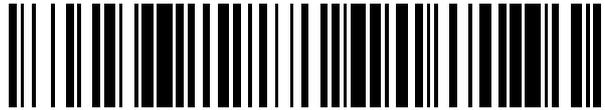


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 321**

21 Número de solicitud: 201731236

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.04.2019

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (85.0%)
C/ SERRANO 117
28006 MADRID ES y
INSTITUT PASTEUR (15.0%)**

72 Inventor/es:

**SALAS FALGUERAS, Margarita;
REDREJO RODRIGUEZ, Modesto;
KRUPOVIC, Mart y
FORTERRE, Patrick**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **ADN POLIMERASAS INDEPENDIENTES DE CEBADOR Y SU USO PARA LA SINTESIS DE ADN**

57 Resumen:

ADN polimerasas independientes de cebador y su uso para la síntesis de ADN.

La presente invención proporciona un péptido aislado de SEQ ID NO: 1, necesario para la actividad primasa, así como nuevas enzimas ADN polimerasas replicativas, preferiblemente la de SEQ ID NO: 2, que comprenden dicho péptido. Por tanto, estas ADN polimerasas están dotadas de actividad primasa y no requieren cebadores proporcionados externamente para iniciar y realizar la amplificación de ADN. Estas polimerasas son capaces de llevar a cabo una síntesis de ADN de novo fiable y procesiva de moldes de ADN en ausencia de cebadores pre-sintetizados. Por lo tanto, estas enzimas actúan como primasas y ADN polimerasas. Asimismo, muestran capacidad de síntesis de translesión, pudiendo ser útiles no solo para la amplificación del genoma completo sino también para la amplificación de ADN dañados. La invención se refiere además a métodos para amplificar ADN moldes que usan estas enzimas.

ES 2 710 321 A1

DESCRIPCIÓN

ADN POLIMERASAS INDEPENDIENTES DE CEBADOR Y SU USO PARA LA SÍNTESIS DE ADN

5

La presente invención se encuentra dentro de los campos de la biología molecular, biotecnología y métodos de amplificación o replicación de ADN. Particularmente, esta invención se refiere a un nuevo grupo de enzimas ADN polimerasa con actividad primasa de ADN, las cuales pueden usarse para la amplificación *in vitro* de moldes de ADN sin la presencia de cebadores añadidos externamente.

10

TÉCNICA ANTERIOR

15

Las ADN polimerasas (ADNPs) son enzimas clave, esenciales para la replicación, recombinación y reparación del genoma en todas las formas de vida celular y sus virus. Las ADNPs pueden dividirse en siete familias (A, B, C, D, X, Y y RTs). Las ADNPs de la familia B (PolBs) comprenden enzimas implicadas en la replicación del genoma en eucariotas y arqueas, aunque también en virus de los tres dominios de vida. Para iniciar la síntesis de ADN, todas las PolBs caracterizadas hasta ahora dependen de la presencia de un cebador externo, de un grupo hidroxilo presentado por un ácido nucleico (ARN o ADN) o por la denominada proteína terminal (PT). Por tanto, basándose en el requisito de utilizar cebadores para iniciar la replicación del genoma, así como en la agrupación filogenética, estas enzimas se pueden dividir en general en dos grupos principales: las PolBs cebadas con ARN (rPolBs) y las PolBs cebadas con proteína (pPolBs). Se desconoce la relación evolutiva entre los dos grupos y, por lo tanto, no está claro si una supuesta PolB ancestral habría empleado como cebador una proteína o un oligonucleótido de ARN. El grupo de las rPolBs contiene principalmente replicasas dedicadas a la copia precisa y eficiente de grandes genomas celulares y víricos. Por el contrario, las pPolBs son exclusivas de virus y de elementos móviles egoístas con genomas lineales de tamaño moderado (<50 kb). La característica de las pPolBs es la presencia de subdominios específicos, denominados TPR1 y TPR2, que se describieron originalmente en la ADN polimerasa $\Phi 29$ (ADNP $\Phi 29$). Para la interacción de la ADNP con la PT se requiere TPR1, mientras que TPR2 dota a la pPolB de capacidad de procesamiento y

20

25

30

35

desplazamiento de cadena, garantizando las dos propiedades la superioridad de la ADN Φ 29 en diversas aplicaciones de biología molecular, tal como la amplificación de ADN de molécula única de desplazamiento múltiple.

5 El cebado con proteína se ha descrito en diversos virus de bacterias y eucariotas, así como en plásmidos lineales encontrados en levaduras, hongos filamentosos y plantas. Más recientemente, también se identificaron genes codificantes de pPolB en dos superfamilias de elementos genéticos móviles (EGM) integrados en varios genomas celulares (Krupovic y Koonin, 2016, *Curr Opin Microbiol*, 31, 25-33).

10 La primera superfamilia comprende elementos transponibles similares a virus de eucariotas, denominados polintones (también conocidos como Mavericks), que además de pPolB, codifican integrasas similares a retrovirus y un conjunto de proteínas que se predice que están implicadas en la formación de partículas víricas (Krupovic, *et al.*, 2014a, *Biol Direct*, 9, 6). El segundo supergrupo de elementos que codifican pPolB,

15 denominado casposones, está presente en una amplia variedad de arqueas y algunas bacterias (Krupovic, *et al.*, 2014b, *BMC Biology*, 12, 36). Para la integración en el genoma celular, estos elementos emplean endonucleasas homólogas a la enzima Cas1, una proteína característica de los sistemas CRISPR-Cas responsables del proceso de inmunización. Se ha postulado que las pPolBs participan en la replicación

20 de los genomas del casposón y polintón (Kapitonov, V.V., y Jurka, J., 2006, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 4540-4545); por consiguiente, estos EGMs reciben el nombre de elementos autosintetizadores o autorreplicantes. La genómica comparativa y los análisis filogenéticos sugirieron que los polintones y los casposones han desempeñado papeles clave en la evolución de muchos grupos de virus de ADNbc

25 (bicatenario) de eucariotas y sistemas CRISPR-Cas, respectivamente. Sin embargo, no hay pruebas experimentales de la replicación y, en particular, de la iniciación de la replicación de estos elementos integrados autorreplicantes.

En cuanto a las primasas, se ha demostrado que las ADN primasas que

30 contienen el dominio PrimPol, que pertenecen a la gran superfamilia de primasas arqueoeucariotas (PAE), poseen múltiples actividades enzimáticas *in vitro*, incluida la actividad de la ADN polimerasa dependiente de cebador e independiente de cebador, actividades nucleotidiltransferasa, síntesis de translesión e incluso transcriptasa inversa (Gill, *et al.*, 2014, *Nucleic Acids Res*, 42, 3707-3719; Martínez-Jiménez, *et al.*,

35 2015, *DNA Repair (Amst)*, 29, 127-138). Aunque en determinados virus o proteínas

codificadas por plásmidos, el dominio de las PAE se fusiona con diversas helicasas y puede sintetizar productos de ADN de gran tamaño, como ocurre en el caso de la recientemente descubierta primasa-polimerasa codificada por el fago NrS-1 (Zhu, *et al.*, 2017, Proc Natl Acad Sci USA, 114, E2310-E2318), estas enzimas carecen del dominio exonucleasa, y su polimerización de ADN en moldes más largos parece ser principalmente distributiva. Por tanto, en general, se considera que el papel de las proteínas PAE *in vivo* está ampliamente restringido a la síntesis de cebadores cortos, que se extienden mediante las ADNPs replicativas celulares (Beck, *et al.*, 2010, Nucleic Acids Res, 38, 6707-6718).

10

Hasta ahora ninguna ADN polimerasa conocida puede comenzar una nueva cadena de ADN (*de novo*) sino que solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, y por lo tanto necesita un cebador al que pueda añadirse el primer nucleótido. Otra enzima denominada primasa es la que sintetiza los cebadores. No se han descrito PolBs que al mismo tiempo muestren actividad tanto primasa como ADN polimerasa. Por tanto, para realizar la replicación del ADN *in vivo*, se necesitan al menos dos enzimas diferentes, una primasa capaz de proporcionar un cebador y una ADN polimerasa para elongarlo. Para la replicación o amplificación *in vitro* de un ADN molde, los cebadores deben añadirse externamente a la mezcla de reacción para que a través de la ADN polimerasa puedan elongarse.

15
20

Para la amplificación del genoma completo a partir de células individuales, recientemente se ha propuesto un nuevo método denominado Trueprime, que usa una combinación de una primasa PAE, TthPrimPol y ADN Φ 29 (Picher, *et al.*, 2016, Nature communications, 7, 13296).

25

Sin embargo, en este marco, existe una necesidad en la técnica de tener ADN polimerasas replicativas mejoradas que no requieran cebadores añadidos externamente para iniciar y realizar la replicación del ADN. Estas polimerasas mejoradas presentarían una actividad independiente de cebador o actividad primasa, permitiendo de este modo el uso de mezclas de reacción de amplificación simplificadas. Estas enzimas podrían usarse incluso como soluciones de una sola enzima para la amplificación procesiva y fiel de genomas completos.

30

35 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona nuevas enzimas ADN polimerasas con actividad primasa que no requieren cebadores provistos externamente para la replicación del ADN. Estas polimerasas son capaces de iniciar y realizar una síntesis de ADN *de novo* fiable y procesiva de moldes circulares y lineales en ausencia de
5 cebadores preexistentes o factores proteicos adicionales. Por lo tanto, estas enzimas de la invención actúan como primasas y ADN polimerasas. Asimismo, muestran capacidad de síntesis de translesión de modo que pueden ser útiles para la amplificación de ADN moldes dañados.

10

Estas enzimas ADN polimerasas son un nuevo grupo dentro de las ADN polimerasas de la familia B, representando así el tercer grupo principal de las PolBs, junto con las rPolBs y pPolBs. Estas enzimas de la invención, que también se denominarán "piPolBs" de "polimerasas de la familia B independientes de cebador" (pi
15 por las siglas del inglés *primer-independent*), son ADN polimerasas eficientes y fiables.

15

Las piPolBs de la invención tienen la capacidad de realizar una síntesis de ADN *de novo* dependiente de molde intrínseco, de manera que para la síntesis de ADN no necesitan un cebador presintetizado. Asimismo, son ADN polimerasas replicativas completas, dotadas de capacidad de corrección de errores y desplazamiento de cadena. Por tanto, esta invención desafía un dogma existente en el
20 campo desde hace mucho tiempo, que establece que las ADN polimerasas replicativas son incapaces de sintetizar ADN *de novo*, sin un cebador preexistente que proporcione un grupo hidroxilo para anclar el nucleótido entrante.

20

Este nuevo grupo principal de PolBs, las piPolBs de la invención, está codificado por un nuevo tipo de elementos genéticos móviles (EGM) autorreplicantes, denominados pipolinas, integrados en el genoma de bacterias de diversos filos, entre los que se incluyen *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, y también están presentes como plásmidos circulares en las mitocondrias. La mayoría de las pipolinas
25 se encuentran integradas en genomas bacterianos, aunque algunas persisten como plásmidos extracromosómicos. La caracterización bioquímica de una piPolB representativa de *Escherichia coli* (mostrada en la SEQ ID NO: 2) mostró que la proteína presentaba una actividad de polimerización de ADN eficaz y versátil, con capacidad de replicar moldes de ADN dañados y no dañados, dotada además de
30 capacidades de corrección de errores y desplazamiento de cadena, similar a las pPolB
35

25

30

35

típicas, como la codificada por el bacteriófago phi29. De manera destacable, la proteína también tiene la capacidad de realizar una síntesis de ADN *de novo* dependiente de molde intrínseco, es decir, actividad primasa de ADN, inesperada y nunca antes vista entre las siete familias de ADN polimerasas (A, B, C, D, X, Y y RTs).

5 Por tanto, las piPolB por sí solas son suficientes para la replicación de moldes de ADN, como las moléculas EGM circulares, en ausencia de factores de iniciación de la replicación adicionales, rompiendo así el dogma existente en el campo desde hace mucho tiempo que establece que las ADN polimerasas replicativas requieren un cebador preexistente para iniciar la síntesis de ADN. Las piPolBs de la invención
10 podrían usarse para desarrollar nuevas aplicaciones para la amplificación del genoma completo sin la necesidad de cebadores externos que puedan causar un sesgo de amplificación.

Además, la supervivencia mejorada de las células de *E. coli* que expresan piPolB tras el bloqueo de la replicación por agentes que dañan el ADN (véanse los
15 ejemplos a continuación) sugiere un papel adicional de estas piPolBs de la invención en la tolerancia al daño del ADN.

Resumiendo, las principales ventajas de las piPolBs descritas en la presente
20 invención son:

- No requieren la adición de un cebador externo (presintetizado) a la mezcla de reacción para la amplificación del ADN, dado que presentan actividad primasa. Por tanto, estas enzimas pueden sintetizar ADN *de novo* exclusivamente dependiente de un molde intrínseco, en ausencia de cebadores preexistentes o
25 factores proteicos adicionales que inicien la replicación.

- Asimismo, su capacidad primasa no depende de una secuencia molde específica. Como no presentan un requisito de secuencia molde rígido para iniciar la replicación, se pueden seleccionar múltiples orígenes de replicación
30 de una manera aleatoria, una propiedad útil para la amplificación eficaz del genoma completo independiente de cebadores.

- Pueden iniciar y realizar la replicación de ADN de moldes circulares y lineales, preferiblemente monocatenarios.

35

- Estas enzimas mantienen las propiedades deseables de las ADN polimerasas B, como la ADN polimerasa del fago phi29. Estas propiedades son una extensión de cebador de ADN eficaz y actividad de polimerización de ADN, así como capacidades de corrección de errores y desplazamiento de cadena.

5

- Presentan una capacidad de síntesis de translesión (STL) procesiva intrínseca eficaz, elongando el cebador de manera procesiva sin introducir mutaciones con desplazamiento del marco de lectura. Esto significa que las piPolBs de la invención tienen alta tolerancia al daño y capacidad de reparación del ADN. Estas piPolBs pueden usar moldes de ADN dañados y no dañados, ya que, como se muestra en los ejemplos que se proporcionan a continuación (véase, por ejemplo, la Fig. 2A), pueden replicar moldes dañados. Esta capacidad puede usarse, por ejemplo, para la amplificación de moldes de ADN dañados o antiguos.

10

15

Las piPolBs de la invención podrían usarse como soluciones de una sola enzima para la amplificación del genoma completo a partir de células individuales. Esto representa una ventaja sobre la técnica anterior donde las soluciones para la replicación del genoma completo consisten en una combinación más compleja de diferentes enzimas, tales como, por ejemplo, una primasa, una Prim-Pol y la ADNP del fago phi29.

20

Adicionalmente, los inventores de la presente invención han identificado el motivo de aminoácidos conservado común necesario para la actividad primasa en las piPolBs descritas en este documento. Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Esta SEQ ID NO: 1 es el dominio conservado común dentro de las piPolBs descritas en esta invención, necesario para la actividad primasa y consiste en KX_2-X_{3-10} -KTRG, donde X_2 es un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en A, H, K, T, D, Y, G o R, preferiblemente A o H, más preferiblemente H; y X_{3-10} es una secuencia de 8 aminoácidos de longitud donde dichos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido idénticos o diferentes entre ellos. Incluso más preferiblemente, X_{3-10} es la secuencia de aminoácidos EVSQLIAM (SEQ ID NO: 5). En una realización particular, X_2 es H y X_{3-10} es la SEQ ID NO: 5. La secuencia SEQ ID NO: 1 en la que X_2 es H y X_{3-10} es la SEQ ID NO: 5 es la SEQ ID NO: 85. Esta SEQ ID NO: 85 es la más preferida.

30

35

La SEQ ID NO: 1, preferiblemente la SEQ ID NO: 85, corresponde a las posiciones 613 a 626 de la SEQ ID NO: 2, donde la SEQ ID NO: 2 es una de las piPolB de *E. coli* descritas y ensayadas en esta invención y la piPolB más preferida de la invención.

5

Este motivo de SEQ ID NO: 1 puede introducirse de manera recombinante en otras ADN polimerasas conocidas, preferiblemente en las PolB, más preferiblemente en las pPolB, para dotarlas de actividad primasa.

10

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una enzima ADN polimerasa (ADNP) recombinante o mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de una ADN polimerasa parental de la familia B (ADN PolB) donde el motivo KxY se ha sustituido por el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, preferiblemente por el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 85, donde dicha enzima ADN polimerasa recombinante tiene actividad ADN polimerasa y actividad primasa. En el presente documento, esta enzima ADN polimerasa recombinante también se denominará "ADNP recombinante de la invención".

15

El término "recombinante" o "mutante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima ADN polimerasa que procede de una ADN PolB parental por medio de una o más sustituciones de uno o más aminoácidos en el (los) punto(s) descrito(s) en este documento dentro de su secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, tiene una secuencia diferente a la de la enzima parental natural o de tipo silvestre. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ADNP recombinante" significa un polipéptido que tiene actividad ADN polimerasa y actividad primasa, producido por síntesis química o de manera recombinante por un organismo que expresa una secuencia de nucleótidos que codifica la ADN PolB parental modificada en el sentido descrito en este documento. Dicha secuencia de nucleótidos modificada se obtiene por intervención humana modificando la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN PolB parental. El término "modificación" significa cualquier modificación química de la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de la ADN PolB parental. Por lo tanto, la ADNP recombinante de la invención se puede obtener mediante cualquier técnica de ingeniería genética conocida en la materia para la producción de polipéptidos recombinantes.

25

30

35

Las sustituciones de aminoácidos descritas en este documento introducidas en la ADN PolB parental pueden obtenerse utilizando técnicas de ingeniería genética o de ADN recombinante, tales como, por ejemplo, mutando la secuencia codificante de la ADN PolB parental mediante mutagénesis dirigida o pueden obtenerse mediante
5 síntesis química de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la ADNP recombinante de la invención que lleva dichas sustituciones de aminoácidos.

Por lo tanto, la ADNP recombinante de la invención puede sintetizarse, por ejemplo, pero sin limitación, *in vitro*. Por ejemplo, mediante la síntesis de péptidos en
10 fase sólida o estrategias de ADN recombinante. La ADNP recombinante de la invención puede producirse de manera recombinante, incluyendo su producción como un polipéptido maduro o como una pre-proteína que incluye un péptido señal.

La ADNP recombinante de la invención no es la enzima de SEQ ID NO: 2, SEQ
15 ID NO: 8 o SEQ ID NOs: 9 a 42 (las piPolBs descritas en la presente descripción).

Una "ADN polimerasa parental de la familia B" es una ADN polimerasa de la familia B de tipo silvestre, bien sea rPolB o pPolB, preferiblemente pPolB, pero no piPolB, de las conocidas en la técnica. Las pPolB comprenden, en sentido N-terminal a
20 C-terminal, un dominio exonucleasa, al menos dos dominios Palm separados por un dominio TPR1, dominios "fingers" y un dominio TPR2 y un dominio "thumb".

El motivo de SEQ ID NO: 1 puede introducirse en la PolB parental, preferiblemente pPolB, en sustitución de su dominio conservado que comprende el
25 motivo KxY. El experto en la materia sabe dónde se localiza este motivo KxY dentro de las PolBs, sin embargo, como ejemplo, este motivo KxY corresponde a las posiciones 498 a 500, ambas incluidas, de la SEQ ID NO: 6, donde la SEQ ID NO: 6 es la pPolB del fago phi29. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, las posiciones 498 a 500 de la PolB phi29 parental (SEQ ID NO: 6) se sustituyen por la
30 SEQ ID NO: 1, preferiblemente por la SEQ ID NO: 85. Por otra parte, este motivo KxY corresponde a las posiciones 535 a 537, ambas incluidas, de la SEQ ID NO: 7, donde la SEQ ID NO: 7 es la pPolB del fago Bam35. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, las posiciones 535 a 537 de la PolB Bam35 parental (SEQ ID NO: 7) se sustituyen por la SEQ ID NO: 1, preferiblemente por la SEQ ID NO:
35 85.

Preferiblemente, la ADNP recombinante de la invención muestra actividades cebadora o primasa, exonucleasa y ADN polimerasa así como capacidades de corrección de errores y de desplazamiento de cadena.

5 La "actividad ADN polimerasa" es la actividad que consiste en la síntesis de moléculas o secuencias de ADN a partir de desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, las ADN polimerasas son capaces de replicar ADN a partir de un molde de ADN añadiendo nucleótidos libres al extremo 3' de la cadena de ADN que se está formando. Esto resulta en la elongación de la cadena que se está formando en
10 dirección 5'-3'.

 La "actividad cebadora o primasa" es la actividad que consiste en la síntesis de cebadores. La actividad primasa cataliza la síntesis de segmentos cortos de ARN o ADN, denominados cebadores, complementarios a un molde de ADNmc
15 (monocatenario).

 Las actividades ADN polimerasa y primasa pueden evaluarse, por ejemplo pero sin limitación, poniendo en contacto un ADN molde y la enzima ADN polimerasa a ensayar en condiciones que permitan la amplificación de ADN, en presencia de al
20 menos dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), un tampón e iones de magnesio o manganeso como cofactores y en ausencia de cebadores añadidos externamente. Después de esta incubación, el producto de la reacción de amplificación se puede visualizar, por ejemplo, en un gel de electroforesis. Si los productos de amplificación se visualizan en el gel, entonces la ADN polimerasa utilizada en la reacción presenta
25 ambas actividades, ADN polimerasa, replicativa y primasa.

 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la ADN polimerasa parental de la familia B es la ADN polimerasa Bam35, la ADN polimerasa PRD1, la ADN polimerasa Cp-1, la ADN polimerasa His1, la ADN polimerasa His2 o la
30 ADN polimerasa phi29, o polipéptidos al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99 %, idénticos a cualquiera de ellas que tengan actividad ADN polimerasa (replicativa). En una realización más preferida, la ADN polimerasa parental de la familia B es la ADN polimerasa phi29 o la ADN polimerasa Bam35 o polipéptidos al menos 80 %
35 idénticos a cualquiera de ellas que tengan actividad ADN polimerasa (replicativa). En

una realización incluso más preferida, la ADN polimerasa parental de la familia B es la ADN polimerasa phi29 o la ADN polimerasa Bam35. En una realización particular, la ADN polimerasa parental de la familia B es la ADN polimerasa phi29.

5 El término "identidad", tal como se usa en el presente documento, en el contexto de describir dos o más secuencias polipeptídicas, se refiere a un porcentaje especificado de coincidencias de residuos de aminoácidos en las posiciones de un alineamiento de dos secuencias de aminoácidos. En la técnica son bien conocidos los métodos de alineamiento de secuencias para establecer comparaciones. Por tanto, el grado de identidad puede determinarse utilizando, por ejemplo, el método de Clustal
10 (Higgins, 1989, *CABIOS* 5: 151-153), el método de Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80: 726-730), el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.* 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 287 Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, 25 (WI)); BLAST o
15 BLASTN, EMBOSS Needle y FASTA (Altschul *et al.* 1999, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). Adicionalmente, para determinar el grado de identidad entre dos secuencias también puede utilizarse el algoritmo de Smith-Waterman.

La ADN polimerasa Bam35 es, preferiblemente, la enzima que comprende la
20 SEQ ID NO: 7. La ADN polimerasa phi29 es, preferiblemente, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 6. La ADN polimerasa PRD1 es, preferiblemente, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 75. La ADN polimerasa Cp-1 es, preferiblemente, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 76. La ADN polimerasa His1 es, preferiblemente, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 77. La ADN polimerasa
25 His2 es, preferiblemente, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 78.

En una realización particular de la ADN recombinante de la invención, esta comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, preferiblemente SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 3 corresponde a la ADN pPolB de
30 phi29 parental (SEQ ID NO: 6) que comprende su motivo KxY sustituido por la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 4 corresponde a la ADN pPolB de Bam35 parental (SEQ ID NO: 7) que comprende su motivo KxY sustituido por la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia de ácido
35 nucleico aislada, en lo sucesivo en el presente documento la "secuencia de ácido

nucleico de la invención”, que codifica la enzima ADNP recombinante de la invención. Preferiblemente, esta secuencia de ácido nucleico es ADNc.

Debido a la degeneración del código genético, varias secuencias de
5 nucleótidos pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos. Una "molécula de ácido nucleico aislada", "secuencia nucleotídica", "secuencia de ácido nucleico" o "polinucleótido" es una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) que se ha eliminado de su medio natural (es decir, se ha sometido a manipulación humana) y puede incluir ADN, ARN o derivados de ADN o de ARN, incluyendo ADNc. La secuencia de
10 nucleótidos de la presente invención puede o no estar modificada química o bioquímicamente y puede obtenerse artificialmente por medio de métodos de clonación y selección o por medio de secuenciación.

La secuencia de ácido nucleico de la invención puede codificar el polipéptido
15 maduro o una preproteína que consiste en un péptido señal unido a la enzima madura que debe procesarse posteriormente.

La secuencia de nucleótidos de la presente invención también puede comprender otros elementos, tales como intrones, secuencias no codificantes en los
20 extremos 3' y/o 5', sitios de unión a ribosomas, etc. Esta secuencia de nucleótidos también puede incluir secuencias que codifiquen aminoácidos adicionales que sean útiles para la purificación o estabilidad del polipéptido codificado.

La secuencia de ácido nucleico de la invención se puede incluir en una
25 construcción genética, preferiblemente en un vector de expresión. Dicha construcción genética también puede comprender una o más secuencias reguladoras de la expresión génica, tales como promotores, terminadores, potenciadores, etc.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética,
30 en lo sucesivo en el presente documento "la construcción genética de la invención", que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención. En una realización preferida, esta construcción genética es un vector de expresión.

La expresión "construcción génica", "construcción genética" o "construcción de
35 ácido nucleico" se refiere a una unidad funcional necesaria para transferir y/o expresar

un gen de interés, en este documento la secuencia de nucleótidos de la invención como se describe, y secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor, unidas operativamente a la secuencia que codifica la proteína. Se refiere a una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenario, que está aislado de un gen natural o
 5 que está modificado para que contenga segmentos de ácido nucleico de tal manera que de otro modo no existiría en la naturaleza. La expresión "construcción de ácido nucleico" es sinónima de la expresión "casete de expresión" cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias control necesarias para la expresión de la secuencia codificante.

10

El término "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención unida operativamente a segmentos adicionales que proporcionan la transcripción del péptido codificado. En general, para introducir un gen específico en una célula diana se usa un
 15 plásmido. Una vez que el vector de expresión está en el interior de la célula, la proteína codificada por el gen se produce por medio de los complejos ribosómicos de la maquinaria de transcripción y traducción celular. Con frecuencia el plásmido se modifica por ingeniería genética para que contenga secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y promotoras que conducen a una transcripción
 20 eficaz del gen transportado en el vector de expresión. El objetivo de un vector de expresión bien diseñado es la producción de grandes cantidades de ARN mensajero estable y, por lo tanto, de proteínas. Los vectores de expresión son herramientas básicas para la biotecnología y para la producción de proteínas, tales como enzimas. El vector de expresión de la invención se introduce en una célula hospedadora de
 25 modo que el vector permanezca como un constituyente cromosómico o como un vector autorreplicante extracromosómico.

El término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual un polipéptido se sintetiza a partir de un polinucleótido. El término incluye la transcripción del
 30 polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o polipéptido.

Son ejemplos de vectores de expresión los fagos, cósmidos, fagémidos, los cromosomas artificiales de levaduras (YAC, por las siglas del inglés *yeast artificial chromosomes*), los cromosomas artificiales de bacterias (BAC, por las siglas del inglés

35

bacterial artificial chromosomes), los cromosomas artificiales humanos (HAC, por las siglas del inglés *human artificial chromosomes*), o los vectores virales tales como adenovirus, retrovirus o lentivirus.

5 Los vectores de expresión apropiados para la inserción del polinucleótido de la invención son, preferiblemente, plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en procariontes tales como, por ejemplo: los plásmidos pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4 y pET, fagos y vectores "lanzadera", tales como pSA3 y pAT28; vectores de expresión en levaduras tales
 10 como el plásmido de 2 micrómetros de *Saccharomyces cerevisiae*, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares; vectores de expresión en células de insecto tales como los vectores de las series pAC y pVL; vectores de expresión en células vegetales tales como las series piBi, pEarleyGate, PAVA, pCAMBIA, PGSA, PGWB, PMDC, PMY, pore y similares, y otros plásmidos de
 15 expresión de proteínas utilizados en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para la transfección celular. En una realización más preferida, el vector de expresión es un plásmido pET23a.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora, en lo
 20 sucesivo en el presente documento "la célula hospedadora de la invención", que comprende la secuencia de ácido nucleico o la construcción genética de la invención.

La expresión "célula hospedadora", como se usa en esta descripción, se refiere a cualquier célula procarionte o eucariota que pueda ser receptora de un vector de
 25 expresión, vector de clonación o cualquier otra molécula de ADN exógeno. Por lo tanto, la expresión incluye cualquier célula cultivable que pueda modificarse a través de la introducción de ADN que no esté contenido en ella de manera natural. Preferiblemente, una célula hospedadora es aquella en la que puede expresarse el polinucleótido de la invención, dando lugar a un polipéptido estable, modificado
 30 postraduccionalmente y localizado en el compartimiento subcelular apropiado. La elección de una célula hospedadora apropiada también puede verse influenciada por la elección de la señal de detección. Por ejemplo, el uso de construcciones con genes reporteros (por ejemplo, *lacZ*, luciferasa, timidina quinasa o proteína verde fluorescente "GFP") puede proporcionar una señal seleccionable mediante la
 35 activación o inhibición de la transcripción del gen de interés en respuesta a una

proteína que regula la transcripción. Para lograr una selección o cribado óptimos, debe tenerse en cuenta el fenotipo de la célula hospedadora.

5 En una realización preferida de la célula hospedadora de la invención, esta es una célula de *E. coli*.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención para la producción (expresión) de la enzima ADNP recombinante de la invención.

15 La célula hospedadora de la invención se puede cultivar para dicha finalidad. Un "cultivo de células hospedadoras" se refiere al proceso de mantenimiento y crecimiento *in vitro* de las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de temperatura, pH, porcentajes de gases (oxígeno y dióxido de carbono), además de la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular. Los cultivos celulares pueden llevarse a cabo en sustratos sólidos, tales como agar o en un medio líquido, lo que permite el cultivo de grandes cantidades de células en suspensión. Las condiciones de cultivo *in vitro* dependerán del tipo de célula hospedadora seleccionada y sus requisitos. Los expertos en la materia sabrán qué condiciones y requisitos de cultivo específicos deberían aplicarse en cada caso.

25 Una vez que se ha cultivado la célula hospedadora de la invención y se ha expresado la enzima ADNP recombinante de la invención, esta puede purificarse. El término "purificar", como se usa en la descripción, se refiere al aislamiento de la enzima ADNP recombinante de la invención y su concentración, a partir de los otros polipéptidos presentes en el medio de cultivo de la célula hospedadora de la invención. El aislamiento de la enzima puede llevarse a cabo utilizando técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden basarse en el peso molecular, la carga iónica (basada en el estado de ionización de los aminoácidos en condiciones de trabajo), la afinidad de la proteína por determinadas matrices o columnas cromatográficas, o mediante etiquetas de purificación, y puede llevarse a cabo en una columna, un papel o una placa. El aislamiento de la proteína puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, por las siglas

30

35

del inglés, *fast protein liquid chromatography*) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*), utilizando sistemas automatizados que reducen significativamente el tiempo de purificación y aumentan la eficacia de la purificación.

5

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para amplificar o replicar un ADN molde, en lo sucesivo en el presente documento "el kit de la invención", que comprende los siguientes elementos:

- 10 a. la ADNP recombinante de la invención,
- b. al menos un tampón,
- c. dNTPs y
- d. iones de magnesio o manganeso, preferiblemente iones de manganeso.

Preferiblemente, este kit de la invención no comprende oligonucleótidos o
15 cebadores.

El "tampón", al que se hace referencia en la presente descripción y en las reivindicaciones, puede seleccionarse, por ejemplo y sin limitación, de la lista que consiste en: clorhidrato de tris (Tris-HCL), tris-acético, HEPES, BSA, Tween20,
20 glicerol, EDTA, DTT, beta-mercaptoetanol, o cualquier combinación de los mismos.

La expresión "dNTPs" se refiere a desoxinucleósidos trifosfato, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP o derivados de los mismos. Preferiblemente, los desoxinucleósidos trifosfato utilizados en la presente
25 invención son dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Incluso más preferiblemente, estos cuatro dNTPs están en condiciones equimolares en el kit de la invención y en los métodos de la invención descritos más adelante.

En general, el kit de la invención comprende todos los reactivos necesarios
30 para llevar a cabo los métodos de la invención descritos más adelante. El kit también puede incluir, sin ningún tipo de limitación, otros tampones, por ejemplo para controlar el pH, enzimas, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, otras polimerasas, helicasas, topoisomerasas y enzimas similares, cofactores para obtener una actividad óptima de las mismas, reactivos para prevenir la contaminación, etc. Asimismo, el kit
35 puede incluir todos los soportes, dispositivos y receptáculos necesarios para su

implementación y optimización. El kit también puede contener otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que pueden servir como controles positivos y/o negativos. Preferiblemente, el kit también comprende las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención descritos más adelante.

5

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la enzima ADNP recombinante de la invención o del kit de la invención para la amplificación o replicación *in vitro* de un ADN molde.

10

El término "amplificación", como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, se refiere a aumentar el número de copias de un ADN molde.

15

El término "replicación", como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, se refiere a la síntesis de ADN complementario a partir de un ADN molde.

20

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la amplificación o replicación del ADN molde se realiza en ausencia de oligonucleótidos (cebadores) añadidos externamente.

25

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una enzima ADN polimerasa que comprende el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o de un kit que comprende dicha enzima ADN polimerasa y los elementos (b) a (d) del kit de la invención que se han mencionado anteriormente, para la amplificación o replicación *in vitro* de un ADN molde en ausencia de oligonucleótidos (cebadores) añadidos externamente.

30

Las expresiones "en ausencia de oligonucleótidos (cebadores) añadidos externamente" y "actividad independiente de cebadores", como se usan en la presente invención, significan que la reacción de amplificación o replicación no está provista externamente con cebadores presintetizados.

35

Las "enzimas ADN polimerasas que comprenden el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1", comprenden dicha secuencia de aminoácidos al final del último dominio palm y además comprenden preferiblemente un motivo PolC que es TTD, lo

que supone una diferencia con las pPolB, ya que las pPolB tienen un motivo PolC que es DxD donde "x" es cualquier aminoácido.

5 Ejemplos de ADN polimerasas que comprenden el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 son, pero sin limitación, las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 o cualquiera de las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 9 a 42. Las ADN polimerasas que comprenden el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 y que tienen al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96%, 97%, 98 % o 99 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 8 o con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 9 a 42, también están comprendidas dentro de este aspecto de la invención. Ejemplos de ADN polimerasas que comprenden el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 y que tienen al menos un 70 % de identidad de secuencia con estas secuencias son las SEQ ID NO: 43 y 44.

15

En una realización preferida, la enzima ADN polimerasa que comprende el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, esta SEQ ID NO: 2 está codificada por la secuencia de ácido nucleico con codones optimizados de SEQ ID NO: 45.

20

La expresión "ADN molde" se refiere a una molécula de ADN que se va a copiar, replicar o amplificar en un método de amplificación a través de la síntesis de una cadena de ADN complementaria; es decir, se refiere a una molécula de ADN que se replicará o amplificará. El ADN molde puede ser, pero sin limitación, ADN plasmídico o ADN genómico, más preferiblemente ADN genómico. En otra realización preferida, el ADN molde de la presente invención es el genoma completo comprendido en una célula.

25

En otra realización preferida de la presente invención, el ADN molde al que se hace referencia a lo largo de la descripción y las reivindicaciones es lineal o circular, donde dicho ADN lineal o circular puede ser bicatenario (cadena doble) o monocatenario (cadena sencilla). Más preferiblemente, el ADN molde al que se hace referencia en la presente invención es monocatenario; incluso más preferiblemente ADN monocatenario circular.

35

El ADN molde al que se hace referencia a lo largo de la presente invención puede ser ADN dañado o no dañado. Preferiblemente, es ADN dañado. El "ADN dañado" es un ADN que comprende daños en su secuencia, donde dichos daños preferiblemente bloquean la síntesis de ADN por ADNPs replicativas. Preferiblemente, este daño es causado, por ejemplo, por la presencia de uno o más sitios abásicos, bases oxidadas tales como timinglicol (Tg), o desafíos genotóxicos relacionados con agentes que dañan el ADN tales como la exposición a mitomicina C (MMC) o la irradiación con luz ultravioleta. Más preferiblemente, el ADN dañado comprende daños no voluminosos en bases.

10

En la técnica se conoce una gran cantidad de métodos que permiten la amplificación del ADN. Algunos métodos requieren un proceso de termociclado, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*). Otros métodos no requieren un proceso de termociclado, sino que se llevan a cabo a una temperatura esencialmente constante, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, amplificación por círculo rodante (RCA, *rolling circle amplification*), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, *multiple displacement amplification*), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, *strand displacement amplification*) o amplificación mediada por bucle (LAMP, *loop mediated amplification*), entre otros.

20

En otra realización preferida de la presente invención, la amplificación del ADN molde a la que se hace referencia a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, se realiza mediante una técnica seleccionada de la lista que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA, *nucleic acid sequence based amplification*), reacción en cadena de la ligasa (LCR, *ligase chain reaction*), amplificación dependiente de helicasa (HDA, *helicase dependent amplification*), método de amplificación por ramificación (RAM, *ramification amplification method*) o amplificación mediada por bucle (LAMP). Más preferiblemente, la amplificación se realiza por RCA.

25

30

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro*, en lo sucesivo en el presente documento "el primer método de la invención", para amplificar o replicar un

35

ADN molde que comprende:

- a. poner en contacto un ADN molde con una mezcla de reacción que comprende:
 - la enzima ADNP recombinante de la invención,
 - un tampón,
 - 5 - iones de magnesio o manganeso, preferiblemente iones de manganeso, y
 - dNTPs, y
- b. incubar el ADN molde con la mezcla de reacción en condiciones que permitan la amplificación del ADN.

10 En una realización preferida de este primer método de la invención, la mezcla de reacción no comprende oligonucleótidos (cebadores).

 El término "cebador" u "oligonucleótido" se refiere a oligonucleótidos de ADN o ARN cortos, por ejemplo de 18-22 bases, que son complementarios a la secuencia de un determinado ácido nucleico molde, y que actúan como punto de partida para la adición de nucleótidos en el proceso de copia de una cadena complementaria a la secuencia de dicho ácido nucleico molde, por ejemplo, pero sin limitación, en una PCR. El término "cebador" se refiere por lo tanto a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de partida de la síntesis de ADN cuando está en condiciones de extensión del cebador.

15

20

 Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro*, en lo sucesivo en el presente documento "el segundo método de la invención", para amplificar o replicar un ADN molde que comprende:

- a. poner en contacto un ADN molde con una mezcla de reacción que comprende:
 - una enzima ADN polimerasa que comprende el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 o un kit que comprende dicha enzima ADN polimerasa,
 - un tampón,
 - iones de magnesio o manganeso, preferiblemente iones de manganeso, y
 - 30 - dNTPs, y
- b. incubar el ADN molde con la mezcla de reacción en condiciones que permitan la amplificación del ADN,
 - donde la mezcla de reacción de la etapa (a) no comprende oligonucleótidos (cebadores).

35

En una realización preferida del segundo método de la invención, la enzima ADN polimerasa que comprende el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, esta SEQ ID NO: 2 está codificada por la secuencia de ácido nucleico optimizada de SEQ ID NO: 45.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, el ADN molde es lineal o circular, donde dicho ADN lineal o circular puede ser bicatenario o monocatenario. Más preferiblemente, el ADN molde es monocatenario; incluso más preferiblemente ADN monocatenario circular.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, si el ADN molde es bicatenario, estos métodos comprenden además una etapa adicional, antes de la etapa (a), de desnaturalización del ADN molde. Esta desnaturalización puede consistir, por ejemplo, y sin limitación, en el uso de enzimas capaces de desenrollar el ADN de una estructura bicatenaria a una estructura monocatenaria para facilitar la replicación de cada cadena, dichas enzimas pueden ser, por ejemplo, helicasa y/o topoisomerasa II.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, la amplificación del ADN molde se realiza mediante una técnica seleccionada de la lista que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), método de amplificación por ramificación (RAM) o amplificación mediada por bucle (LAMP). Más preferiblemente, la amplificación se realiza por RCA.

Se entiende que "poner en contacto" es que el ADN molde y la mezcla de reacción se incuban en condiciones de extensión del ADN. La expresión "condiciones de extensión del ADN" o "condiciones que permiten la amplificación del ADN" hace referencia a las condiciones en las cuales puede tener lugar la síntesis dependiente de ADN molde.

35

La expresión "condiciones que permiten la amplificación del ADN" se refiere a las condiciones en las cuales puede tener lugar la incorporación de los nucleótidos a un ADN naciente por medio de la complementariedad de bases con un ácido nucleico molde. En general, las condiciones en las cuales se realiza la amplificación de ADN
5 incluyen: (a) poner en contacto el ácido nucleico molde con la ADN polimerasa en una mezcla que también comprenda un catión divalente, por ejemplo, magnesio o manganeso, y nucleótidos, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura y tiempo suficientes para que la ADN polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al ADN naciente por medio de la complementariedad de bases con el ácido nucleico
10 molde y dé lugar a una población de moléculas de ADN complementarias de diferentes tamaños.

En algunas realizaciones preferidas de los métodos de replicación o amplificación de la invención, al menos un dNTP se marca mediante técnicas bien
15 conocidas en la materia. Las etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, la
20 concentración de la enzima ADN polimerasa es de entre 50 nM y 100 μ M, más preferiblemente 500 nM.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, la
concentración de los dNTPs es de entre 100 nM y 1 mM, más preferiblemente entre
25 100 nM y 500 μ M, incluso más preferiblemente entre 10 μ M y 100 μ M.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, el
tampón tiene un pH de entre 7,0 y 8,5.

30 En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, la concentración de los iones de magnesio y manganeso es de entre 0,1 y 20 mM.

En otra realización preferida del primer y segundo método de la invención, la
incubación de la etapa (b) tiene lugar a una temperatura constante de entre 20 y 40 °C
35 y durante entre 5 min y 24 h.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto familiarizado con la técnica a la cual pertenece la presente invención. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención resultarán obvias para los expertos en la técnica tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. La piPoIB recombinante de la pipolina de *E. coli* 3-373-03_S1_C2, es una ADNP activa y fiable con actividad de corrección de errores intrínseca. (A) Ensayos de extensión de cebador con un sustrato dúplex molde de oligonucleótido/cebador (1 nM) como se representa sobre el gel (SEQ ID NO: 79). Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 30 °C en presencia de 10 nM de una variante de piPoIB deficiente en polimerasa D368A o de tipo silvestre (TS), la cantidad indicada de dNTPs y desencadenado con MgCl₂ 10 mM. Cuando se indica, como control se utilizó la ADN polimerasa de Φ 29 (Φ 29). A la derecha se indican las posiciones del sustrato 15-mer y los productos de degradación y polimerización. (B) Preferencia de inserción de nucleótidos por la variante de piPoIB deficiente en exonucleasa D59A/E61A en presencia de cantidades crecientes de cada dNTP como se indica. Molde sobre el gel (SEQ ID NO: 80).

FIG. 2. Caracterización de la capacidad de STL eficaz de piPoIB. (A) Experimento de extensión de cebador frente a un molde que contiene el sitio abásico. El ensayo se llevó a cabo como se indica en la Figura 1A, pero con un sustrato molde/cebador que contenía un análogo del sitio abásico de THF (F) como se representa encima del gel (SEQ ID NO: 81). (B) Seguimiento paso a paso de la replicación de piPoIB del molde que contiene THF por adición secuencial de los dNTP (0,1 μ M), como se indica. El sustrato se representa encima del gel (SEQ ID NO: 82) y se indica el tamaño esperado. Las posiciones del sustrato 15-mer, así como los

marcadores 19, 22 y 33-mer (carril M), también se indican a la derecha. (C) Efecto de cofactores metálicos divalentes sobre la capacidad de polimerización de piPolB en moldes dañados y no dañados (SEQ ID NO: 83). Las reacciones se desencadenaron con $MnCl_2$ 1 mM o $MgCl_2$ 10 mM, como se indica. (D) Capacidad de STL de piPolB en moldes dañados de ADN alternativos, que contienen timinglicol (Tg) o dímeros de timina ciclobutano (T:T) (SEQ ID NO: 83) desencadenados por la presencia de iones de manganeso o magnesio.

FIG. 3. Síntesis de ADN independiente de cebador por piPolB de pipolinas. Electroforesis de agarosa alcalina (A) y TAE no desnaturizante (B) de productos de replicación de ADN M13. Los ensayos (20 μ l) se llevaron a cabo en presencia de 20 nmoles de ADNmc de M13 cebado (carriles 1, 3-8) o no cebado (carriles 9-15), dNTPs 100 μ M y [$\alpha^{32}P$]dATP 1 μ Ci. Las variantes de tipo silvestre, D368A y D59A/E61A de piPolB se ensayaron a 500 nM o, cuando se indica, a concentraciones decrecientes de piPolB de tipo silvestre (500, 250, 100 y 50 nM, carriles 3-6 y 10-13). Por referencia, como control se utilizó ADN polimerasa de Φ 29 100 nM (carriles 1 y 9). Como controles negativos (carriles 16-19) también se realizaron ensayos de control sin molde de ADN de entrada. Las reacciones se incubaron durante 20 min a 30 °C y, después de la adición de solución de parada (EDTA 50 mM, SDS al 0,5 %), se dividieron para cargar las mismas muestras en ambos geles. Para más detalles véanse los métodos de STAR. Los marcadores de ADN λ (carriles 2 y 20) y la unidad de la longitud de ADNmc de M13 (flecha) se indican a la derecha. (C) Electroforesis de agarosa TAE no desnaturizante de los productos de replicación M13 en presencia de dNTPs 100 μ M (carriles 1-3 y 7-9) o NTPs (carriles 4-6 y 10-12), como se indica. Los ensayos de replicación se realizaron con variantes de piPolB de tipo silvestre o D59A/E61A y se desencadenó con $MgCl_2$ 10 mM (carriles 1-6) o $MnCl_2$ 1 mM (carriles 7-12). (D) Síntesis de cebador y replicación de molde de ADN poli-dT homopolimérico (1 μ M) mediante piPolB (500 nM). Las reacciones se desencadenaron con $MnCl_2$ 1 mM y se resolvieron mediante PAGE al 20 % - urea 8M a alta resolución. Los cebadores P4, P10, P15 y 33A (véase la Tabla 2) marcados con ^{32}P en el extremo 5', se cargaron como marcadores de tamaño (carril M), y el tamaño de los productos más cortos detectados se indica a la derecha.

FIG. 4. Síntesis de ADN de novo por piPolB. (A) Síntesis de cebador por piPolB. Se incubó ADN de M13 con dNTPs o NTPs (100 μ M) y piPolB de tipo silvestre

(WT, *wild type*) o las variantes deficientes en polimerasa (D368A) o exonucleasa (D59A/E61A) (500 nM). Los productos detectados se marcaron con [γ ³²P]ATP (1 μ Ci) que solo podía incorporarse en la posición 5' de los cebadores recién sintetizados. (B) Preferencia de inserción para las primeras etapas de la síntesis de ADN cebador
 5 mediante la piPolB deficiente en exonucleasa. El ensayo se realizó como en el panel A pero con cada dNTP (100 μ M) proporcionado independientemente o en las combinaciones indicadas. Las reacciones se desencadenaron con MgCl₂ 10 mM o MnCl₂ 1 mM y se resolvieron mediante PAGE al 20 % - urea 8M a alta resolución.

10 **FIG. 5. El residuo K613 invariable de las piPolB desempeña un papel en la STL y en la síntesis de cebador *de novo*.** (A) Ensayos de extensión de cebador de las piPolB de tipo silvestre, K613A y H614A, con etiqueta de His. Los ensayos se realizaron durante 10 minutos a 30 °C en presencia de dúplex cebador/molde 1 nM, dNTPs 10 μ M y la concentración indicada de variantes de piPolB. (B) Síntesis de
 15 cebador por las piPolB de tipo silvestre, K613A y H614A, con etiqueta de His. (C) Comparación de la capacidad de extensión de cebador de las piPolB de tipo silvestre y K613A con etiqueta de His, frente a moldes no dañados (X = T) o dañados (X = THF) (SEQ ID NO: 83). Las reacciones se desencadenaron con MnCl₂ 1 mM y se resolvieron mediante PAGE al 20 % - urea 8M.

20

FIG. 6. Supervivencia de células de *E. coli* (DE3) que expresan variantes de piPolB de tipo silvestre o D368A inactiva después de exposiciones a daños en el ADN. Los gráficos muestran la supervivencia relativa (media y error estándar de cuatro experimentos independientes) de células que sobreexpresan variantes de
 25 piPolB deficientes en polimerización de ADN o de tipo silvestre después de la exposición genotóxica con MMC (A) o irradiación con luz UV (B).

FIG. 7. Efecto del contexto de secuencia y concentración de la enzima sobre la capacidad de STL por piPolB. (A) Análisis en PAGE desnaturizante de
 30 productos de extensión de cebador por la ADN polimerasa de Φ 29 (Φ 29) y piPolB. Como se indica, las variantes de piPolB de tipo silvestre, D368A (deficiente en polimerasa) y D59A/E61A (deficiente en exonucleasa) se ensayaron utilizando dos contextos de secuencia diferentes (carriles 1-10, SEQ ID NO: 83, frente a 11-20, SEQ ID NO: 84), en ausencia (carriles 1-5 y 11-15) o en presencia (carriles 6-10 y 16-20) de
 35 un análogo de sitio abásico de THF. Las representaciones esquemáticas de cada

5 sustrato molde/cebador se representan arriba. (B) Replicación procesiva de sustratos cebador/molde disminuyendo las concentraciones de piPolB de tipo silvestre. Las reacciones se realizaron en presencia de dNTPs 1 μ M (carriles 1-9) o 100 μ M (carriles 10-18) para moldes no dañados (SEQ ID NO:79) o dañados (SEQ ID NO: 81), respectivamente.

10 **FIG. 8. Capacidad de desplazamiento de cadena de piPolB.** Análisis con PAGE desnaturizante de replicación de un dúplex cebador/molde con hueco (SEQ ID NO: 79) (carriles 1-7) o con un hueco de 5 nucleótidos (carriles 8-14) obtenido con un oligonucleótido aguas abajo (P20-33, Tabla 2) que debe desplazarse para reanudar la replicación mediante piPolB (carriles 6-7 y 13-14). Como controles positivos y negativos, se usaron variantes de tipo silvestre y Δ TPR2 de la ADN polimerasa de Φ 29, respectivamente.

15 **FIG. 9. Efecto de los cationes divalentes sobre la replicación *de novo* del sustrato de ADNmc homopolimérico mediante piPolB.** Síntesis de cebador y replicación de molde de ADN poli-dT homopolimérico (1 μ M) mediante variantes de piPolB de tipo silvestre (WT) o deficiente en exonucleasa (D59A/E61A) (500 nM). Las reacciones se desencadenaron con $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM y se resolvieron mediante PAGE al 20 % - urea 8M a alta resolución. Los cebadores P4, P10, P15 y 20 33A (véase la Tabla 2) marcados con ^{32}P en el extremo 5', se cargaron como marcadores de tamaño (carril M), y el tamaño de los productos más cortos detectados se indica a la izquierda y a la derecha, respectivamente.

25 **FIG. 10. Pequeño efecto de modificaciones individuales de la secuencia molde en la replicación *de novo* del sustrato de ADNmc homopolimérico mediante piPolB.** Los moldes de ADNmc alternativos se representan encima del gel (SEQ ID NO: 69 a 73).

30 **FIG. 11. Capacidades polimerasa y primasa de las variantes de piPolB en los residuos análogos del motivo KxY de PolB.** Capacidad de extensión de cebador (A) y de síntesis de cebador (B) de las piPolB de tipo silvestre, K623A y R625A con etiqueta de His. Los ensayos se realizaron como se describe en la Figura 4. Por referencia, en el panel B también se incluyeron variantes de piPolB de tipo silvestre y 35 deficientes en exonucleasa y polimerasa sin etiqueta de His.

EJEMPLOS

Para ilustrar la invención se proporcionan los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la misma. Dichos ejemplos se basan en ensayos
 5 llevados a cabo por los inventores y muestran la actividad de replicación eficaz, independiente de cebador, de la piPolB de SEQ ID NO: 2, así como su capacidad de síntesis de translesión.

Ejemplo 1. Un nuevo grupo principal de ADN polimerasas de la familia B.

10 Las búsquedas con PSI-BLAST frente a la base de datos del genoma bacteriano RefSeq en NCBI sembrado con la secuencia de la pPolB experimentalmente caracterizada del bacteriófago Bam35 (NP_943751), recuperaron numerosos resultados con similitud a las PolBs. Estas pudieron categorizarse en dos grupos: (i) resultados muy significativos (38-99% de identidad de secuencia) para las
 15 pPolBs codificadas dentro de los cóntigos genómicos relacionados con los bacteriófagos Bam35 (familia *Tectiviridae*) y Φ 29 (subfamilia *Picovirinae*, familia *Podoviridae*); (ii) resultados para homólogos de pPolB muy divergentes codificados en cromosomas y diversos plásmidos de bacterias muy diversas, tales como *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Las últimas proteínas mostraron una identidad de
 20 secuencia de ~ 16-20 % con la pPolB de Bam35. No obstante, el análisis de múltiples alineamientos de secuencia de estas supuestas ADNPs divergentes mostró que todas ellas contienen los subdominios TPR1 y TPR2, un sello distintivo de las pPolBs, y los residuos del sitio activo de los dominios de exonucleasa y ADN polimerasa de las PolBs están conservados, aunque con notables variaciones dentro de los motivos KxY
 25 y PolC. El motivo PolC (DTD) está casi universalmente conservado en las PolBs y contiene dos residuos de ácido aspártico catalítico necesarios para la actividad de la proteína. En la presente invención, se observó que en todos los miembros del nuevo grupo piPolB, el primero de los dos aspartatos dentro del motivo PolC está sustituido por un resto de treonina (TTD). De manera destacable, algunas pPolBs de arqueas
 30 también muestran variación dentro de este motivo, pero ninguna de estas proteínas se ha caracterizado experimentalmente.

Búsquedas adicionales sembradas con secuencias representativas del nuevo grupo PolB de proteobacterias, tales como bacterias de *Escherichia coli* (KDU42669) o
 35 *Rhodobacterales* Y4I (WP_008555115), produjeron resultados significativos con

respecto a varios homólogos codificados por plásmidos mitocondriales circulares similares a pCRY1. De manera destacable, los últimos plásmidos son distintos de los plásmidos mitocondriales lineales tan estudiados que codifican las pPolBs (véase a continuación). El análisis de secuencia de las proteínas mitocondriales confirmó su estrecha similitud con el grupo divergente de PolBs bacterianas.

Para comprender mejor la relación entre el grupo recientemente descubierto de ADNPs y las pPolBs, se realizó un análisis filogenético de máxima probabilidad de secuencias representativas de todos los clados de pPolBs conocidos, incluidos virus de bacterias, arqueas y eucariotas, casposones, polintones, así como plásmidos lineales eucariotas citoplasmáticos y mitocondriales. En el árbol filogenético enraizado con secuencias de rPolB, todas las pPolBs previamente caracterizadas formaron un clado monofilético bien confirmado, con un patrón de ramificación coherente con análisis filogenéticos previos. Las nuevas ADNPs formaron un clado distinto, bien confirmado, que en la presente invención se denominó "piPolB" (véase a continuación), separado de las pPolBs restantes, sugiriendo que ha divergido al principio de la evolución de las PolBs. Por tanto, las piPolB representan el tercer grupo principal de las PolBs, junto con las rPolBs y pPolBs.

Dentro del clado piPolB, hay dos grupos principales, que son más o menos congruentes con la taxonomía bacteriana. El primero incluye predominantemente secuencias de *Actinobacteria* y diversos órdenes de *Firmicutes*, en concreto, *Bacillales*, *Lactobacillales* y *Clostridiales*. El segundo grupo contiene secuencias de diferentes clases de *Proteobacteria*, en concreto *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*. De manera destacable, el último grupo también incluye las piPolBs de plásmidos mitocondriales circulares que se agrupan con secuencias de alfa proteobacteria. Aunque el último grupo no está muy confirmado en este análisis, esta observación es más coherente con la posibilidad de que las piPolBs se importaran en eucariotas junto con el simbionte alfa proteobacteriano en el origen de las mitocondrias. Por tanto, las piPolBs parecen haber coevolucionado con sus hospedadores durante un período de tiempo prolongado, a pesar de varios casos posibles de transferencia horizontal de genes.

Ejemplo 2. Las piPolBs están codificadas dentro de un nuevo grupo de elementos autorreplicantes.

El análisis de contexto genómico proporcionó pruebas convincentes de que la mayoría de las piPolBs están codificadas dentro de los EGM (elementos genéticos móviles) integrados en los cromosomas bacterianos. A diferencia de los casposones y polintones, que se integran en el genoma utilizando endonucleasas similares a Cas1 e integrasas de la familia similar a retrovirus, respectivamente, la inmensa mayoría de los EGM que llevan piPolB codifican integrasas de la superfamilia de tirosina recombinasas (integrasas Y). Algunos de los elementos llevan copias adicionales de integrasas Y o integrasas/invertasas de la superfamilia de las serina recombinasas. No obstante, diversos homólogos piPolB bacterianos y todos los mitocondriales están codificados por plásmidos extracromosómicos, en lugar de integrados, y, por consiguiente, carecen de los genes integrasa, lo que sugiere que la integración en el cromosoma es opcional para estos elementos. Por tanto, en la presente invención, todos estos nuevos elementos bacterianos y mitocondriales se denominaron *pipolinas* (por elementos genéticos móviles codificantes de piPolB).

La integración de los EGM deja una marca molecular en el cromosoma celular que se manifiesta en forma de repeticiones directas, correspondiente a los sitios de inserción izquierdo y derecho (*attL* y *attR*, del inglés *left attachment* y *right attachment*), que flanquean el elemento integrado. Las integrasas Y típicamente catalizan la recombinación entre sitios homólogos presentes en el genoma celular y las moléculas de ADNbc circular de los EGM. Un análisis exhaustivo de las regiones genómicas que abarcan las piPolB, permitió definir los sitios de integración exactos de muchas pipolinas de diversos taxones bacterianos. La inmensa mayoría de las integraciones ocurrieron dentro de los genes de ARNt, como es habitual para los EGM de bacterias y arqueas que emplean integrasas Y. Algunas bacterias llevan más de una pipolina. Por ejemplo, el genoma de *Vibrio vulnificus* contiene dos elementos relacionados que codifican piPolB insertados en diferentes genes de ARNt.

El análisis genómico comparativo de las pipolinas mostró que forman grupos que generalmente son coherentes con la filogenia de las piPolBs. La similitud entre elementos de hospedadores distantemente relacionados se limita a los genes de piPolB y, en menor medida, de integrasa Y. Además de piPolB e integrasas, a menudo las pipolinas codifican excisionasas, que ayudan en la escisión de los EGM integrados; componentes de sistemas de modificación de restricción de tipo I y tipo II; y varios

componentes de la maquinaria de movilización de plásmidos. Además, los genes menos conservados que se encuentran en las pipolinas codifican diferentes proteínas de unión al ADN con motivos cinta-hélice-hélice, dedo de zinc o hélice-giro-hélice, aunque también proteínas de cromatina H-NS similares a histona, varias nucleasas y sistemas toxina-antitoxina. Ninguno de los elementos codifica proteínas específicas de virus. Por el contrario, el pangenoma de las pipolinas consiste en varios genes típicos de plásmidos. De hecho, el análisis BLASTP muestra que la mayoría de los genes pipolina están conservados en varios plásmidos no relacionados. De acuerdo con esta afirmación, cuatro de las piPolBs bacterianas y cinco mitocondriales están codificadas por plásmidos circulares. De manera destacable, los plásmidos mitocondriales no llevan otros genes que los que codifican piPolB, lo que sugiere que después de la introducción de un ancestro mitocondrial en un hospedador protoeucariota, los EGM experimentaron evolución reduccionista, perdiendo todos los genes excepto los de piPolB.

Aunque la piPolB es la única proteína asociada a la replicación del ADN conservada en todas las pipolinas, algunos elementos codifican supuestas helicasas de las superfamilias 1 y 2; exonucleasas 3'-5'; uracil-ADN glicosilasas; ribonucleasas H; y una ATPasa AAA+ similar a Orc1/Cdc6. A diferencia de los plásmidos y virus que codifican pPolB que, como regla, tienen genomas lineales, las pipolinas representan moléculas de ADNbc circular y, por lo tanto, es poco probable que el mecanismo de cebado por proteína sea aplicable. La abrumadora mayoría (94%) de los virus de ADNbc que codifican las ADNP cebadas por ARN, también codifican sus propias primasas. Por el contrario, ninguna de las pipolinas posee genes para primasas reconocibles, lo que plantea preguntas sobre el mecanismo de cebado.

En conjunto, los resultados de los análisis genómicos filogenéticos y comparativos subrayan la singularidad de las piPolBs y pipolinas, que se pueden considerar como la tercera gran superfamilia de EGM autorreplicantes, junto con los polintones y casposones.

Ejemplo 3. La ADN polimerasa pipolina es una replicasa competente.

Para verificar si las piPolBs eran verdaderamente ADNPs activas, se eligió una enzima representativa de la pipolina de *E. coli* 3-373-03-S1_C2 (SEQ ID NO: 2) y se

purificó su forma recombinante. Primero se analizaron las actividades sintéticas y degradativas de esta proteína en un ensayo de extensión de cebador, en presencia de concentraciones crecientes de dNTPs (Figura 1A, carriles 4-9). Como se esperaba, en ausencia de dNTPs, solo pudieron detectarse productos de degradación. Sin embargo, la adición de los dNTPs dio como resultado un cambio de actividad de exonucleólisis a polimerización, indicando que ambas actividades están coordinadas. Las variantes de proteínas con actividades deficientes de polimerización (D368A, Figura 1A, carriles 10-11 y Figura 7A) o exonucleasa (D59A/E61A, Figura 7A), confirmaron que las capacidades 5'-3' sintéticas y 3'-5' degradativas son intrínsecas para la piPolB purificada recombinante. La presencia de actividad de polimerización de ADN competente en piPolB confirma que para la coordinación con los cofactores metálicos, solo se requiere el segundo grupo carboxilato en el motivo PolC, en consonancia con las sugerencias anteriores de que el primer resto de aspartato conservado en el motivo PolC en los grupos pPolB y rPolB, tiene un papel estructural en lugar de catalítico.

Para caracterizar adicionalmente la actividad de polimerización de ADN de piPolB, se analizó la preferencia de inserción para los pares de bases de Watson y Crick utilizando la variante de piPolB deficiente en exonucleasa, D59A/E61A. Tal como se muestra en la Figura 1B, la inserción del nucleótido correcto podría detectarse a una concentración de dNTP aproximadamente 1000 veces menor en comparación con la del dNTP incorrecto, lo que indica una preferencia muy fuerte por la inserción del nucleótido complementario. Estos resultados confirman que la piPolB de las pipolinas es una ADN polimerasa eficaz y fiable, como se esperaría de una ADNP replicativa de la familia B.

Ejemplo 4. La piPolB está dotada de síntesis de translesión intrínseca a través del ADN que contiene análogos de nucleótidos no voluminosos.

Los sitios abásicos (AP) constituyen la lesión de ADN más habitual que puede surgir de la despurinación espontánea, pero también se presenta como productos intermedios en la reparación de la escisión de bases. Un modelo predominante es que las ADNP replicativas de alta fidelidad no pueden replicar a través de dichas lesiones en el ADN, lo que conduce a detener la replicación y al desencadenamiento posterior de los mecanismos de tolerancia al daño del ADN, lo que implica ADNPs especializadas que pueden evitar el daño del ADN por síntesis de translesión (STL).

Adicionalmente, trabajos recientes comunicaron ejemplos de STL por replicasas celulares y víricas de las familias A, B o C durante la replicación procesiva del genoma. Por tanto, para determinar si piPolB era capaz de replicar moldes dañados, primero se analizó la extensión del cebador frente a un dominio de tetrahydrofurano (THF), un análogo estable de un sitio abásico, en la primera posición nucleotídica del molde. Tal como se muestra en la Figura 2A, piPolB es capaz de insertar el primer nucleótido y extender el cebador más allá del THF (líneas 4-9), mientras que, tal como se esperaba, la ADN Φ 29 solo dio lugar a una replicación insignificante (líneas 2-3). La capacidad de evitar el error a menudo depende del contexto de la secuencia y está contrarrestada por la actividad de corrección de errores. Sin embargo, la capacidad de STL de piPolB no parece verse afectada por el contexto de la secuencia molde (Figura 7A). En el sitio de la lesión pudo detectarse una banda minoritaria (16-mer) de producto parcial, lo que sugiere que, como se mostró previamente para la ADN Φ de Bam35, la elongación del cebador más allá del sitio abásico es una etapa limitante en la STL mediante piPolB, a pesar de que la replicación de ambos moldes de oligonucleótidos no dañados y dañados puede ser procesiva (Figura 7B).

Después, se analizó la preferencia de incorporación frente al sitio de THF. Utilizando la variante D59A/E61A deficiente en exonucleasa, se descubrió que piPolB inserta preferiblemente purinas sobre pirimidinas (Figura 2B, carriles 3-6), en el orden de preferencia A > G > T > C, en consonancia con la denominada "regla A" descrita anteriormente para muchas ADNPs. La STL por las ADNPs podría producirse a través de un mecanismo de desalineación, que da como resultado una delección de uno o dos nucleótidos y, por consiguiente, un producto de ADN más corto. Las Figuras 2A y 7A muestran que el producto final sintetizado por piPolB alcanzó la longitud total del producto utilizando sustratos dañados y no dañados, lo que sugiere que, en lugar de un mecanismo de desalineación, la piPolB puede insertar y alargar adicionalmente un nucleótido frente al sitio abásico. Para verificar este mecanismo, se hizo un seguimiento paso a paso de la polimerización en un ensayo de extensión de cebador en presencia de diferentes combinaciones de dNTPs (Figura 2B, carriles 7-11). En particular, se proporcionó dATP en combinación con otro dNTP único (dTTP, dCTP y dGTP, carriles 7-9, respectivamente). Mientras que la inserción frente al THF se detectó en todos los casos, solo la combinación dATP y dTTP (AT, carril 7) permitió la extensión del cebador más allá del sitio abásico, dando lugar a un producto que se corresponde con el marcador de 19-mer (Figura 2B, carril M), lo que indica la

replicación exacta del molde hasta esta posición (véase el esquema del sustrato encima del gel). Consecuentemente, la presencia de dATP, dTTP y dGTP (ATG, carril 10) permitió la copia del molde hasta el producto de 22-mer de longitud, y solo cuando se proporcionaron los cuatro dNTPs, pudo detectarse el producto de replicación de longitud completa (carril 11). En conjunto, estos resultados indican que la capacidad de STL de piPolB inserta preferiblemente una A frente a los sitios abásicos y posteriormente alarga el cebador de manera procesiva sin introducir mutaciones con desplazamiento del marco de lectura.

10 Para comprender mejor la replicación de ADN mediada por piPolB y del rendimiento de STL, se analizó la evitación del sitio abásico con diferentes cofactores metálicos y daños en el ADN que bloquean la replicación. Como se muestra en la Figura 2C, la STL de sitio abásico en presencia de iones de manganeso fue más eficaz a concentraciones más bajas de dNTPs (carriles 19-22 frente a 8-11), en
15 consonancia con informes previos sobre otras PolBs. Se observó que la replicación del molde no dañado requería una mayor concentración de dNTPs en presencia de iones de manganeso (carriles 14-17) en comparación con las reacciones desencadenadas por magnesio (carriles 3-6). A continuación, se exploró la especificidad por el molde de la capacidad de STL de piPolB con sustratos que contienen la base oxidada de
20 timinglicol (Tg) y dímeros de ciclobutano timina (T:T). El Tg es el producto oxidativo más habitual de la timina y presenta un fuerte bloqueo para la síntesis de ADN por la mayoría de las ADNPs replicativas. Por otra parte, T:T surge tras la exposición a la radiación de luz ultravioleta y constituye un obstáculo particularmente pronunciado para la mayoría de las ADNPs porque el enlace covalente de dos nucleobases
25 adyacentes evita un retorcimiento en la cadena principal del ADN que normalmente hace accesible una base del molde al sitio activo de la polimerasa. Los resultados indican que piPolB pudo copiar la base oxidada de timinglicol (Tg) en presencia de iones de magnesio (Figura 2D, carriles 5-8). Sin embargo, curiosamente, la extensión del cebador más allá del daño fue menos eficaz, porque el intervalo de 16-mer es más
30 fuerte que en el caso del molde que contiene THF (carriles 8-11 en el panel C frente a carriles 5-7 en el panel D). En línea con la alteración en la extensión del cebador procesiva más allá del daño, los iones de manganeso aparentemente no estimularon la STL. Por el contrario, la evitación de Tg se redujo en presencia de este cofactor metálico (carriles 9-10). En el caso de T:T, la inserción de solo 1 o 2 nucleótidos frente
35 al daño podría detectarse ya sea con iones de magnesio o manganeso (carriles 12-14

y 15-17, respectivamente). En conclusión, piPolB tiene una capacidad de STL eficaz que le permite evitar sitios abásicos y modificaciones oxidativas de bases pero no puede superar modificaciones más voluminosas tales como T:T, probablemente porque este daño induce cambios estructurales importantes en la hélice de ADN que
 5 obstaculizan contundentemente la replicación del ADN.

Ejemplo 5. Replicación de ADN independiente de cebador.

Para obtener información sobre la procesividad de la replicación de ADN por
 10 piPolB, se realizaron ensayos de replicación por círculo rodante de ADNmc cebado individualmente, utilizando como molde ADN de M13 y los productos se resolvieron mediante electroforesis desnaturalizante alcalina. Debido a su alta procesividad, junto con la capacidad de desplazamiento de cadena, la ADNP de $\Phi 29$ fue capaz de sintetizar fragmentos de ADNmc muy grandes en estas condiciones (Figura 3A, carril
 15 1). Por el contrario, piPolB dio lugar a una señal borrosa de productos de replicación que abarca de 0,5 a 10 kb, con un pico aparente de aproximadamente 3 kb (Figura 3A, carriles 3-6), lo que indica que la piPolB no es tan procesiva como la ADNP $\Phi 29$ y, por lo tanto, genera fragmentos de ADN más cortos. Sin embargo, la longitud máxima del producto obtenida con piPolB se mantuvo similar incluso a una concentración
 20 enzimática 20 veces más baja, lo que sugiere que es una replicasa de ADN procesiva. Una parte considerable de los productos de replicación era más grande que la del ADN M13, lo que sugiere que la replicación del ADN por piPolB está acoplada con el desplazamiento de cadena. La última actividad se confirmó posteriormente utilizando un sustrato de molde/cebador de oligonucleótidos con un hueco de 5 nt (Figura 8).

25

Increíblemente, se detectó un patrón de replicación muy similar independientemente de si el M13 estaba cebado o no (Figura 3A, carriles 10-13). Por el contrario, tal como se esperaba, la ADNP $\Phi 29$ no pudo sintetizar ningún producto en ausencia de cebador (carril 9). Cuando se cargaron las mismas muestras en un gel de
 30 agarosa no desnaturalizante (Figura 3B), el producto de replicación apareció como una sola banda que correspondía a la longitud esperada de la unidad M13, sugiriendo que los productos de ADN monocatenarios detectados en el gel de electroforesis desnaturalizante alcalino son productos de replicación M13. Consecuentemente, no se pudo detectar ningún producto en ausencia de molde de ADN entrante (carriles 16-19),
 35 descartando la replicación de posibles trazas contaminantes de ADN en cualquiera de

las variantes de la polimerasa. De la misma manera, cuando las reacciones se realizaron con la variante D368A deficiente para la actividad de polimerización (carriles 8 y 15) no se obtuvo ningún producto. De manera destacable, los fragmentos detectados con la enzima mutante D59A/E61A fueron ligeramente más pequeños (en <0,5 kb) que con la enzima de tipo silvestre (Figura 3A carriles 7 y 14), presumiblemente porque la deficiencia de exonucleasa da lugar a la acumulación de errores de replicación que puede dar como resultado la alteración de la capacidad de desplazamiento de cadena o de procesamiento. Estos resultados confirman además que la replicación del ADN M13, con o sin cebador añadido, es intrínseca para piPolB. La síntesis de ADN *de novo* en ADN M13 no cebado podría detectarse utilizando como cofactores iones tanto de magnesio como de manganeso (Figura 3C, carriles 2-3 y 8-9), aunque con una intensidad algo mayor del producto de replicación total con iones de manganeso. Sin embargo, la replicación no se detectó cuando los desoxirribonucleótidos se sustituyeron por ribonucleótidos (carriles 5-6 y 11-12), como se esperaba para una ADNP de la familia B que contiene la ventana estérica de tirosina conservada. Se detectaron fragmentos de ADN más pequeños con la polimerasa de tipo silvestre que podrían ser productos de la degradación exonucleolítica (carril 8).

Para investigar un posible requisito de secuencia para el inicio *de novo* de la replicación del ADN, se realizaron ensayos que utilizaron, como molde, un poli-dT homopolimérico monocatenario de 33-mer. Como se muestra en la Figura 3D, la piPolB pudo replicar este molde, lo que sugiere que puede no haber un requisito para una secuencia de molde específica en las condiciones utilizadas. La replicación del ADN en presencia del dATP complementario dio lugar a productos de ADN grandes y a un patrón en escalera que indicaba que la replicación comenzaba *de novo*, con la síntesis de cebadores cortos. Este patrón en escalera podría corresponder a una replicación distributiva o a posiciones iniciadoras alternativas en todo el molde. Los productos de replicación obtenidos utilizando la piPolB deficiente en exonucleasa fueron en general más cortos, lo que sugiere una alteración en la capacidad de procesamiento, como se descubrió en el caso de la replicación de M13 (Figura 9, carriles 8-10 frente a 11-13). Usando este sustrato homopolimérico corto, la síntesis de cebadores de ADN fue insignificante con iones magnesio (Figura 9, carriles 2-7 frente a 8-13), lo que destaca la mayor eficacia del manganeso como cofactor para el cebado de ADN, en consonancia con los resultados previos con ADN M13 (Figura 3C).

Curiosamente, cuando se añadieron todos los dNTPs, la generación de productos de ADN grandes se redujo algo (Figura 3D, carril 6) y, si el dATP se redujo al nucleótido marcado (16 nM en comparación con 100 μ M del no marcado, carril 7),
 5 los productos de replicación fueron insignificantes, lo que sugiere que para iniciar la replicación se requiere la formación de pares de bases correctos de Watson y Crick.

En conjunto, estos resultados indican que la piPolB de la pipolina de *E. coli* 3-373-03_S1_C2 es capaz de iniciar y llevar a cabo la replicación del ADN de moldes
 10 circulares y lineales en ausencia de cebadores preexistentes o factores proteicos adicionales. Asimismo, la replicación de sustratos de ADN homopolimérico sugiere que, contrariamente a las ADN primasas canónicas de la superfamilia de primasas arqueoeucariotas (PAE), la capacidad cebadora de ADN de las piPolB no depende de una secuencia molde específica.

15

Ejemplo 6. Síntesis *de novo* de cebadores de ADN.

Para confirmar adicionalmente que piPolB es capaz de sintetizar ADN *de novo*, se realizó una replicación de ADNmc M13 utilizando como nucleótido marcado γ^{32} P-
 20 ATP. Por tanto, solo los fragmentos de ADN recién sintetizados incorporarían el marcador radiactivo. Tal como se muestra en la Figura 4A, se generaron pequeños fragmentos de ADN (de hasta 4-5 nucleótidos de longitud) de manera distributiva con las piPolBs de tipo silvestre y deficiente en exonucleasa, pero no con la variante D368A. De nuevo, esta reacción fue considerablemente más eficaz en presencia de
 25 iones manganeso que con los de magnesio (carriles 1-8 frente a 9-16). Asimismo, los productos solo se detectaron en presencia de dNTPs pero no con NTPs (no se muestra). En lugar de los grandes fragmentos de ADN detectados en los ensayos descritos anteriormente (Figura 3A), solo se observaron cebadores di- y trinucleotídicos que pueden ser productos iniciadores abortivos resultantes de la incorporación de un
 30 ribonucleótido (en lugar de dNTP) como un nucleótido 5' terminal.

El uso de PAGE de alta resolución permitió identificar cebadores di y trinucleotídicos alternativos con intensidad similar, lo que sugiere que el inicio de la síntesis de ADN por piPolB no requiere una secuencia molde específica. En línea con
 35 esto, cuando cada dNTP se proporcionó por separado (Figura 4B), la reacción fue

claramente estimulada por dGTP, en presencia de iones de magnesio o manganeso (carriles 4 y 14) y, en un menor grado, por dCTP y dTTP, en solitario o en combinación con otros desoxirribonucleótidos. El hecho de que el dinucleótido A-dG sea el producto iniciador sintetizado de manera más eficaz, está en consonancia con la observación de que las pirimidinas son los sustratos molde preferentes para la reacción de cebado por la mayoría de las ADN primasas. En línea con estos resultados, los cambios de un solo nucleótido en el sustrato homopolimérico poli-dT no cambiaron sustancialmente la eficacia de la síntesis de ADN *de novo* (Figura 10), aunque se pudieron detectar di- y tri-nucleótidos cortos cuando se incluyeron una o dos Cs en la secuencia molde, incluso en el extremo 5' de la molécula molde (carriles 7 y 12). En conjunto, estos resultados demuestran que piPolB es capaz de iniciar la síntesis *de novo* de cebadores de ADN sin un fuerte requerimiento de secuencia molde específica.

Ejemplo 7. Una lisina invariable juega un papel en las actividades de STL y síntesis de cebadores.

Las PolBs contienen un motivo KxY conservado dentro de una cadena β en el dominio palm implicado en la estabilización del extremo del cebador. Se formuló la hipótesis de que se requerirían adaptaciones estructurales de este motivo o de residuos cercanos para la unión estable de un nucleósido trifosfato en el lado 5' del cebador naciente para permitir la formación de dinucleótidos. De hecho, el análisis de la alineación de secuencia múltiple mostró que las piPolBs carecen del motivo KxY canónico y en su lugar contienen una secuencia conservada alternativa KTRG (SEQ ID NO: 46). Un patrón KX_2 adicional dentro de una extensión N-terminal de la misma cadena β también está altamente conservado en homólogos de piPolB, definiendo un motivo KX_2-X_{3-10} -KTRG extendido (SEQ ID NO: 1). En la enzima representativa de SEQ ID NO: 2 ensayada en el presente documento, X_2 es H y X_{3-10} es la SEQ ID NO: 5, es decir, la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 85, y este motivo KX_2-X_{3-10} -KTRG corresponde a las posiciones 613 a 626 de esta secuencia. Por tanto, se generaron variantes de alanina de estos residuos K613, H614, K623 y R625. En consonancia con un supuesto papel en la estabilización del extremo del cebador, las variantes K623A y R625A tenían una capacidad de extensión de cebador alterada (Figura 11A) y síntesis de cebador más allá de la formación de dinucleótidos (Figura 11B). Por otra parte, las proteínas K613A y H614A tenían capacidad de extensión de cebador normal en las condiciones ensayadas (Figura 5A). Sin embargo, mientras que H614A fue capaz de

sintetizar nuevos cebadores con un patrón similar al de piPolB de tipo silvestre (Figura 5B, carriles 6-7), la capacidad primasa de K613A se redujo fuertemente (carriles 4-5), lo que sugería un papel específico de este resto durante la síntesis de ADN *de novo*.

5 Después, se analizó la capacidad de STL de la variante K613A mediante un ensayo de extensión de cebador en el molde que contenía THF. La Figura 5C muestra que la actividad de la proteína K613A se vio fuertemente alterada en comparación con la piPolB de tipo silvestre (carriles 3-4 frente a 7-8). Por tanto, aunque la síntesis del
 10 cebador de ADN y la extensión del cebador frente a los sustratos dañados y no dañados parecen depender de los mismos residuos catalíticos conservados, como se muestra para la variante D368A (véase anteriormente), se pudieron desacoplar parcialmente estas actividades. Este resultado confirma adicionalmente las capacidades exclusivas intrínsecas de STL y ADN primasa de piPolB y también revela el papel del motivo de estabilización de cebadores extendido del grupo piPolB que se
 15 requeriría para estas actividades.

Ejemplo 8. Papel biológico de piPolB en la síntesis de ADN *de novo*.

Teniendo en cuenta la capacidad primasa de ADN de piPolB, que no tiene
 20 precedentes en las enzimas de la familia PolB, se decidió investigar su función biológica *in vivo*. Para este fin, bacterias que expresaban piPolB se expusieron a Mitomicina C (MMC) y a irradiación con luz ultravioleta (UV), los dos agentes que dañan el ADN que se sabe que bloquean la replicación del ADN al introducir modificaciones de base voluminosas y entrecruzamientos intercatenarios (EIC). Dado
 25 que piPolB no fue capaz de replicar un molde que contenía T:T (Figura 2D), es poco probable que su capacidad de STL pueda permitir evitar el daño en el ADN inducido por tratamiento con MMC o irradiación UV. Sin embargo, dado que el bloqueo de la replicación en la cadena principal se puede evitar mediante acontecimientos de
 30 recombinação aguas abajo de las lesiones generadas por UV, se formuló la hipótesis de que la síntesis de ADN *de novo* por piPolB podría contribuir a aliviar el estrés genotóxico generado por agentes que dañan el ADN. Los resultados sugieren que, de hecho, este es el caso, porque la expresión de la piPolB de tipo silvestre en cultivos de
 35 *E. coli* BI21(DE3) aumentó significativamente la supervivencia celular tanto con el tratamiento con MMC como con la irradiación UV, en comparación con las bacterias que expresan la variante inactiva de piPolB, D368A (Figura 6). Estos resultados

indican un posible papel de las piPolB en la reparación o tolerancia al daño del ADN en el contexto de células de *E. coli*.

Por tanto, la presente invención comunica el descubrimiento y la
5 caracterización bioquímica de un nuevo grupo principal, previamente pasado por alto, de PolBs replicativas, que en el presente documento se denominaron "piPolBs" debido a su capacidad exclusiva de realizar la síntesis de ADN molde independiente de cebador. Dentro de la filogenia de PolB global, piPolB forma un clado antiguo, distinto, conjuntamente con los dos grupos descritos anteriormente, rPolB y pPolB. Los genes
10 que codifican las piPolB se encuentran en los EGM, denominadas pipolinas, la mayoría de las cuales están integradas en genomas de bacterias de tres filos diferentes (*Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*), aunque también se replican como plásmidos circulares en las mitocondrias. La distribución de las pipolinas es bastante irregular, lo que es típico de los EGM integrados. En gran medida, las
15 pipolinas parecen haber coevolucionado con sus hospedadores, porque la filogenia basada en las piPolB es congruente con la taxonomía bacteriana general (por ejemplo, grupo de proteobacterias juntas y se dividen además en clados correspondientes a diferentes clases de proteobacterias). De manera destacable, el análisis filogenético mostró que las piPolBs de los plásmidos mitocondriales se agrupan con homólogos
20 proteobacterianos, en particular con los de alfaproteobacterias. Dado que con toda probabilidad las mitocondrias han evolucionado a partir de un antecesor alfaproteobacteriano en el inicio de la eucariogénesis, es tentador especular que las piPolBs se introdujeron en eucariotas junto con el endosimbionte alfaproteobacteriano de las protomitocondrias. De acuerdo con estimaciones conservadoras basadas en el
25 registro de microfósiles, los eucariotas surgieron hace ~ 2 billones de años. Por tanto, el clado de piPolB debería ser al menos tan antiguo si no más, especialmente si la aparición de las pipolinas es anterior a la divergencia del filo bacteriano principal. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que las pipolinas se hayan introducido horizontalmente en las mitocondrias de proteobacterias en un pasado más reciente.

30

Las piPolBs comparten el sitio activo conservado con otras PolBs y también contienen los subdominios TPR1 y TPR2, un sello distintivo de las pPolBs. Consecuentemente, en el presente documento se mostró que piPolB presenta actividades eficaces de polimerización de ADN y de desplazamiento de cadena. Una
35 caracterización bioquímica más detallada de piPolB también mostró la capacidad de

STL intrínseca en daños no voluminosos de bases (Figura 2), que, aunque conduce a la acumulación de mutaciones, en última instancia favorecerá el mantenimiento del genoma dañado. Increíblemente, a diferencia de todas las demás PolBs, la piPolB no requiere un cebador añadido externamente para la replicación del ADN. Por el

5 contrario, en el presente documento se encontró que piPolB es capaz de iniciar la síntesis de ADN *de novo*, una capacidad hasta ahora exclusiva de las ADN primasas. En el caso de la ADNPΦ29, se ha demostrado que el motivo TPR1 establece contactos con la cadena molde y juega un papel clave en la interacción con la PT (proteína terminal) durante las primeras etapas de la replicación cebada con proteína.

10 Dado que con toda probabilidad las piPolBs no interaccionan con una PT, la función de la región TPR1 puede estar limitada a la interacción con el ADN. Una posibilidad adicional podría ser que este subdominio también interaccione con determinados cofactores celulares, lo que modularía la actividad de la piPolB *in vivo*. También se observó que determinados componentes de la maquinaria de replicación celular (por

15 ejemplo, ADN ligasa) podrían estar implicados en el ciclo de replicación de las pipolinas.

El uso de manganeso como cofactor divalente en lugar de magnesio aumentó la STL a través de sitios abásicos (Figura 2C), así como la síntesis de ADN *de novo*

20 (Figuras 3C, 9 y 4).

La enzima ensayada en estos ejemplos actúa como una primasa y como una ADN polimerasa. En el presente documento, se ha demostrado que las piPolBs tienen un motivo KTRG exclusivo (SEQ ID NO: 46), alternativo al motivo KxY conservado de

25 las PolBs, que interacciona con el extremo del cebador. Además, una lisina invariable cercana al motivo KTRG desempeña un papel clave tanto en la STL como en la síntesis de cebador *de novo* (Figura 5). Dada la carga positiva de este resto y de residuos cercanos en el grupo de piPolB, es probable que el motivo KX_2-X_{3-10} -KTRG extendido (SEQ ID NO: 1) pueda inducir un mecanismo de unión con el extremo del

30 cebador altamente estable que pueda favorecer la unión del nucleótido entrante y la posterior estabilización del complejo ternario, lo que daría como resultado una capacidad de polimerización mejorada. Estos resultados establecen una relación estructural entre las capacidades de STL y primasa de piPolB.

35 Como se ha mencionado anteriormente, todas las ADN primasas carecen de

capacidad de corrección de errores. Esto parece ventajoso para la síntesis eficaz de fragmentos de Okazaki de vida corta. Por el contrario, la actividad de corrección de errores de la exonucleasa 3'-5', que es necesaria para la replicación fiable del ADN por una ADN polimerasa, podría obstaculizar la capacidad primasa. Por tanto, las actividades sintéticas y degradantes de piPolB deben estar muy coordinadas para permitir la síntesis eficaz de cebadores y la replicación fiable del ADN. Asimismo, la actividad exonucleasa de piPolB también es compatible con la síntesis de translesión de daños no voluminosos de bases que, como se reportó previamente para la pPolB del bacteriófago Bam35, no requiere la desalineación de la cadena molde sino que tolera emparejamientos erróneos que contienen daños durante la síntesis de ADN procesiva. Estudios previos han demostrado que la replicación de pipolinas similares a pCRY1 desde mitocondrias fúngicas puede iniciarse desde orígenes múltiples en lugar de desde un origen fijo. Sin embargo, esta observación no se ha explicado. Estos plásmidos no codifican una supuesta PT; de hecho, solo contienen el gen piPolB. Por lo tanto, a la luz de los resultados presentados en este documento, dicho patrón de replicación es coherente con la posibilidad de que las pipolinas similares a pCRY1 se repliquen mediante sus piPolBs afines de una manera independiente de cebador. De manera análoga, la forma episomal circular de las pipolinas bacterianas podría replicarse mediante las piPolBs desde orígenes múltiples.

20

La replicación a través de lesiones de ADN más voluminosas que no podrían ser evitadas por piPolB podría beneficiarse de un posible cebado aguas abajo. Por consiguiente, en el presente documento se ha demostrado que la expresión de piPolB de tipo silvestre promueve la supervivencia de células de *E. coli* expuestas a agentes que dañan el ADN bloqueando la replicación (Figura 6). Por tanto, se formuló la hipótesis de que las piPolB podrían haber evolucionado para conservar el ADN de las pipolinas proporcionando una replicación de ADN *de novo* fiable y procesiva, así como tolerancia al daño del ADN, lo que también puede aumentar la conveniencia de las bacterias hospedadoras.

30

Es importante destacar que las piPolB suponen una gran promesa para desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, las actividades *in vitro* de piPolB, en concreto desplazamiento de cadena y polimerización de ADN fiable y procesiva, pueden aprovecharse para una amplificación eficaz del genoma completo independiente de cebador, mientras que la síntesis de translesión puede ser útil para

35

la amplificación de moldes de ADN dañados o antiguos. Dado que las piPolBs no muestran un requisito de secuencia fuerte para iniciar la replicación, se pueden seleccionar orígenes de replicación de una manera aleatoria, una propiedad útil para la amplificación del genoma completo. La piPolB podría convertirse en una solución de una sola enzima para conseguir el objetivo de la amplificación del genoma completo en aplicaciones de genómica unicelular.

Ejemplo 9. Procedimientos experimentales.

9.1. Análisis Bioinformáticos.

10

Análisis filogenéticos. Utilizando el programa PSI-BLAST se investigaron las bases de datos no redundantes de secuencias de proteínas en el NCBI. Para los análisis filogenéticos las secuencias de proteínas se alinearon con Promals3D. Las posiciones mal alineadas (contenido de información bajo) se eliminaron utilizando la función Gappyout de Trimal. Previamente se recogió el conjunto de datos de secuencias de pADNP de virus, plásmidos y polintones (Krupovic, M., y Koonin, E.V., 2015, Nat Rev Microbiol, 13, 105-115). Se construyó un árbol filogenético de máxima probabilidad utilizando el programa PhyML, cuya última versión incluye la selección automática del modelo de sustitución más adecuado para una alineación determinada. El mejor modelo identificado por PhyML fue LG + G6 + I + F (LG, matriz Le-Gascuel; G6, parámetro de forma gamma: fijo, número de categorías: 6; I, proporción de sitios invariables: fijo; F, frecuencias de equilibrio: empíricas).

20

Identificación y anotación de un EGM integrado. Las pipolinas se identificaron mediante un análisis de vecino genómico más próximo (*genomic neighborhoods*) de los genes codificantes de piPolB. Los límites de integración exactos se definieron basándose en la presencia de repeticiones directas correspondientes a sitios de unión. Las repeticiones se investigaron utilizando Unipro UGENE. Los genes pipolina se anotaron en función de las búsquedas con PSI-BLAST frente a la base de datos no redundante de proteínas en las búsquedas de NCBI y HHpred. Las pipolinas se compararon entre sí y se visualizaron utilizando EasyFig.

30

9.2. Expresión y purificación de proteínas.

La ADN polimerasa independiente de cebador (piPolB) de la pipolina de *E. coli* 3-373-03_S1_C2 (NCBI GI: 693097161, SEQ ID NO: 2) se obtuvo de GeneScript, en

35

<i>Pares de oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida</i>	
<i>variante de piPolB</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>
	TAAAGC (SEQ ID NO: 59)
	GCTTTATACGTCAGCTGACCAGCGGTTTTTCATGGCGATCAGTTG AGAGAC (SEQ ID NO: 60)

Tabla 1. Información de secuencias génicas y cebadores de mutagénesis.

Todas las variantes de piPolB se expresaron en células BL21(DE3) de *E. coli*, utilizando medio de autoinducción ZYM-5052 en presencia de ampicilina 100 mg/l. Los cultivos crecieron durante 20 horas a 28 °C. Para la purificación de variantes de piPolB no etiquetadas, las células se rompieron mediante molienda con alúmina y se suspendieron en tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 7mM, glicerol al 5 % (v/v)) que contenía NaCl 1 M. Los desechos de alúmina y células se eliminaron por centrifugación, y se ajustó la absorbancia a 260 nm a 120 unidades/ml antes de la precipitación del ADN con polietilenimina al 0,3 % (p/v). Después de centrifugación a 20.000 x g durante 20 min, al sobrenadante se añadió sulfato de amonio hasta un 69 % de saturación y se centrifugó a 20.000 x g durante 30 min. El sedimento que contenía piPolB (tipo silvestre y mutantes) se resuspendió en tampón A y se aplicó en serie a columnas de flujo rápido Q Sepharose® (GE Healthcare) y fosfocelulosa (P11, Whatman), a una fuerza iónica de aproximadamente 0,2 M de NaCl. Después de un lavado abundante con concentraciones crecientes de NaCl en tampón A, la ADN polimerasa purificada se eluyó con NaCl 0,35 M y se aplicó a una columna Heparin-Sepharose® CL-6B (GE Healthcare), donde, después de lavar con NaCl 0,35, 0,4 y 0,45 M, se eluyeron con NaCl 1 M en tampón A.

Las variantes con etiqueta de histidina se purificaron con un método estándar. Brevemente, las células se resuspendieron en tampón C (tampón fosfato 50 mM, a pH 8, β-mercaptoetanol 7mM, glicerol al 5 % (v/v), NaCl 1 M, imidazol 5 mM) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con lisozima 1 mg/ml (Sigma) y 1 unidad de benzonasa (Sigma), antes de la ruptura celular por sonicación. Después de centrifugación a 20.000 x g durante 30 min, la fracción soluble se aplicó a una columna Ni-NTA (Qiagen). Después de un lavado abundante con imidazol 5, 10, 25 y 50 mM, la proteína se eluyó con imidazol 200 mM y posteriormente se aplicó a la columna Heparin-Sepharose® CL-6B (GE Healthcare), donde, después de lavar con NaCl 0,35, 0,4 y 0,45 M, se eluyó con NaCl 1 M en tampón A.

En todos los casos, las fracciones agrupadas que contenían variantes puras de piPolB, se dializaron durante la noche frente a 500 volúmenes de tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 7mM, NaCl 0,25 M y glicerol al 50 % (v/v)) y se mantuvieron a -20 °C, o a -70 °C para una conservación prolongada. Se calculó que la pureza final de las proteínas era > 90 % por SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie.

9.3. Ensayos de extensión de cebador.

10

Los oligonucleótidos (Tabla 2) se adquirieron en Sigma en un grado de purificación PAGE. Para formar un sustrato de cebador/molde, como se indica en la parte superior de cada figura, el oligonucleótido P15 (Tabla 2) se marcó en 5' con [γ -³²P]ATP utilizando polinucleótido quinasa T4 y se hibridó a un exceso molar de 1,2 veces de oligonucleótidos molde no marcados complementarios (T33GTA, T33GTT o T33GFA, Tabla 2) en presencia de NaCl 50 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

15

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>
P4	GATC (SEQ ID NO: 61)
P10	GACTGCTTAC (SEQ ID NO: 62)
P15	GATCACAGTGAGTAC (SEQ ID NO: 63)
T33GTA	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC (SEQ ID NO: 64)
T33GTT	ACTGGCCGTCGTTCTAATGTACTCACTGTGATC (SEQ ID NO: 65)
T33GFT	ACTGGCCGTCGTTCTATFGTACTCACTGTGATC (SEQ ID NO: 66)
P20-33	GAACGACGGCCAGT (SEQ ID NO: 67)
33A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 68)
33T*	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/invT/ (SEQ ID NO: 69)
CC31T*	CCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/invT/ (SEQ ID NO: 70)
15TCC16T*	TTTTTTTTTTTTTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTT/invT/ (SEQ ID NO: 71)
15TC17T*	TTTTTTTTTTTTTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTT/invT/ (SEQ ID NO: 72)
15TA17T*	TTTTTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTTTTTTT/invT/ (SEQ ID NO: 73)
M13 UP	GTAAAACGACGGCCAGT (SEQ ID NO: 74)

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas en los ejemplos. F representa el análogo del sitio abásico THF. * / invT / significa un último nucleótido dTMP unido por un enlace 3'-3' invertido.

20

Los ensayos se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contenían Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol al 4 % (v/v), BSA 0,1 mg/ml, Tween 20 al 0,05 % (v/v) y, a menos que se indique lo contrario, 1 nM del dúplex cebador/molde marcado en 5' indicado, ADN polimerasa 10 nM y la concentración de dNTPs indicada. Las reacciones se desencadenaron con la adición de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM, como se indica y, después de incubar durante los tiempos indicados a 30 °C, las reacciones de detuvieron añadiendo 10 μ l de tampón de carga de formamida (formamida al 98%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,5 % (p/v) y xileno cianol al 0,5 % (p/v)). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20 % - urea 8 M (20x30x0,5 mm) en tampón TBE 1X. Las bandas del gel se detectaron mediante autorradiografía o con lectores de imágenes de fósforo (Typhoon FLA 7000) y se procesaron con el programa informático ImageJ.

15 **9.4. Replicación de ADN monocatenario.**

ADN genómico, circular, monocatenario del fago M13mp18 (reserva de laboratorio) se diluyó hasta 50 ng/ μ l en un tampón que contenía NaCl 0,2 M y Tris-HCl 60 mM, pH 7,5 con o sin cebador M13 UP (Tabla 2), se calentó durante 5 min a 65 °C y se enfrió lentamente durante la noche para permitir la hibridación del cebador. Los sustratos M13 cebados y no cebados se conservaron a -20 °C en alícuotas pequeñas para minimizar el corte de ADN debido a ciclos repetitivos de congelación-descongelación.

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 25 μ l, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol al 4 % (v/v), BSA 0,1 mg/ml, Tween 20 al 0,05 % (p/v), sulfato de amonio 20 mM, dNTPs 100 μ M, [α -³²P]dATP 0,5 μ Ci, 3,2 nM de ADNmc del fago M13mp18 cebado o no cebado, y las concentraciones indicadas de cada ADN polimerasa. Las reacciones se desencadenaron con la adición de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM y se incubaron durante 20 min. a 30 °C. Después, las reacciones se desactivaron añadiendo 5 μ l de EDTA 250 mM, SDS al 5 % (p/v) y se cargaron directamente en electroforesis de agarosa no desnaturizante TAE1x. Para la electroforesis de agarosa alcalina, una alícuota (15 μ l) se sometió a filtración en gel a través de columnas de centrifugado Sephadex G-15 que contenían SDS al 0,1 % (p / v). La escalera de ADN lambda utilizada como marcador de tamaño se marcó relleno con fragmento de Klenow (New England Biolabs) en presencia de [α -

³²P]dATP.

La replicación del molde monocatenario homopolimérico se realizó en condiciones similares, utilizando los oligonucleótidos de 33-mer (IDT) con las
 5 secuencias indicadas (Tabla 2), que contienen un enlace invertido 3'-3' invertido 3'-3' terminal para impedir la extensión del cebador y la degradación exonucleolítica. Los ensayos de replicación de oligonucleótidos se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol al 4 % (v/v), BSA 0,1 mg/ml, Tween 20 al 0,05 % (v/v), molde oligonucleotídico 1 µM, dNTPs 100 µM, 500 nM de la
 10 variante de piPolB indicada y [α -³²P]dATP 0,5 µCi. Después de incubar durante los tiempos indicados a 30 °C, las reacciones se detuvieron añadiendo 10 µl de tampón de carga de formamida (formamida al 98%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,5 % (p/v) y xileno cianol al 0,5 % (p/v)). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20 % - urea 8 M (20x30x0,5 mm) en tampón TBE 1X. Las
 15 bandas del gel se detectaron mediante autorradiografía o con lectores de imágenes de fósforo (Typhoon FLA 7000) y se procesaron con el programa informático ImageJ.

9.5. Detección de la síntesis de cebador *de novo*.

20 Para detectar la síntesis de cebador *de novo* se utilizó [γ -³²P]ATP como nucleótido marcado. Como molde se utilizó ADNmc de M13 (3,2 nM). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 25 µl, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol al 4 % (v/v), BSA 0,1 mg/ml, Tween 20 al 0,05 % (v/v), dNTPs 10 µM, [γ -³²P]ATP 0,5 µCi, el molde indicado y ADN polimerasa (500 nM). Las reacciones se
 25 desencadenaron con la adición de MgCl₂ 10 mM o MnCl₂ 1 mM y se incubaron a 30 °C durante los tiempos indicados. A continuación, las reacciones se detuvieron añadiendo 10 µl de tampón de carga de formamida (formamida al 98%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,5 % (p/v) y xileno cianol al 0,5 % (p/v)). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20 % - urea 8 M (20x30x0,5 mm) en
 30 tampón TBE 1X. Cuando se indica, se utilizaron geles de alta resolución (40 cm de longitud). Las bandas del gel se detectaron con lectores de imágenes de fósforo (Typhoon FLA 7000) y se procesaron con el programa informático ImageJ. La escalera de ADN [γ -³²P]ATP-(dGMP)_n utilizada como marcador de tamaño, generada por la PrimPol humana, fue un obsequio del Dr. Luis Blanco (CBMSO, Madrid).

35

9.6. Supervivencia de bacterias que expresan piPolB después de exposición a agentes que dañan el ADN.

Se inocularon cultivos iniciadores de *E. coli* BI21(DE3) que llevaban los plásmidos pET23a::piPolB o pET23a::piPolB(D368A) en medio LB en presencia de 5 ampicilina (150 µg/ml) y glucosa (40 mM) y se cultivaron durante la noche a una temperatura de 37 °C y con agitación. Los cultivos saturados se diluyeron (1: 100) en medio LB fresco con ampicilina y se cultivaron durante 1-2 horas a 28 °C hasta 10 alcanzar una DO600nm = 0,4. La expresión de la proteína recombinante se indujo después mediante IPTG 0,5 mM durante una hora antes de la exposición genotóxica. En este punto, para verificar la expresión de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE, (no se muestra) se extrajo una alícuota. Para el tratamiento con MMC, la concentración de fármaco indicada se añadió directamente a los cultivos que se cultivaron durante una hora más y después se diluyeron en serie en LB fresco y se 15 colocaron en placas de LB con agar (sin antibiótico). En el caso de exposición a UV, los cultivos inducidos se diluyeron en serie en PBS estéril y se sembraron en placas de LB con agar antes de la irradiación con la intensidad de luz UV indicada en un Spectrolinker™ XL-1000 (Spectronics Corporation).

20 El análisis y la representación de los datos se realizó utilizando R y R-Studio (Studio, Inc., Boston, MA), utilizando los paquetes de los programas Dplyr, Stats y Ggplot2, disponibles en CRAN (la extensa red de archivos R). Basándose en los ensayos de normalidad de Shapiro-Wilk, se analizaron los resultados de las exposiciones a MMC y luz ultravioleta mediante la prueba de la T para datos 25 emparejados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon que compara 2 grupos, respectivamente. Los P valores se indican en la Figura 6 como * $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,01$.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Una enzima ADN polimerasa recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos de una ADN polimerasa parental de la familia B, donde el motivo KxY se ha sustituido por el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha enzima ADN polimerasa recombinante tiene actividad ADN polimerasa y actividad primasa.
- 10 3. La enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, donde la ADN polimerasa parental de la familia B es la ADN polimerasa de Bam35 o la ADN polimerasa de phi29, o polipéptidos al menos 80 % idénticos a cualquiera de ellas que tengan actividad ADN polimerasa.
- 15 4. La enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, donde la ADN polimerasa parental de la familia B es la ADN polimerasa de phi29.
5. La enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3
20 o SEQ ID NO: 4, preferiblemente SEQ ID NO: 3.
6. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
- 25 7. Una construcción genética que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.
8. La construcción genética de acuerdo con la reivindicación 7 que es un vector de expresión.
30
9. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o la construcción genética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 35 10. Un kit para amplificar un ADN molde que comprende los siguientes elementos:

a. la enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5,

b. al menos un tampón,

c. dNTPs, y

5 d. iones de magnesio o manganeso.

11. Uso de la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 para la producción de la enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

10

12. Uso de la enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o del kit de acuerdo con la reivindicación 10 para la amplificación de un ADN molde.

15

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la amplificación del ADN molde se realiza en ausencia de oligonucleótidos añadidos externamente.

14. Uso de una enzima ADN polimerasa que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la amplificación de un ADN molde en ausencia de oligonucleótidos añadidos externamente.

20

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde la enzima ADN polimerasa comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2.

25

16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde el ADN molde es lineal o circular y bicatenario o monocatenario.

17. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde la amplificación del ADN molde se realiza mediante una técnica seleccionada de la lista que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), método de amplificación por ramificación (RAM) o amplificación mediada por bucle (LAMP).

35

18. Un método para amplificar un ADN molde que comprende:
- a. poner en contacto un ADN molde con una mezcla de reacción que comprende:
 - la enzima ADN polimerasa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5,
 - un tampón,
 - iones de magnesio o manganeso, y
 - dNTPs, y
 - b. incubar el ADN molde con la mezcla de reacción en condiciones que permitan la amplificación del ADN.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el ADN molde es lineal o circular y bicatenario o monocatenario.
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19 donde, si el ADN molde es bicatenario, comprende además una etapa adicional, antes de la etapa (a), de desnaturalización del ADN molde.
21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde la amplificación del ADN molde se realiza mediante una técnica seleccionada de la lista que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), método de amplificación por ramificación (RAM) o amplificación mediada por bucle (LAMP).

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde la mezcla de reacción no comprende oligonucleótidos.
23. Un método para amplificar un ADN molde que comprende:
- 5 a. poner en contacto un ADN molde con una mezcla de reacción que comprende:
- una enzima ADN polimerasa que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1,
 - un tampón,
 - iones de magnesio o manganeso, y
 - 10 - dNTPs, y
- b. incubar el ADN molde con la mezcla de reacción en condiciones que permitan la amplificación del ADN, donde la mezcla de reacción de la etapa (a) no comprende oligonucleótidos.
- 15 24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, donde la enzima ADN polimerasa comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2.
25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde el ADN molde es lineal o circular y bicatenario o monocatenario.
- 20 26. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 donde, si el ADN molde es bicatenario, comprende además una etapa adicional, antes de la etapa (a), de desnaturalización del ADN molde.
- 25 27. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, donde la amplificación del ADN molde se realiza mediante una técnica seleccionada de la lista que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en la
- 30 secuencia de ácido nucleico (NASBA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), método de amplificación por ramificación (RAM) o amplificación mediada por bucle (LAMP).

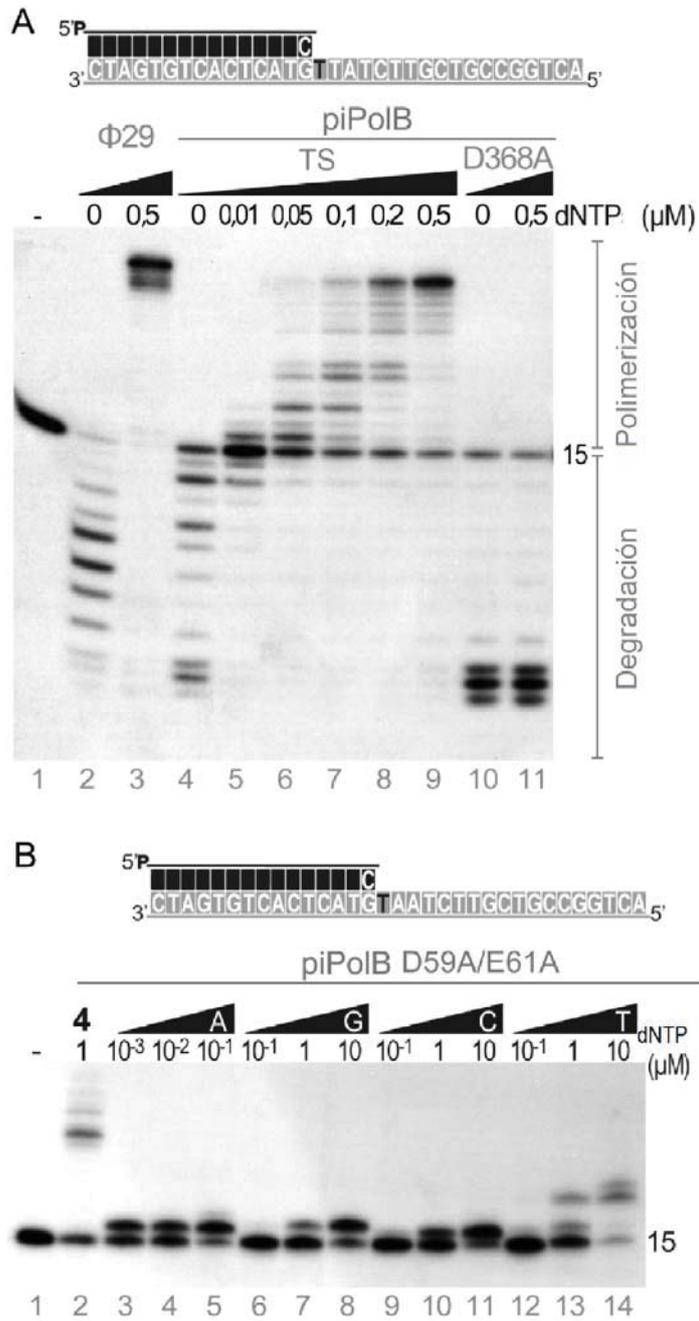


Fig. 1

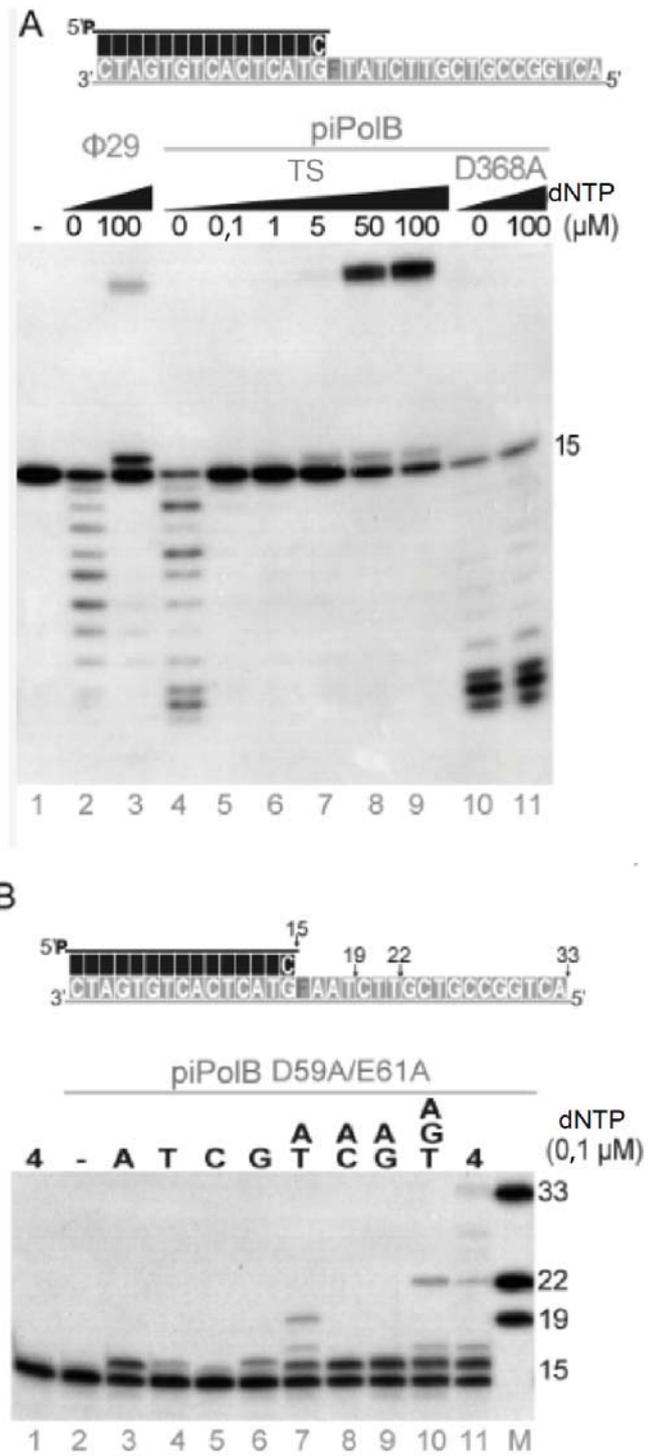


Fig. 2

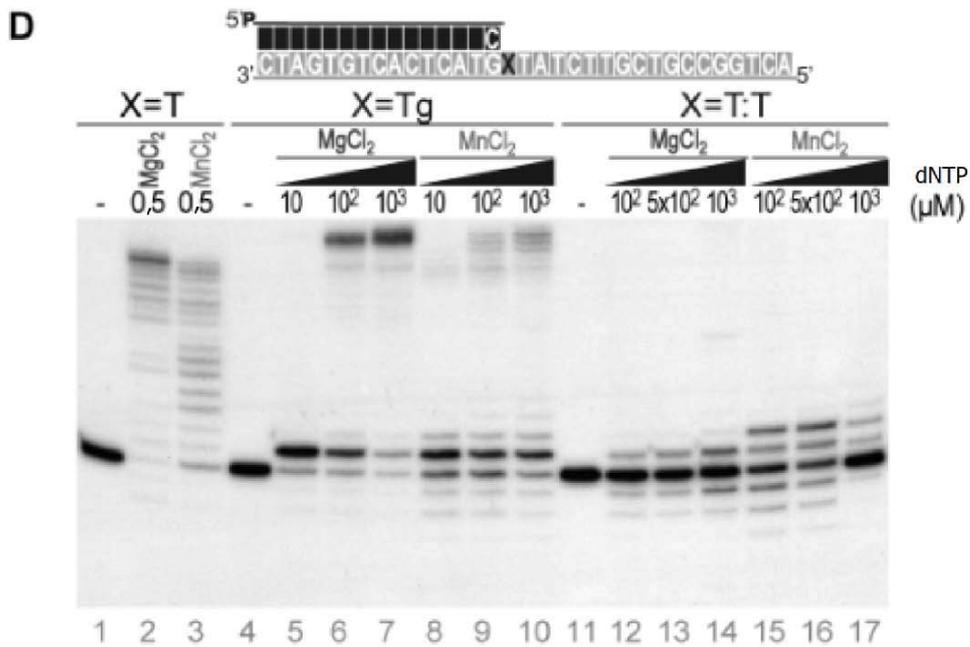
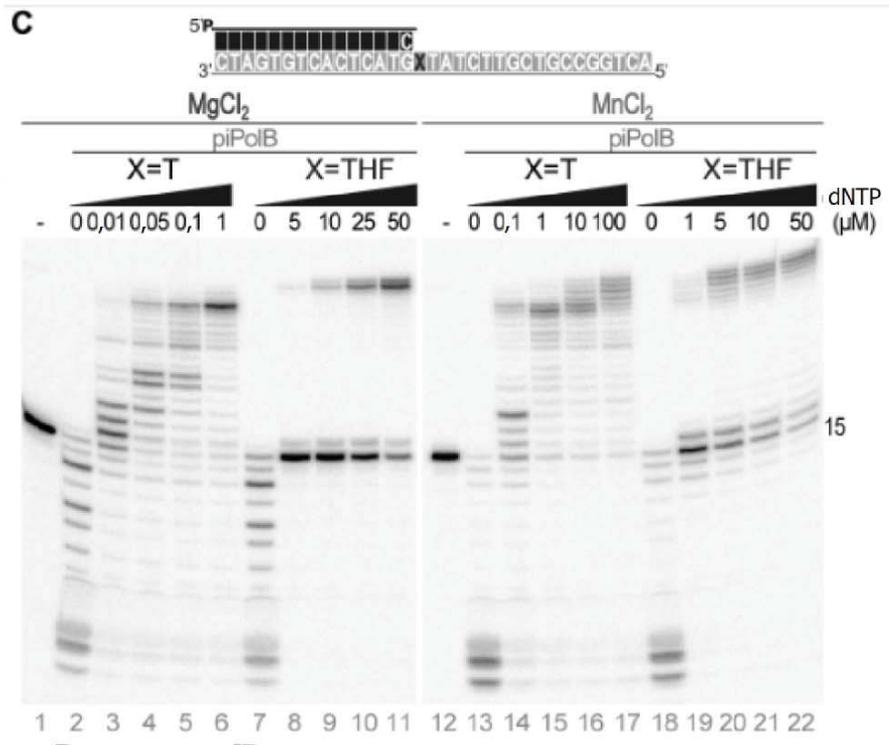


Fig. 2 (cont.)

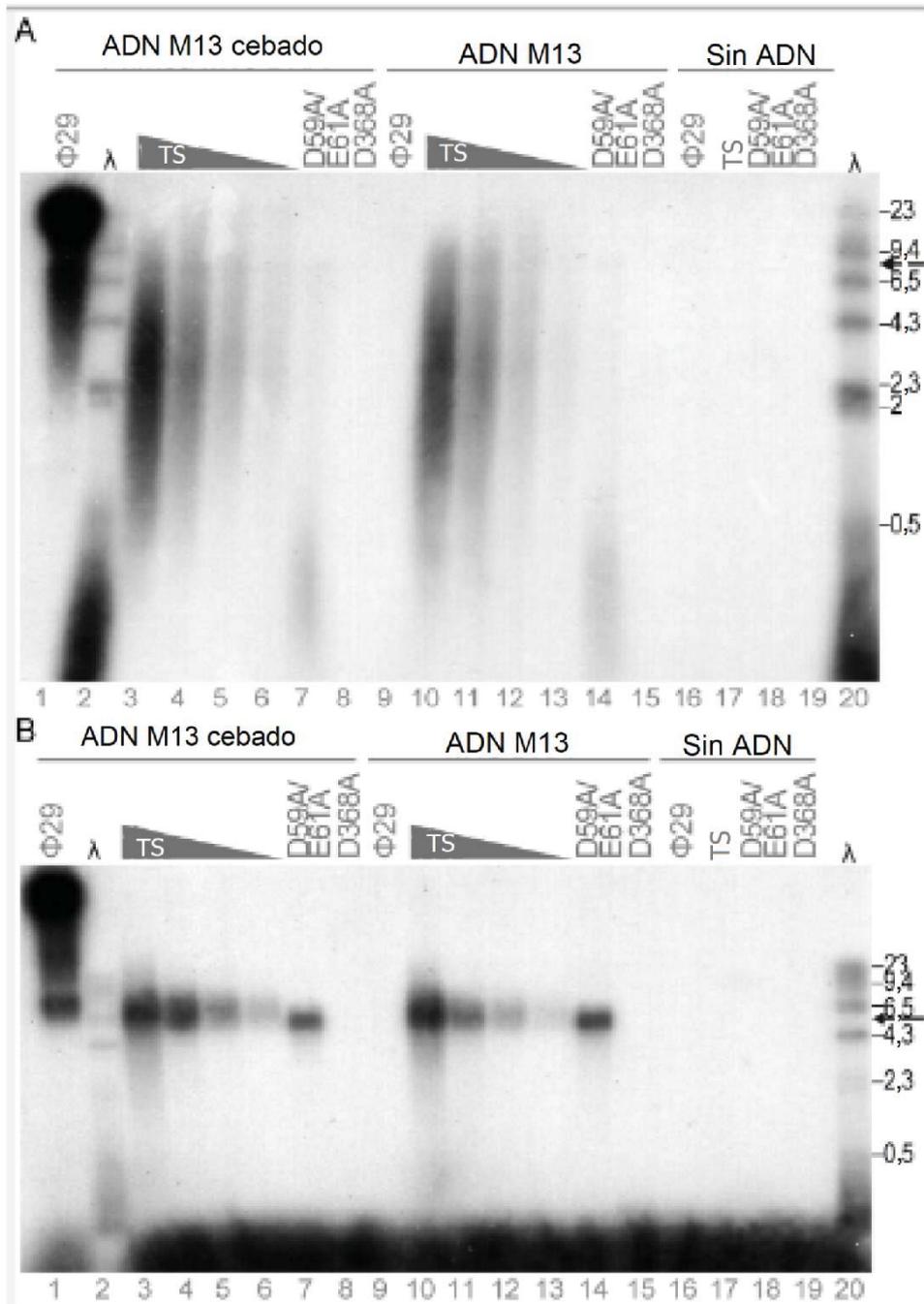


Fig. 3

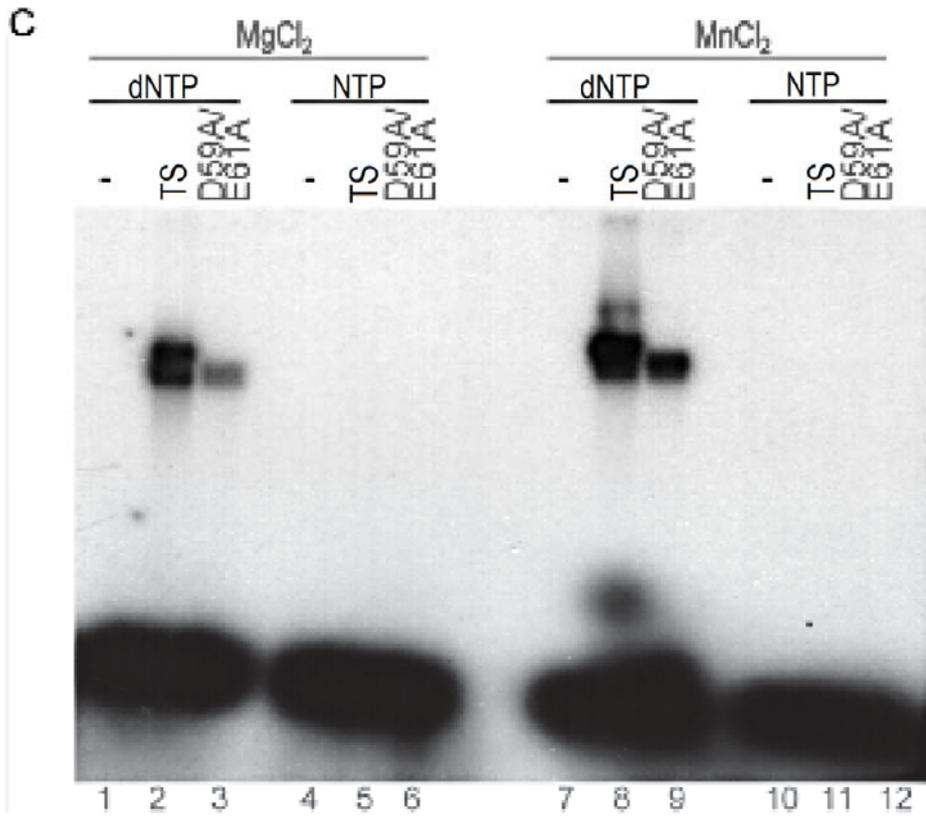


Fig. 3 (cont.)

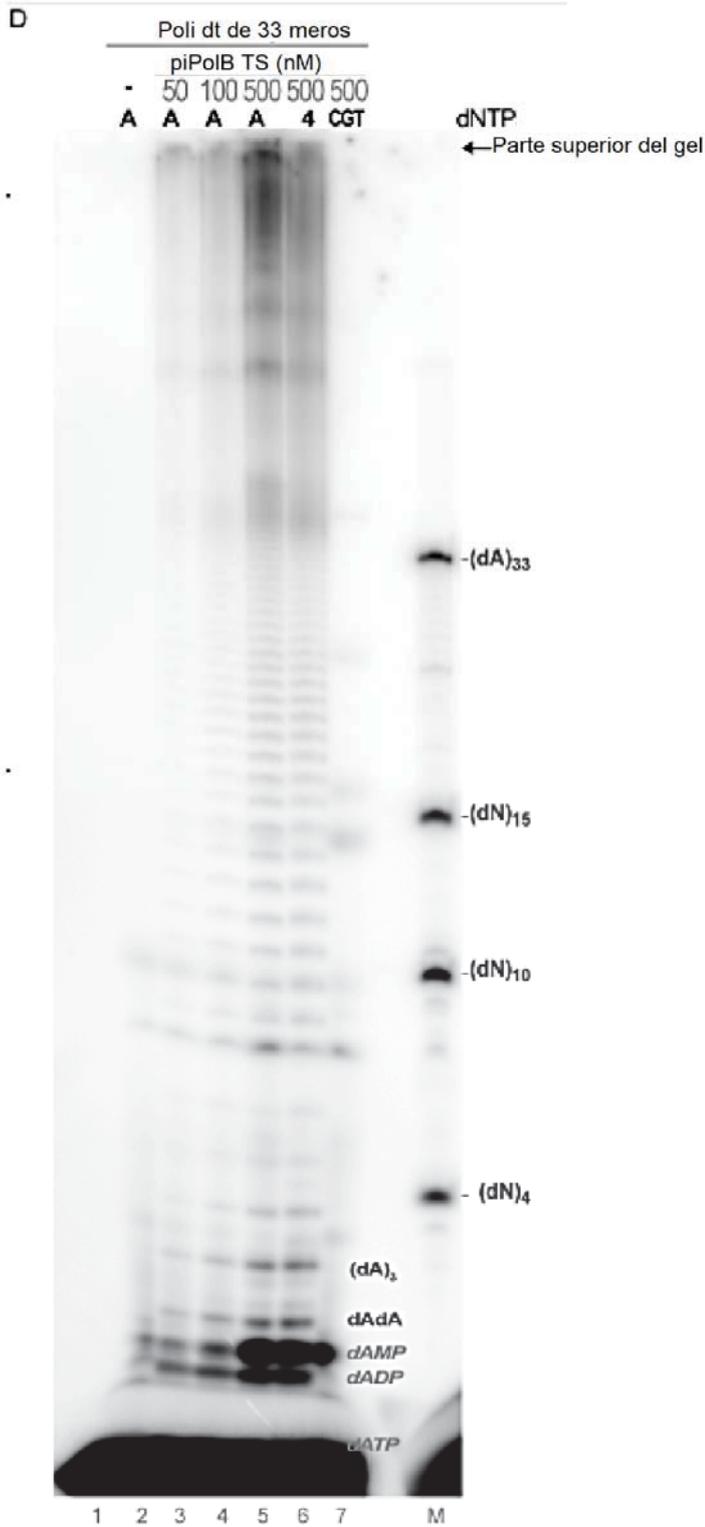


Fig. 3 (cont.)

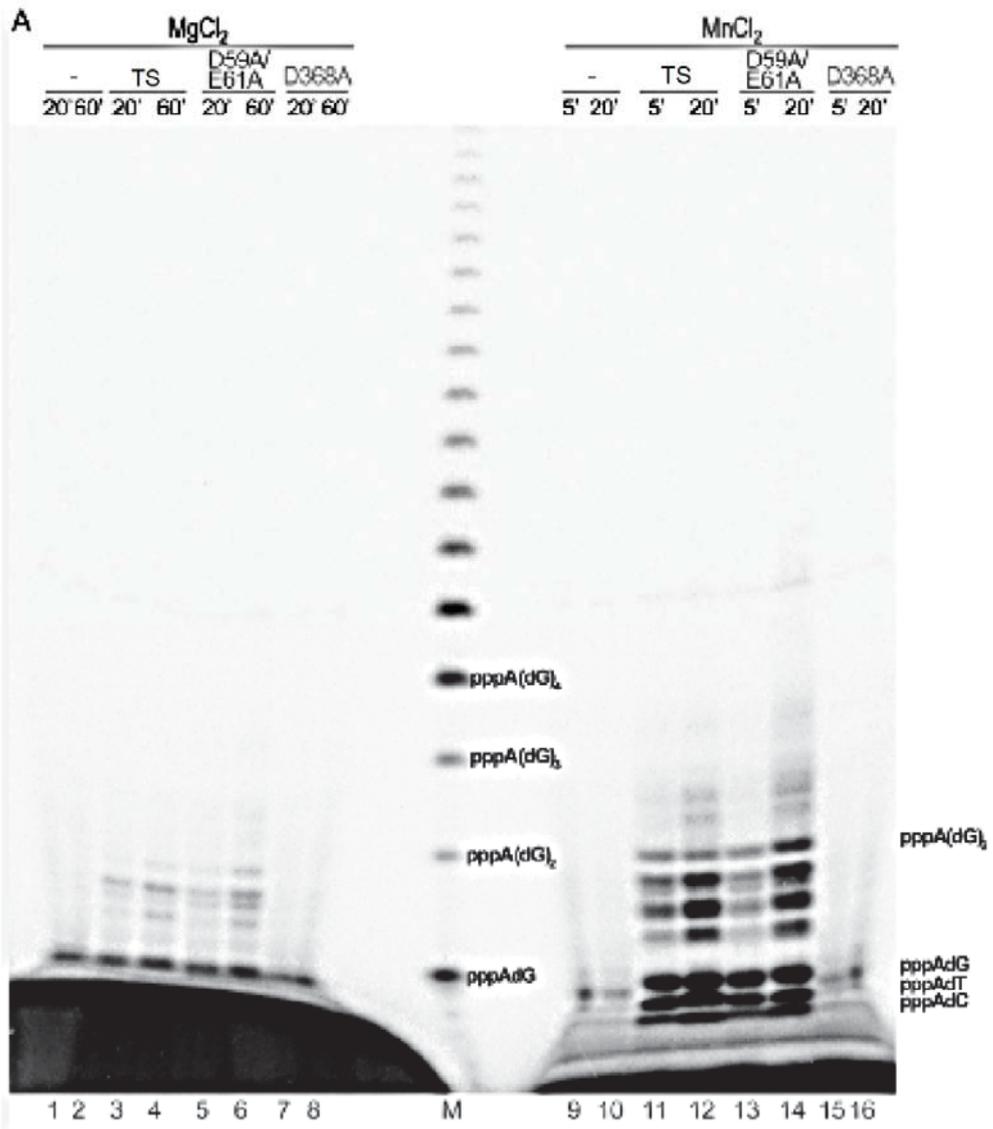


Fig. 4

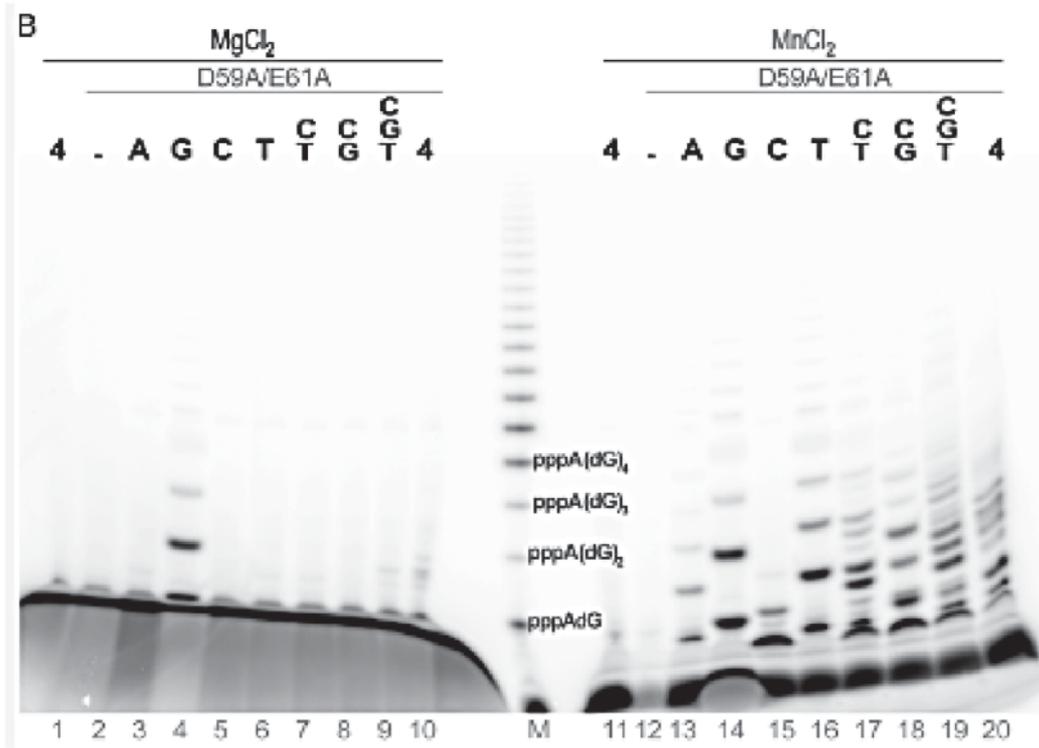


Fig. 4 (cont.)

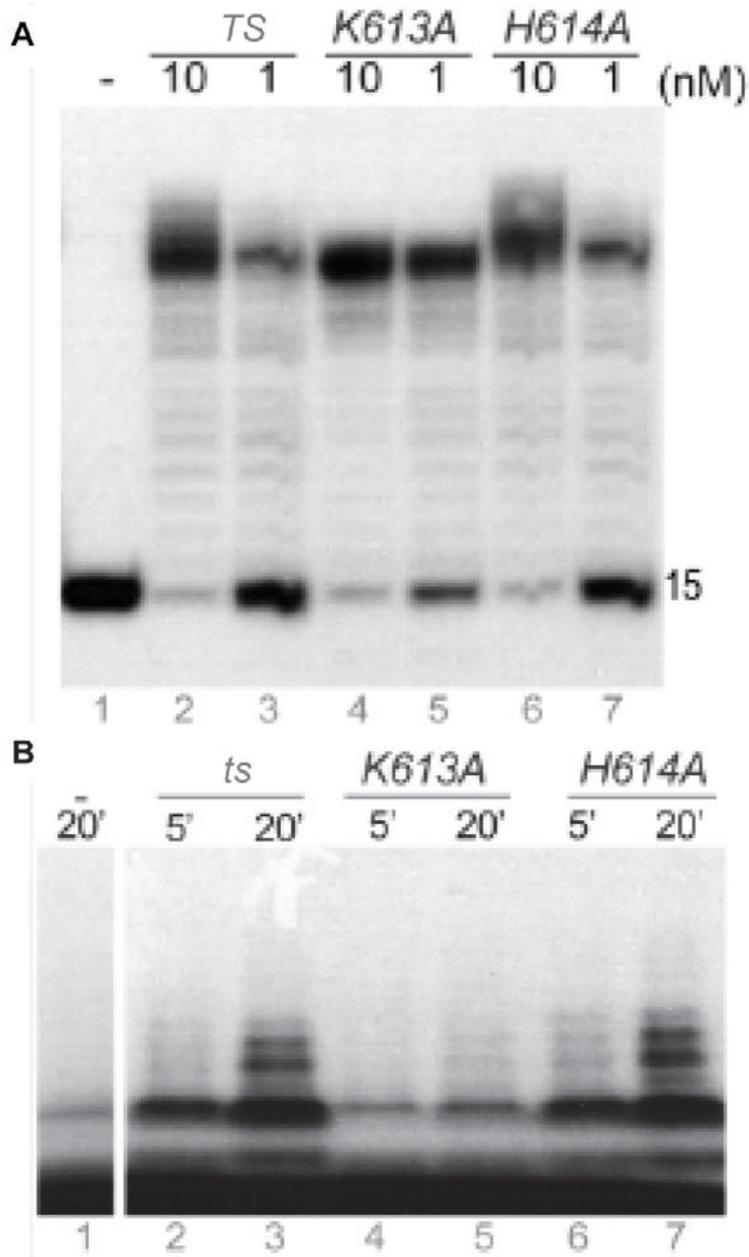


Fig. 5

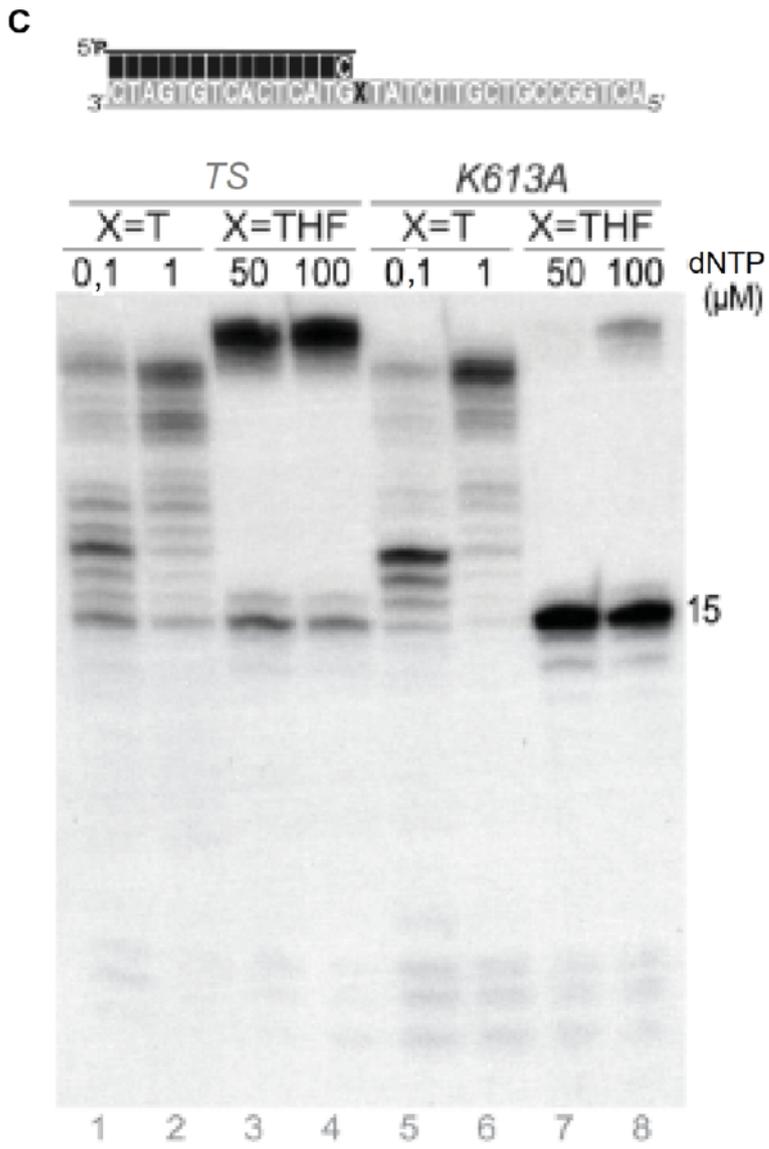


Fig. 5 (cont.)

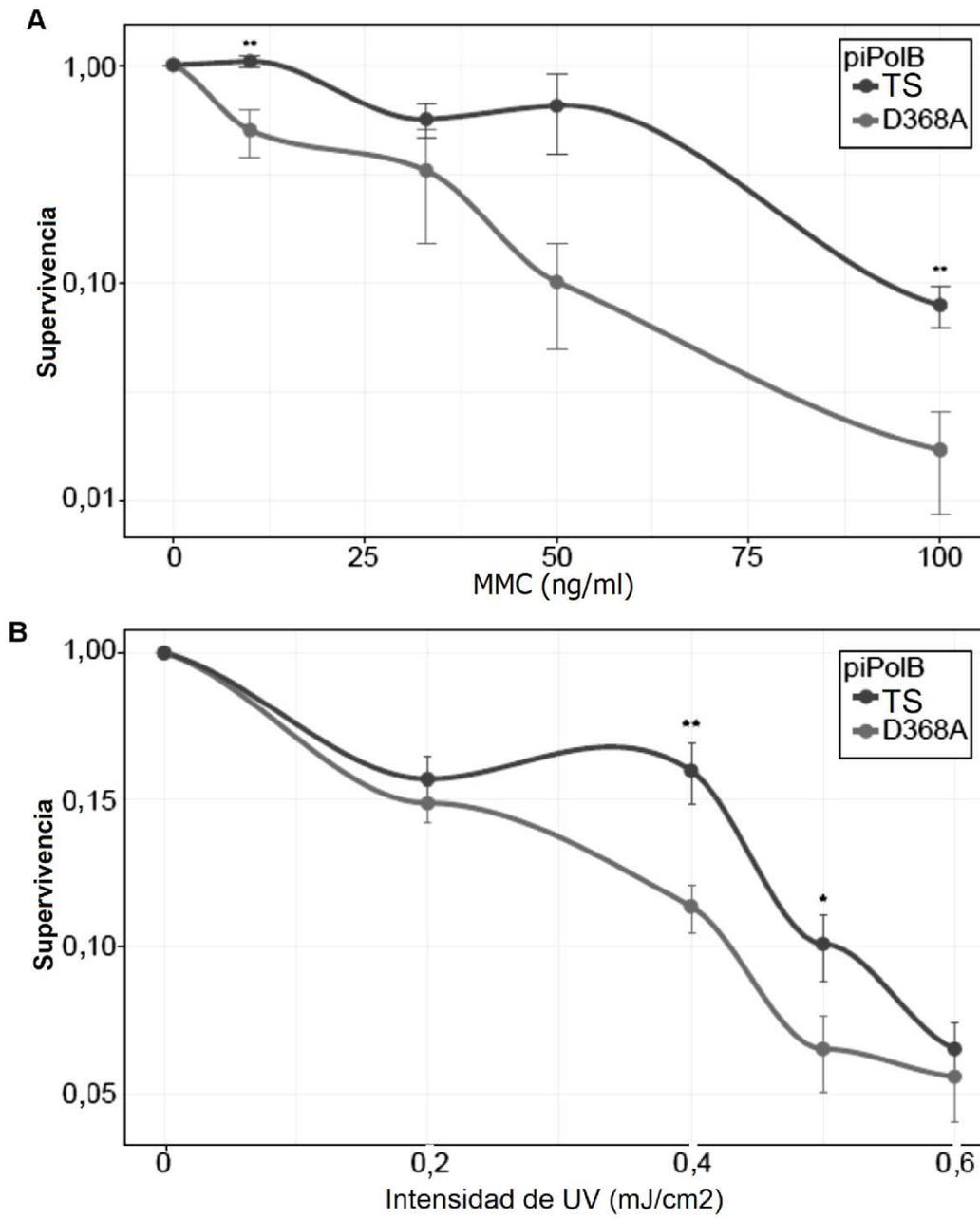


Fig. 6

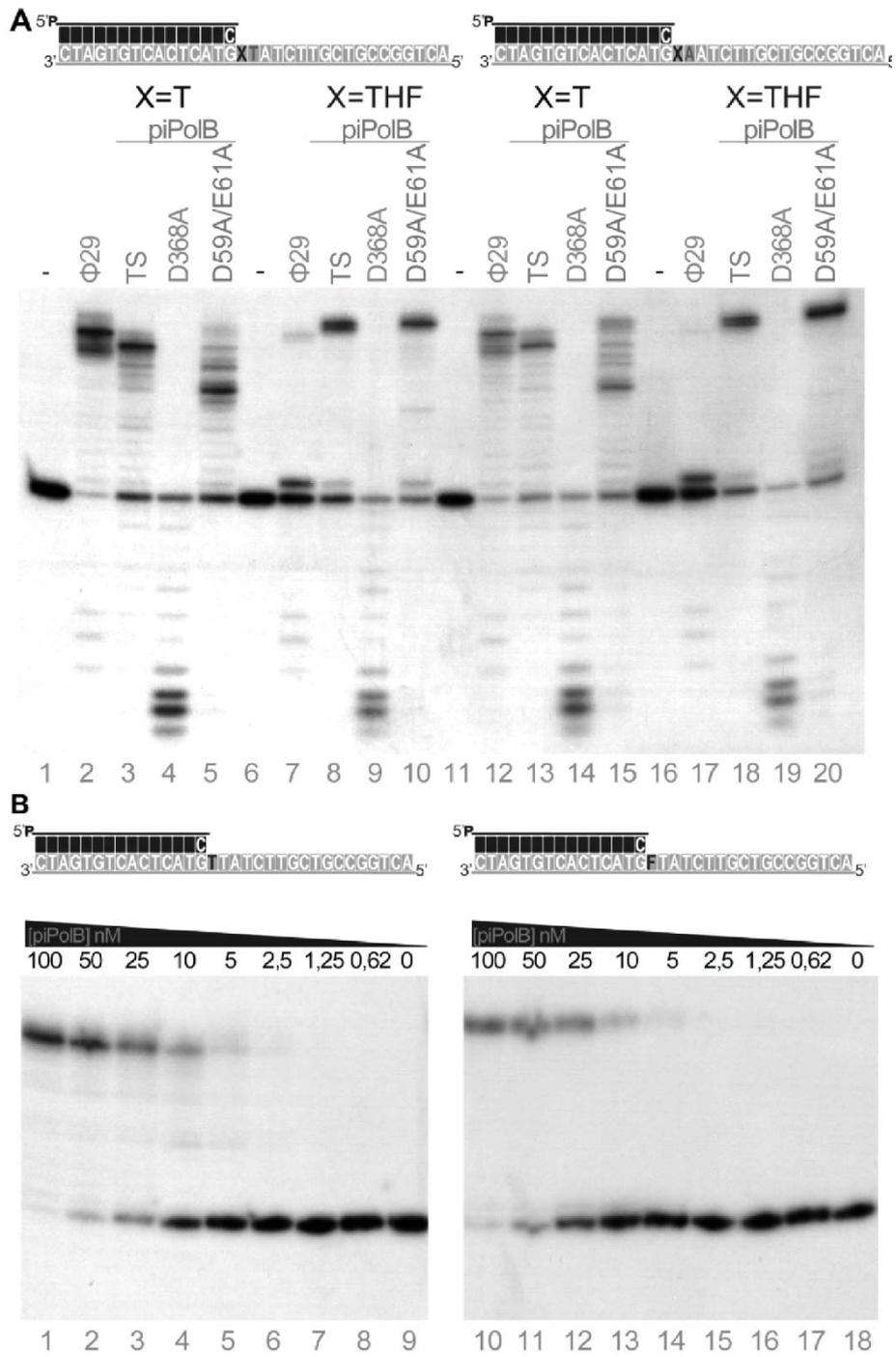


Fig. 7

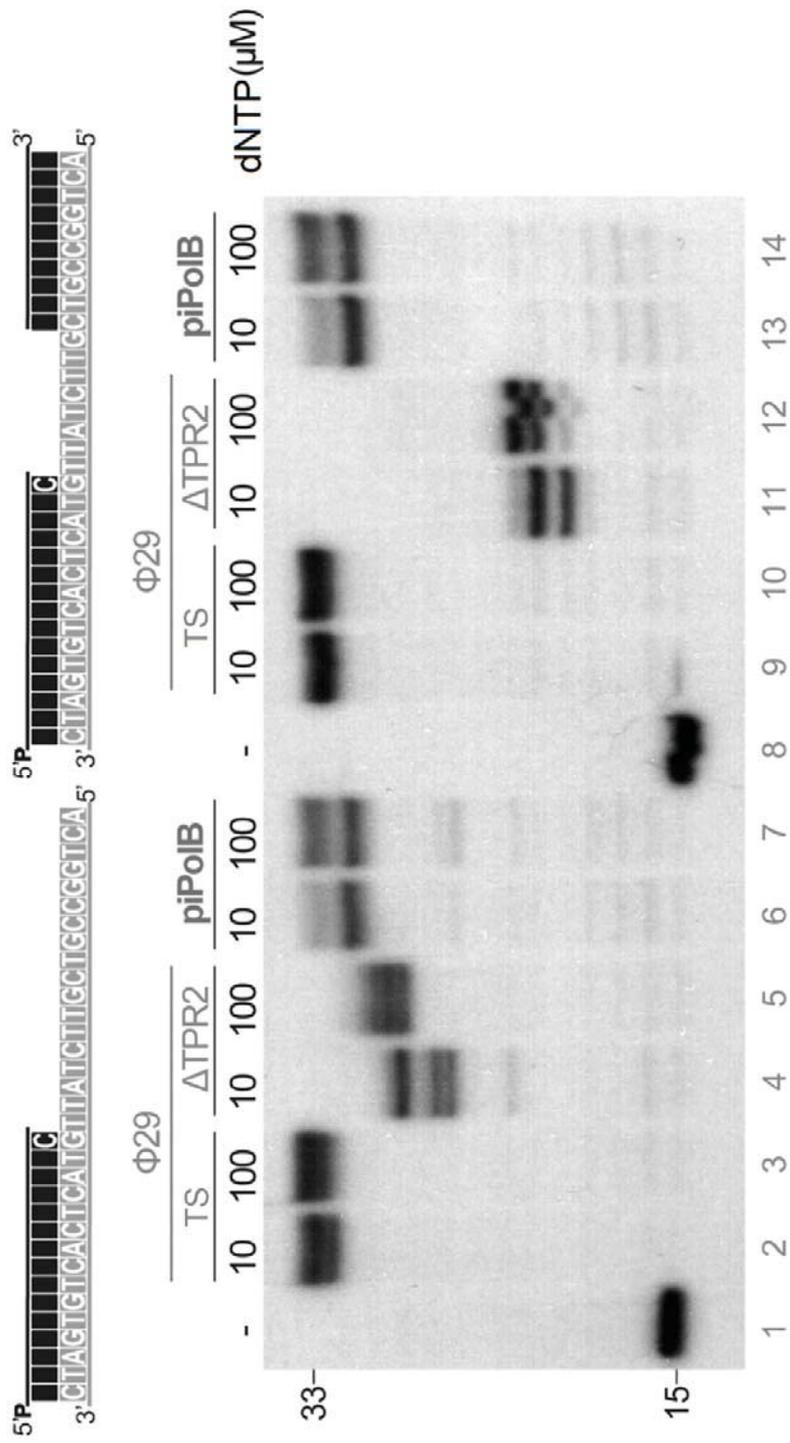


Fig. 8

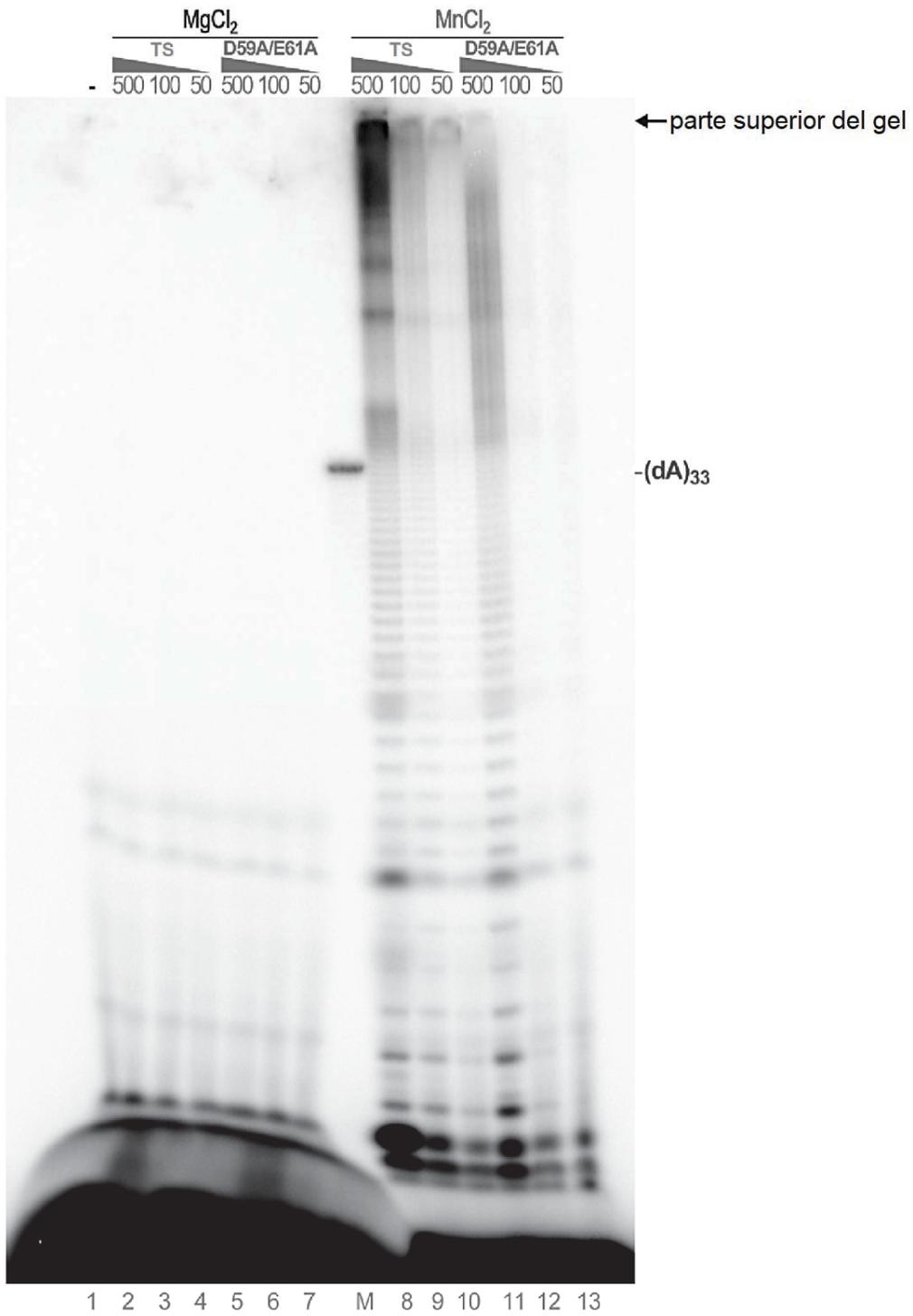


Fig. 9

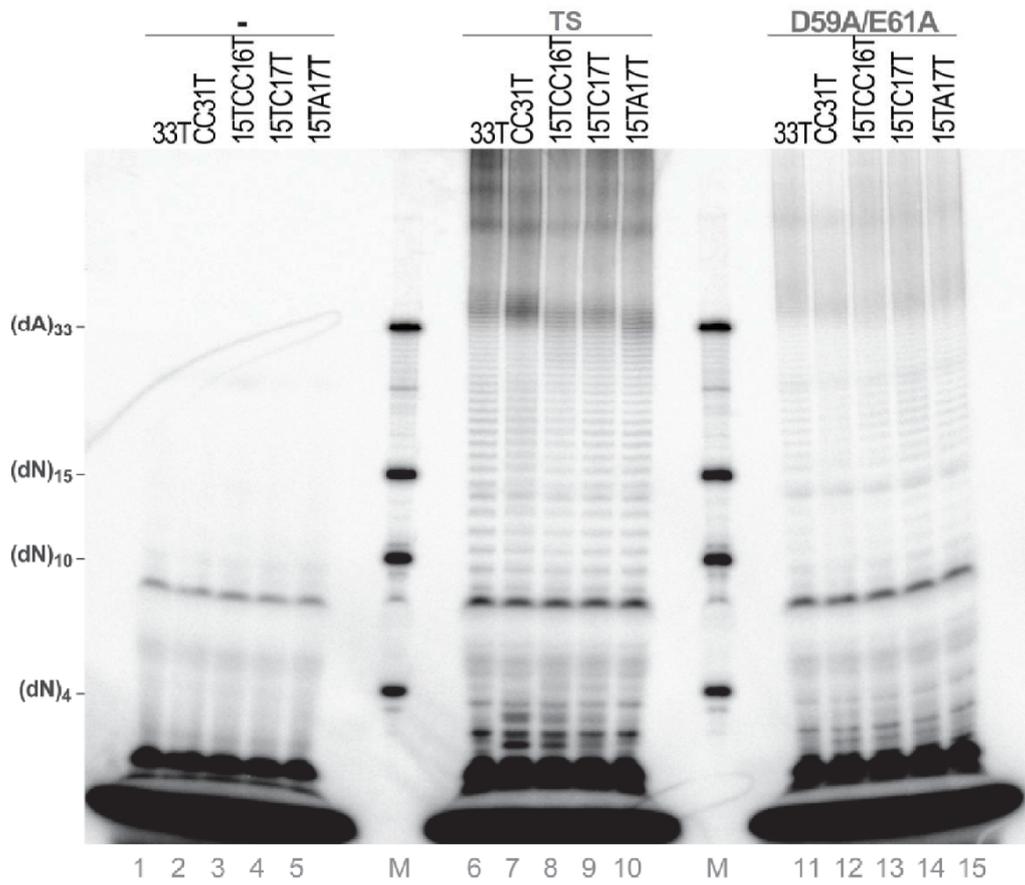
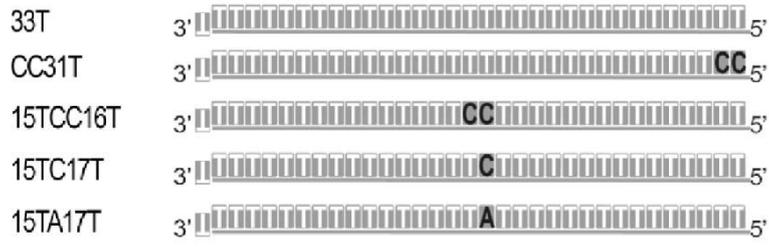


Fig. 10

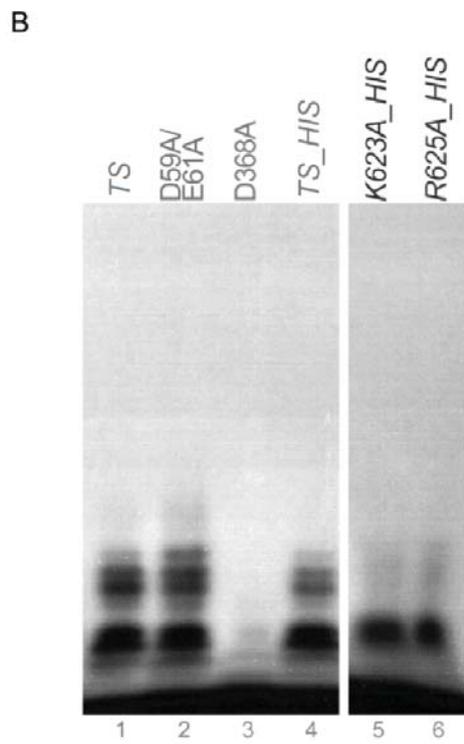
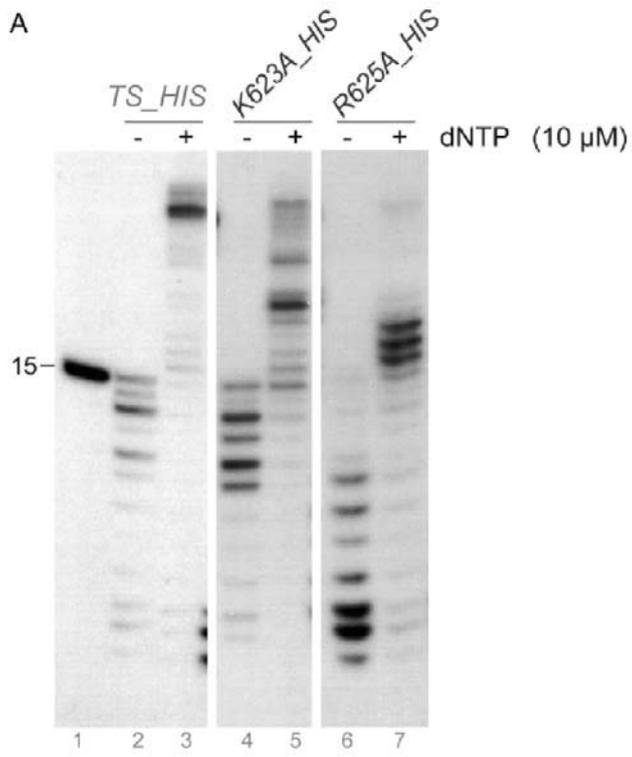


Fig. 11



- ②① N.º solicitud: 201731236
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.10.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2014140309 A1 (SYGNIS BIOTECH S L U) 18/09/2014, resumen y reivindicaciones	1-27
A	EP 2357225 A1 (PASTEUR INSTITUT et al.) 17/08/2011, resumen y reivindicaciones	1-27
A	GUILLIAM THOMAS A et al. "Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes". Nucleic Acids Research AUG 18 2015. , 31/07/2015, Vol. 43, Nº 14, Páginas 6651-6664, ISSN 0305-1048(print) ISSN 1362-4962(electronic), <DOI: doi:10.1093/nar/gkv625>. (apartados "abstract" y "concluding remarks")	1-27
A	BLASCO MARIA A et al. "Primer terminus stabilization at the vphi-29 DNA polymerase active site: Mutational analysis of conserved motif KXY". Journal of Biological Chemistry 1995. , 30/11/1994, Vol. 270, Nº 6, Páginas 2735-2740, ISSN 0021-9258. (apartado "discussion")	1-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.05.2018

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2018.01)

C12N9/12 (2006.01)

C12N15/54 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

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

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, XPESP, MEDLINE, NCBI, EMBL-EBI, bases de datos STN y TXT