Tyr	Ile	Lys	Asn	Tyr	Phe	Ala	Asn	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Tyr
	690					695					700				
Leu	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Thr	Ala	Arg	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr
705					710					715					720
Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Ile	Pro	Glu	Leu	Ser	Ser	Lys	Asn	Arg
				725					730					735	
Thr	Val	Gln	Gly	Phe	Gly	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Asn	Thr	Pro	Leu	Gln
			740					745					750		
Gly	Ser	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Asn	Val	Glu	Lys
		755					760					765			
Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	His
	770					775					780				
Asp	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Pro	Ala	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Val	Lys
785					790					795					800
Ala	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Glu	Leu	Lys	Val	Pro
				805					810					815	
Leu	Ile	Ala	Glu	Val	Gly	Ala	Gly	Lys	Asn	Trp	Tyr	Glu	Ala	Lys	
			820					825					830		

1

**REIVINDICACIONES**

1. Una ADN polimerasa que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene una eficacia de transcriptasa inversa incrementada en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es M y en la que el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, S, G y A, y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es I y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es I.
2. La ADN polimerasa de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
3. La ADN polimerasa de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D.
4. La ADN polimerasa de la reivindicación 3, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K.
5. La ADN polimerasa de la reivindicación 4, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es G.
6. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K.
7. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es M, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es K y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es G y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 616 de la SEQ ID NO: 1 es I, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de la SEQ ID NO: 1 es I y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEQ ID NO: 1 es D.
8. Un ácido nucleico recombinante que codifica la ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. Un procedimiento de producción de la ADN polimerasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho procedimiento:  
cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa.
12. Un procedimiento para llevar a cabo la extensión del cebador, que comprende:  
poner en contacto una ADN polimerasa como en una de las reivindicaciones 1 a 7 con un cebador, un molde de polinucleótido y nucleósidos trifosfato en condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido.
13. Un kit para producir un cebador extendido, que comprende:  
al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa como en una de las reivindicaciones 1 a 7.
14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además uno o más recipientes adicionales seleccionados del grupo que consiste en:
  - (a) un recipiente que proporciona un cebador hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado;
  - (b) un recipiente que proporciona nucleósidos trifosfato; y
  - (c) un recipiente que proporciona un tampón adecuado para la extensión del cebador.



15. Una mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa como en una de las reivindicaciones 1 a 7, al menos un cebador, un molde de polinucleótido y nucleósidos trifosfato.

**FIGURA 1**

Z05	RRAFVA.EAGWAL	VA L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	12)
Taq	RRAFIA.EEGWLL	VA L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	13)
Tfi	RKAFIA.EEGHLL	VA L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	14)
Tfl	RRAFVAEE.GWVL	VV L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	15)
Sps17	RKAFIA.EEGHLL	VA L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	16)
Tth	RRAFVA.EAGWAL	VA L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	17)
Tca	RRAFVAEA.GWAL	VA L	DYSQ	I	ELRV	LAHL	S G	DENLIRVF	(SEQ	ID NO:	18)
Tma	RKAIVPQDPNWWI	VS A	DYSQ	I	ELRI	LAHL	S G	DENLLRAF	(SEQ	ID NO:	19)
Tne	RKAIVPQDPDWWI	VS A	DYSQ	I	ELRI	LAHL	S G	DENLVKAF	(SEQ	ID NO:	20)
Taf	RKAVRPQRQDWWI	LG A	DYSQ	I	ELRV	LAHV	S K	DENLLKAF	(SEQ	ID NO:	21)
Dra	RKGFIAED.GFTL	IA A	DYSQ	I	ELRL	LAHI	A D	DPLMQQAF	(SEQ	ID NO:	23)
Bst	RQAFVPSEPDWLI	FA A	DYSQ	I	ELRV	LAHI	A E	DDNLI EAF	(SEQ	ID NO:	24)
Bca	RQAFVPSESDWLI	FA A	DYSQ	I	ELRV	LAHI	A E	DDNLMEAF	(SEQ	ID NO:	25)
	-----X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	DYSQ	X <sub>5</sub>	ELRX <sub>6</sub>	LAHX <sub>7</sub>	X <sub>8</sub> X <sub>9</sub>	D	-----	(SEQ	ID NO:	26)

**FIGURA 2**

<b>A. Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05)</b>													
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tfl	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bst	Bca
Z05		0,864	0,833	0,859	0,839	0,962	0,958	0,459	0,374	0,368	0,359	0,407	0,408
Taq	0,864		0,831	0,854	0,836	0,872	0,864	0,468	0,382	0,368	0,351	0,397	0,397
Tfi	0,833	0,831		0,82	0,991	0,829	0,824	0,45	0,371	0,375	0,353	0,405	0,397
Tfl	0,859	0,854	0,82		0,824	0,853	0,848	0,462	0,381	0,374	0,356	0,397	0,398
Sps17	0,839	0,836	0,991	0,824		0,835	0,83	0,452	0,375	0,377	0,355	0,407	0,399
Tth	0,962	0,872	0,829	0,853	0,835		0,989	0,463	0,373	0,367	0,358	0,406	0,406
Tca	0,958	0,864	0,824	0,848	0,83	0,989		0,46	0,371	0,365	0,356	0,404	0,404
Dra	0,459	0,468	0,45	0,462	0,452	0,463	0,46		0,334	0,325	0,314	0,338	0,339
Tma	0,374	0,382	0,371	0,381	0,375	0,373	0,371	0,334		0,854	0,567	0,37	0,377
Tne	0,368	0,368	0,375	0,374	0,377	0,367	0,365	0,325	0,854		0,558	0,377	0,376
Taf	0,359	0,351	0,353	0,356	0,355	0,358	0,356	0,314	0,567	0,558		0,356	0,364
Bst	0,407	0,397	0,405	0,397	0,407	0,406	0,404	0,338	0,37	0,377	0,356		0,881
Bca	0,408	0,397	0,397	0,398	0,399	0,406	0,404	0,339	0,377	0,376	0,364	0,881	
<b>B. Identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa únicamente (correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05)</b>													
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tfl	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bst	Bca
Z05		0,901	0,845	0,891	0,845	0,975	0,973	0,563	0,483	0,478	0,44	0,498	0,49
Taq	0,901		0,879	0,901	0,877	0,906	0,901	0,561	0,488	0,473	0,44	0,503	0,495
Tfi	0,845	0,879		0,857	0,997	0,853	0,853	0,566	0,495	0,49	0,449	0,512	0,49
Tfl	0,891	0,901	0,857		0,855	0,889	0,889	0,571	0,492	0,48	0,444	0,494	0,485
Sps17	0,845	0,877	0,997	0,855		0,853	0,853	0,566	0,495	0,49	0,449	0,512	0,49
Tth	0,975	0,906	0,853	0,889	0,853		0,99	0,563	0,478	0,473	0,437	0,496	0,488
Tca	0,973	0,901	0,853	0,889	0,853	0,99		0,563	0,478	0,473	0,437	0,496	0,488
Dra	0,563	0,561	0,566	0,571	0,566	0,563	0,563		0,45	0,448	0,426	0,474	0,454
Tma	0,483	0,488	0,495	0,492	0,495	0,478	0,478	0,45		0,883	0,622	0,474	0,475
Tne	0,478	0,473	0,49	0,48	0,49	0,473	0,473	0,448	0,883		0,615	0,476	0,473
Taf	0,44	0,44	0,449	0,444	0,449	0,437	0,437	0,426	0,622	0,615		0,46	0,473
Bst	0,498	0,503	0,512	0,494	0,512	0,496	0,496	0,474	0,474	0,476	0,46		0,898
Bca	0,49	0,495	0,49	0,485	0,49	0,488	0,488	0,454	0,475	0,473	0,473	0,898	

**FIGURA 3**

<b>A. Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05)</b>							
Nombre	Z05	Tth	Tfi	Tfl	Tca	Taq	Sps17
Z05		0,962	0,833	0,859	0,958	0,864	0,839
Tth	0,962		0,829	0,853	0,989	0,872	0,835
Tfi	0,833	0,829		0,82	0,824	0,831	0,991
Tfl	0,859	0,853	0,82		0,848	0,854	0,824
Tca	0,958	0,989	0,824	0,848		0,864	0,83
Taq	0,864	0,872	0,831	0,854	0,864		0,836
Sps17	0,839	0,835	0,991	0,824	0,83	0,836	
<b>B. Identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa únicamente (correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05)</b>							
Nombre	Z05	Tth	Tfi	Tfl	Tca	Taq	Sps17
Z05		0,975	0,845	0,891	0,973	0,901	0,845
Tth	0,975		0,853	0,889	0,99	0,906	0,853
Tfi	0,845	0,853		0,857	0,853	0,879	0,997
Tfl	0,891	0,889	0,857		0,889	0,901	0,855
Tca	0,973	0,99	0,853	0,889		0,901	0,853
Taq	0,901	0,906	0,879	0,901	0,901		0,877
Sps17	0,845	0,853	0,997	0,855	0,853	0,877	