

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 001**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2020 PCT/EP2020/063740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2020 WO20234200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2020 E 20730981 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3969575**

54 Título: **Mutantes de ADN polimerasa Phi29 con reconocimiento de cebadores mejorado**

30 Prioridad:

17.05.2019 US 201962849252 P

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

28.04.2025

73 Titular/es:

**4BASEBIO UK LTD (100.00%)
25 Norman Way
Over, Cambridge CB24 5QE, GB**

72 Inventor/es:

**BLANCO DAVILA, LUIS y
PICHER SERANTES, ANGEL JOAQUIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 015 001 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutantes de ADN polimerasa Phi29 con reconocimiento de cebadores mejorado

5 Antecedentes

El ADN polimerasa Phi29 (ADNpol Phi29) es una enzima monomérica (66 kDa) encargada de replicar el genoma del bacteriófago (19 285 pb) mediante la catálisis del inicio cebado por proteínas en ambos extremos de la molécula de ADN lineal, y la elongación completa de cada hebra de ADN (Blanco y Salas, 1984; 1985).
 10 La ADNpol Phi29 pertenece a la familia B de las polimerasas de ADN (Bernad y otros, 1987), que muestra el pliegue de la mano derecha común que contiene los subdominios de la palma, el pulgar y el dedo, pero también dos dominios adicionales llamados TPR1 y TPR2 (Rodríguez y otros, 2005; Kamtekar y otros, 2006; Berman y otros, 2007). La ADNpol Phi29 muestra propiedades únicas que permiten su aplicación en numerosas tecnologías y plataformas de amplificación y secuenciación de ADN: síntesis de ADN altamente procesiva, lo
 15 que permite que la enzima incorpore más de 70 000 nucleótidos por evento de unión al ADN en ausencia de factores de procesividad (Blanco y otros, 1989); desplazamiento de hebra excepcional, que permite la polimerización acoplada al desenrollamiento del ADN de doble hebra, en ausencia de enzimas tipo helicasa (Blanco y otros, 1989); alta fidelidad de síntesis, con tasas de inserción de errores muy bajas (10^{-4} a 10^{-6}) y la corrección eficiente de errores insertados, que mejoran colectivamente la fidelidad hasta un error en 10^8 a 10^9
 20 nucleótidos incorporados (Esteban y otros, 1993 y 1994).

Estas propiedades hacen de ADNpol Phi29 la mejor opción para la amplificación por desplazamiento múltiple isotérmica (MDA) (Dean y otros, 2002) y la amplificación de círculo rodante (RCA) (Lizardi y otros, 1998). Estas tecnologías de amplificación de ADN se basan en la combinación de ADNpol Phi29 con cebadores sintéticos
 25 aleatorios (RP), principalmente hexanucleótidos o hexámeros, o una primasa de ADN capaz de sintetizar cebadores de ADN *in situ* durante la reacción (Picher y otros, 2016).

La amplificación del ADN se requiere con frecuencia para las tecnologías de secuenciación actuales, ya que la cantidad de ADN disponible de ciertas muestras (por ejemplo, células individuales) no es suficiente para el
 30 proceso de secuenciación. Desafortunadamente, la amplificación del ADN tiene el riesgo de introducir errores, generar asimetrías (sesgo) e incluso promover la coamplificación de niveles mínimos de ADN contaminante. Por lo tanto, los parámetros clave que determinan la calidad de la amplificación son la ausencia de contaminación y artefactos en los productos de reacción, amplitud y uniformidad de la cobertura, bajas tasas de error de nucleótidos y la capacidad de recuperar variantes de nucleótidos únicos (SNV), variantes de número
 35 de copias (CNV) y variantes estructurales.

Una fuente de sesgo de amplificación potencial en los métodos de MDA actuales basados en hexámeros aleatorios es la desigualdad de activación que surge de diferentes cinéticas de hibridación dependientes de la
 40 secuencia de los oligonucleótidos. Incluso más importante es la propensión a generar artefactos de amplificación de ADN independiente de la entrada derivados de cebadores, provocados por la amplificación exponencial de hexámeros de autoapareamiento.

Se ha demostrado que el uso de cebadores más largos en lugar de hexámeros con una temperatura de reacción de 40 °C disminuye significativamente los artefactos de amplificación del ADN (Alsmadi y otros, 2009). La razón
 45 más probable detrás de este comportamiento es que la temperatura más alta reduce la probabilidad de emparejamiento autorreplicante estable de los cebadores y, por lo tanto, su amplificación subsecuente. Sin embargo, para llevar a cabo la reacción de amplificación a una temperatura tan alta como 40 °C (10 °C por encima de la temperatura óptima de ADNpol Phi29) se requieren variantes de ADNpol Phi29 termorresistentes o termorresistentes. Con respecto a esto, se ha descrito que algunas ADNpol Phi29 mutadas muestran una
 50 termorresistencia mejorada (Povilaitis y otros, 2016).

El documento WO2019/019222 A1 describe mutantes del ADN polimerasa Phi29 que tienen un aumento de la estabilidad térmica.

55 Breve descripción de las figuras

Las figuras acompañantes, que se incorporan en la presente descripción y forman parte de la descripción, ilustran modalidades ilustrativas y, junto con la descripción, sirven además para permitir que un experto en la técnica pertinente haga y use estas modalidades y otras que serán evidentes para los expertos en la técnica.
 60 La invención se describirá más particularmente junto con los siguientes dibujos en donde:

Figura 1. Estructura 3D del complejo de ADNpol Phi29 con ADN y dNTP (PDB id: 2PYL). La mayor parte de la proteína se indica en blanco, con la excepción de los subdominios PULGAR (verde oscuro), TPR2 (cian) y TPR1 (amarillo). El dominio de exonucleasa 3'-5' N-terminal no se representa completamente (solo se indican
 65 dos segmentos (amarillo), uno que contiene Arg⁹⁶, y el otro que contiene Lys⁶⁴). La hebra cebadora (cian)

muestra números correspondientes a cada posición de nucleótido. También se indican la hebra plantilla (verde claro), el nucleótido entrante (magenta) y los dos iones metálicos activadores (beige).

5 Figura 2. A) Vista esquemática de los residuos de aminoácidos de la ADNpol Phi29 de tipo silvestre (WT) implicados en la interacción con los primeros 10 nucleótidos de la hebra cebadora, derivados de la estructura cristalina (PDB id: 2PYL). El nucleótido numerado como 1 es el más 3'-terminal, descrito frecuentemente como "extremo de cebador", y el más cercano al sitio activo de la enzima. B) El esquema muestra la ganancia de nuevas interacciones con la hebra cebadora, originadas por las diferentes mutaciones indicadas (magenta). Las flechas de colores indican si la interacción implica el fosfodiéster (rojo), el azúcar (naranja) o la base (verde).
10 Se predice que los mutantes T499K y T499R interactúan con las mismas posiciones de la hebra complementaria/plantilla (indicadas con flechas de línea discontinua).

15 Figura 3. Eficiencia de amplificación de ADNpol Phi29 WT o los mutantes diseñados, en combinación con TthPrimPol o cebadores aleatorios de diferentes longitudes: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N), mediante el uso de 1 ng de ADN genómico humano como entrada en la reacción.

20 Figura 4. Equilibrio de actividades exonucleasa y polimerasa de ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, M97K mutante y mutante doble K64R/M97K, como una función de la concentración de desoxinucleótidos (dNTP) proporcionada.

25 Figura 5. Eficiencia de amplificación de ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, M97K mutante y mutante doble K64R/M97K, en combinación con cebadores aleatorios de diferentes longitudes: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N), mediante el uso de 1 ng de ADN genómico humano como entrada en la reacción. Para cada longitud de cebador N, las columnas se muestran en el siguiente orden de izquierda a derecha: ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, mutante M97K, mutante doble K64R/M97K.

30 Figura 6. Rendimiento de amplificación observado en ausencia de ADN inicial con ADNpol WT Phi29, mutante K64R, M97K mutante o mutante doble K64R/M97K, en combinación con cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N), en condiciones de baja fuerza iónica. Para cada longitud de cebador N, las columnas se muestran en el siguiente orden de izquierda a derecha: ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, mutante M97K, mutante doble K64R/M97K.
35

40 Figura 7. Rendimiento de amplificación observado en ausencia de ADN inicial con ADNpol WT Phi29, mutante K64R, M97K mutante o mutante doble K64R/M97K, en combinación con cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N), en condiciones de alta fuerza iónica. Para cada longitud de cebador N, las columnas se muestran en el siguiente orden de izquierda a derecha: ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, mutante M97K, mutante doble K64R/M97K.

45 Figura 8. Eficiencia de amplificación de ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, M97K mutante y mutante doble K64R/M97K, en combinación con cebadores aleatorios de diferentes longitudes: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N), mediante el uso de 1 ng de ADN genómico humano como entrada en la reacción, en condiciones de alta fuerza iónica. Para cada longitud de cebador N, las columnas se muestran en el siguiente orden de izquierda a derecha: ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, mutante M97K, mutante doble K64R/M97K.

50 Figura 9. Eficiencia de amplificación de ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, M97K mutante y mutante doble K64R/M97K, en combinación con cebadores aleatorios de diferentes longitudes (tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N)), mediante el uso de diferentes entradas de ADN genómico humano (1, 10, 100 pg y 1 ng) en la reacción, en condiciones de fuerza iónica baja y alta. Para cada longitud de cebador N, las columnas se muestran en el siguiente orden de izquierda a derecha: ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, mutante M97K, mutante doble K64R/M97K.
55

60 Figura 10. Amplificación de 1, 10, 100 pg y 1 ng de ADN genómico humano mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) que combina variantes de ADNpol Phi29 y TthPrimPol. Para cada cantidad de ADN, las columnas se muestran en el siguiente orden de izquierda a derecha: ADNpol Phi29 WT, mutante K64R, mutante M97K, mutante doble K64R/M97K.

65 Figura 11. Valores de cobertura estimados obtenidos del análisis CovCheck de reacciones de amplificación mediante el uso de hexámeros (6N), pentámeros (5N) y tetrámeros (4N), en combinación con variantes de ADNpol Phi29 y diferentes entradas de ADN genómico humano en cada caso para alcanzar condiciones en las que pueden observarse diferencias de cobertura.

Figura 12. Valores de cobertura estimados obtenidos del análisis CovCheck de reacciones de amplificación realizadas por TfhPrimPol en combinación con variantes de ADNpol Phi29.

Resumen

5 Los ADN polimerasas modificadas pueden ser útiles en múltiples aplicaciones como la secuenciación de ADN, la amplificación de ADN, la preparación de bibliotecas, la tipificación de ADN, etc. La presente invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona ADN polimerasas Phi29 recombinantes que incluyen mutaciones que confieren propiedades mejoradas, particularmente convenientes para estas u otras aplicaciones. Estos cambios de secuencia de aminoácidos pueden mejorar el rendimiento en la amplificación de ADN de desplazamiento múltiple (MDA) mediante el uso de cebadores sintéticos aleatorios más cortos, lo que da como resultado artefactos de amplificación reducidos, una mejor cinética de hibridación dependiente de la secuencia y, por lo tanto, da como resultado una amplitud y uniformidad de la cobertura mejoradas. "Phi29" a veces se escribe "ϕ29".

15 El ADN polimerasa Phi29 recombinante comprende la sustitución de aminoácido K64R, y opcionalmente M97K.

Descripción detallada

20 I. Definiciones

"Aislado" significa que una molécula es la especie predominante presente, es decir, sobre una base molar, más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición. Generalmente, una molécula aislada puede comprender más de 80 %, más de 90 %, más de 95 %, más de 98 % o más de 99 % de la especie macromolecular presente en la composición es la especie purificada de interés. Las especies de solvente, las moléculas pequeñas (<math>< 500</math> Daltons), los estabilizadores (por ejemplo, BSA) y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares para los propósitos de esta definición.

30 Como se usa en la presente, el término "ácido nucleico recombinante" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende dos o más secuencias de nucleótidos unidas que normalmente no se unen entre sí en la naturaleza.

35 Como se usa en la presente, el término "célula recombinante" se refiere a una célula, por ejemplo, una célula animal, vegetal, fúngica o microbiana (por ejemplo, bacteriana), que comprende un ácido nucleico recombinante.

40 Los términos usados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos incluyen "secuencia de referencia", "seleccionada de", "ventana de comparación", "idéntica", "porcentaje de identidad de secuencia", "sustancialmente idéntica", "complementaria" y "sustancialmente complementaria".

45 Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias y puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, una secuencia completa de ADNc, proteína o gen.

50 Debido a que dos ácidos nucleicos o polipéptidos cada uno puede comprender (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia de ácido nucleico o polipéptido completo) que es similar entre los dos ácidos nucleicos, o (2) una secuencia que es divergente entre los dos ácidos nucleicos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) ácidos nucleicos o polipéptidos se realizan típicamente mediante la comparación de secuencias de los dos ácidos nucleicos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

55 Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de típicamente al menos 12 nucleótidos consecutivos o 4 residuos de aminoácidos consecutivos que se compara con una secuencia de referencia. La ventana de comparación tiene frecuentemente una longitud de al menos 15 o al menos 25 nucleótidos o al menos 5 o al menos 8 aminoácidos. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) de aproximadamente 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones informáticas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección, y la mejor alineación (es decir, que resulta en el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos se selecciona.

65

Una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos del sujeto es "idéntica" a una secuencia de referencia si las dos secuencias son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia a lo largo de la longitud de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos.

5 El "porcentaje de identidad de secuencia" entre dos secuencias se calcula mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, la determinación del número de posiciones en las que el nucleótido o aminoácido idéntico ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, la división del número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y la multiplicación del resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, la ventana de comparación usada para comparar dos secuencias es la longitud de la secuencia más corta.

15 Los métodos se describen además en Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; Higgins & Sharp (1988) Gene 73:237-244; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989); Corpet y otros. (1988) Nucleic Acids Research 16:10881-90; Huang y otros. (1992) Computer Applications in the Biosciences 8:155-65; y Pearson y otros. (1994) Methods in Molecular Biology 24:307-31. La alineación también se realiza a menudo mediante inspección y alineación manual.

20 Una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos del sujeto es "sustancialmente idéntica" a una secuencia de referencia si la secuencia de aminoácidos del sujeto o secuencia de nucleótidos tiene al menos 80 % de identidad de secuencia en una ventana de comparación. Por lo tanto, las secuencias que tienen al menos 85 % de identidad de secuencia, al menos 90 % de identidad de secuencia, al menos 95 % de identidad de secuencia, al menos 98 % de identidad de secuencia o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia también son "sustancialmente idénticas". Dos secuencias que son idénticas entre sí son, por supuesto, también "sustancialmente idénticas".

30 Como se usa en la presente, el término "secuencia reguladora de la transcripción" se refiere a una primera secuencia de nucleótidos que regula la transcripción de una segunda secuencia de nucleótidos a la que se une operativamente.

35 Como se usa en la presente, una secuencia de nucleótidos está "unida operativamente" con una secuencia reguladora de la transcripción cuando la secuencia reguladora de la transcripción funciona en una célula para regular la transcripción de la secuencia de nucleótidos. Esto incluye promover la transcripción de la secuencia de nucleótidos a través de una interacción entre una polimerasa y un promotor.

40 Un "promotor" es una secuencia reguladora de la transcripción al menos suficiente para promover la transcripción de una secuencia de nucleótidos en ADN en un transcrito de ARN. Una transcripción transcrita de un promotor incluye típicamente secuencias del promotor aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción, así como también secuencias aguas abajo que, en el caso del ARNm, codifican una secuencia de aminoácidos. Los promotores son las secuencias reguladoras de la transcripción mejor caracterizadas debido a su ubicación predecible inmediatamente aguas arriba de los sitios de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen secuencias que modulan la actividad de reconocimiento, unión e inicio de la transcripción de la ARN polimerasa.

45 Estas secuencias pueden actuar de manera cis o pueden responder a factores de acción en trans. Los promotores, en dependencia de la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o regulados. A menudo se describen como que tienen dos segmentos separados: núcleo y regiones promotoras extendidas.

50 El promotor central incluye secuencias que son suficientes para el reconocimiento, la unión y el inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. El promotor central incluye el sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a la polimerasa de ARN y otros sitios de unión a la transcripción general y es donde se forma el complejo de preiniciación y se ensambla la maquinaria de transcripción general. El complejo de preiniciación generalmente está dentro de 50 nucleótidos (nt) del sitio de inicio de la transcripción (TSS).

55 El promotor central también incluye una secuencia para un sitio de unión al ribosoma, necesario para la traducción de un ARNm en un polipéptido.

60 La región promotora extendida incluye el llamado promotor proximal, que se extiende a aproximadamente 250 nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (es decir, -250 nt). Incluye elementos reguladores primarios tales como sitios de unión a factores de transcripción específicos. Se ha descubierto que muchos genes tienen elementos reguladores de la transcripción ubicados más aguas arriba. En particular, un fragmento que incluye la mayoría de los elementos reguladores de la transcripción de un gen puede extenderse hasta 700 nt o más corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. En ciertos genes, se han encontrado secuencias reguladoras de la transcripción a miles de nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción.

65

Como se usa en la presente, una primera secuencia de nucleótidos es “heteróloga” a una segunda secuencia de nucleótidos si la primera secuencia de nucleótidos no se une, por ejemplo, se une operativamente, con la segunda secuencia de nucleótidos en la naturaleza. Por extensión, un polipéptido es “heterólogo” a la secuencia reguladora de la transcripción si se codifica por una secuencia de nucleótidos heteróloga a la secuencia reguladora de la transcripción.

Como se usa en la presente, el término “variante alélica” se refiere a una variación de un gen de origen natural.

Como se usa en la presente, el término “variante artificial” se refiere a un gen o proteína que comprende una o más modificaciones genéticas a un gen o proteína de origen natural.

Como se usa en la presente, el término “mutación” como se usa en la presente, generalmente se refiere a una alteración, variante o polimorfismo en una secuencia de nucleótidos en comparación con el tipo silvestre. Tal alteración, variante o polimorfismo puede ser con respecto a un genoma de referencia, por ejemplo, en una base de datos genómica. Las mutaciones incluyen, entre otras, variaciones de nucleótido único (SNV), sustituciones, inserciones o deleciones (también denominadas colectivamente “indeles”) y repeticiones.

II. Introducción

Una estrategia novedosa para reducir los artefactos de amplificación y los sesgos de amplificación derivados de la cinética de hibridación dependiente de la secuencia podría aprovechar el uso de cebadores de ADN más cortos que los hexámeros de la norma de referencia actuales. Esa estrategia, que requiere obtener variantes de ADNpol Phi29 capaces de reconocer, unirse de manera estable y usar de manera eficiente cebadores de ADN más cortos, permitiría mejorar significativamente las tecnologías actuales de amplificación de ADN.

La disponibilidad de la estructura 3D del complejo de ADNpol Phi29 con ADN y nucleótido entrante (Berman y otros, 2007) nos permitió realizar una inspección detallada de los residuos de aminoácidos directamente involucrados en las interacciones con la hebra cebadora (Figura 1). Estos ligandos de la hebra cebadora (ver el esquema de la Figura 2A) son:

- R96 (interactúa con la fosfodiéster entre los nucleótidos 7 y 8 del cebador).
- R306 (interactúa con la fosfodiéster entre los nucleótidos 8 y 9 del cebador).
- R308 (interactúa con la fosfodiéster entre los nucleótidos 9 y 10 del cebador).
- K498 (interactúa con el azúcar del primer nucleótido 3' del cebador).
- Y500 (interactúa con la fosfodiéster entre los nucleótidos 1 y 2 del cebador).
- K529 (interactúa con la fosfodiéster entre los nucleótidos 1 y 2 del cebador).

En base a estos pocos contactos, la ADNpol Phi29 establece interacciones directas que abarcan las primeras 10 bases de la hebra cebadora, lo que sugiere que tal tamaño conferiría la estabilidad de unión máxima al cebador. Es bastante sorprendente que haya una falta de contactos en el intervalo entre los nucleótidos 3 y 6. Notablemente, los procedimientos de MDA actuales con ADNpol Phi29 se basan en la provisión de hexámeros aleatorios, que se estabilizarán mal solo por los contactos con el enlace fosfodiéster entre los dos primeros nucleótidos, y con la base del nucleótido terminal 3'. Por lo tanto, los hexámeros no tienen un tamaño óptimo para usarse como cebadores iniciales que se unirán y extenderán por la ADNpol Phi29. Es muy probable que estos cebadores subóptimos se seleccionaran para que tuvieran complementos en cualquier muestra de ADN en intervalos suficientemente cortos para permitir una amplificación eficiente e incluso, mientras se minimizan los artefactos de auto-hibridación, conocidos como dímeros de cebadores.

Por otro lado, la tecnología de amplificación de ADN TruePrime alternativa (Picher y otros, 2016) aprovecha una primasa de ADN (TtrPrimPol) para sintetizar los cebadores de ADN a demanda, pero no se ha establecido cuál es el tamaño óptimo del cebador que se suministra por TthPrimPol a ADNpol Phi29, y cuál es el destino de esos cebadores que permanecen más cortos que el tamaño mínimo requerido para la elongación óptima por ADNpol Phi29.

Con base en esta información y advertencias, exploramos la posibilidad de generar mutantes de ADNpol Phi29 (variantes de la invención) con una afinidad mejorada por cebadores cortos, idealmente en el límite entre 4 y 6 nucleótidos. Para este propósito, seguimos dos enfoques diferentes: 1) reforzar algunas interacciones existentes, 2) crear una nueva enzima (no existente): Ligandos de ADN en la región de cebador.

Se espera que tales variantes mejoradas sean valiosas en procedimientos de MDA basados en RP, lo que probablemente reduzca los artefactos de dímeros de cebadores y la formación de quimeras de amplificación. Adicionalmente, en el contexto de la tecnología de amplificación de ADN TruePrime, el uso de cebadores cortos que podrían generarse por TthPrimPol, podría aumentar la eficiencia de la amplificación y/o conducir a una cobertura mejorada.

ES 3 015 001 T3

Nuevamente, un análisis detallado de la estructura 3D de la ADNpol Phi29 (Berman y otros, 2007) permitió seleccionar 5 residuos de aminoácidos como candidatos para mutaciones de “ganancia de función”. Estos residuos son: Lys64 (ubicado en el motivo Exoll), Met97 (vecino a Arg96, un ligando de iniciación de ADNpol Phi29 WT), Thr499 (vecino a Lys498 y Tyr500, dos ligandos de iniciación de ADNpol Phi29 WT), Thr534 y Lys538 (cerca de Lys529, un ligando cebador de ADNpol Phi29 WT). Las mutaciones seleccionadas en estos residuos (resumidas en la Figura 2B) fueron:

• K64R, que produce la ganancia de interacción con el fosfodiéster entre los residuos 4 y 5 de la hebra cebadora.

• K64KG; K64KK; L63LG; L63LH, como mutaciones de inserción +1 flanqueantes de Lys64, diseñadas de acuerdo con la heterogeneidad observada en diferentes motivos Exoll del ADN polimerasas de la familia B. También se prevé que estos cambios ganen interacción con los residuos 4 y 5 de la hebra cebadora.

• R96K, se prevé que debilite la interacción con el enlace fosfodiéster entre los residuos 7 y 8 del cebador.

• M97K, que produce la ganancia de interacción con la base de nitrógeno del nucleótido 5 de la hebra cebadora.

• M97R, que produce la ganancia de interacción con las bases de los residuos de aminoácidos 4 y 5 de la hebra cebadora.

• T499K, lo que produce la ganancia de interacción con el azúcar del residuo de aminoácido 5 de la hebra plantilla.

• T499R, lo que produce la ganancia de interacción con el azúcar de los residuos de aminoácidos 4 y 5 de la hebra plantilla.

• K529R, que produce la ganancia de una doble interacción con los enlaces fosfodiéster entre los residuos 1 y 3 de la hebra cebadora.

• T534K, que produce la ganancia de interacción con el azúcar del residuo de aminoácido 4 de la hebra cebadora.

• T534R, que produce la ganancia de interacción con el fosfodiéster entre los residuos 3 y 4 de la hebra cebadora.

• K538R, que produce la ganancia de interacción con el fosfodiéster entre los residuos 2 y 3 de la hebra cebadora.

Los mutantes indicados, diseñados para aumentar la afinidad de la ADNpol Phi29 por cebadores cortos, se expresaron y purificaron siguiendo protocolos estándar para obtener ADNpol Phi29 WT. No puede preverse si cualquier ganancia particular de interacción con la hebra cebadora originada por las mutaciones introducidas tendrá un efecto adverso sobre las características de la ADNpol Phi29 como la translocación, la procesividad o las tecnologías de amplificación de ADN apropiadas (TthPrimPol) y de cebado aleatorio.

III. Ácidos nucleicos, constructos de expresión, células recombinantes y polipéptidos de polimerasa mutantes

A. Ácidos nucleicos

En la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos que codifican polimerasas Phi29 mutantes con reconocimiento de cebadores mejorado. La secuencia de nucleótidos para una polimerasa Phi29 de tipo silvestre se proporciona en la SEQ ID NO.: 1. Los ácidos nucleicos que codifican secuencias de polimerasas Phi29 mutantes tienen una o ambas mutaciones K64R y M97K. En algunas modalidades, las secuencias de nucleótidos que codifican una o ambas de estas mutaciones son sustancialmente idénticas a la secuencia de SEQ ID NO.: 1.

B. Constructos de expresión

También se proporcionan en la presente descripción constructos de expresión que comprenden una secuencia reguladora de la transcripción unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una polimerasa Phi29 mutante como se describe en la presente descripción. El constructo de expresión puede tomar la forma de un plásmido o cualquier otra forma apropiada para la expresión en una célula de interés.

C. Células recombinantes

También se proporcionan en la presente descripción células recombinantes que comprenden un constructo de expresión como se describe en la presente descripción. En determinadas modalidades, las células son células bacterianas. Tales células recombinantes son útiles para reproducir las moléculas de ácido nucleico de esta descripción y para producir polimerasas Phi29 mutantes de esta descripción. Las polimerasas Phi29 mutantes pueden producirse mediante el cultivo de células recombinantes que comprenden un constructo de expresión. La secuencia reguladora de la transcripción usada puede comprender un promotor constitutivo.

D. Polimerasas Phi29 mutantes

También se proporcionan en la presente descripción polimerasas Phi29 mutantes con reconocimiento de cebador mejorado. Las polimerasas Phi29 mutantes de esta descripción tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.: 1 (también depositada como UniProtKB - P03680) y que comprenden una o ambas sustituciones de aminoácidos K64R y M97K.

Las polimerasas que tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas pueden basarse en secuencias de origen natural, tales como variantes alélicas, siempre que incluyan una o ambas de las sustituciones de aminoácidos K64R y M97K. Tales variantes pueden tener a lo máximo o no más de cualquiera de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22,21,20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo silvestre SEQ ID NO.: 1, siempre y cuando una o ambas de las sustituciones de aminoácidos K64R y M97K estén presentes.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del ADN polimerasas de la invención tiene una identidad de al menos 80 % con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Con mayor preferencia, la secuencia de aminoácidos de las polimerasas de la invención tiene una identidad de al menos 90 % con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Aún con mayor preferencia, la secuencia de aminoácidos de las polimerasas de la invención es la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

IV. Métodos de uso

En la presente descripción se proporcionan métodos para realizar la extensión del cebador y/o la polimerización de ácido nucleico mediante el uso de las polimerasas Phi29 mutantes descritas en la presente descripción. Los métodos de extensión del cebador son útiles en la replicación, amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos.

La extensión del cebador implica la hibridación de un cebador a una plantilla de molécula de ácido nucleico seguida de una reacción de polimerización catalizada por una polimerasa que añade nucleótidos al extremo 3' terminal del cebador. Los cebadores pueden añadirse a la mezcla de reacción exógenamente, o pueden producirse por una primasa/polimerasa. Las primasas son enzimas que catalizan la síntesis de un oligonucleótido, llamado cebador, complementario a una plantilla de ácido nucleico. Una de tales primasas es TtoPrimPol.

Los cebadores sintéticos se usan típicamente en la amplificación de ácidos nucleicos. Tales cebadores típicamente tienen entre aproximadamente seis y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. Cuando se van a amplificar secuencias específicas, los cebadores pueden tener secuencias complementarias a la secuencia objetivo. Para los propósitos de la amplificación de genoma completo u otras metodologías de amplificación no dirigidas, pueden usarse cebadores aleatorios. Los cebadores aleatorios comprenden típicamente una colección o conjunto de oligonucleótidos en los que cada una de las bases está presente en cada posición en el oligonucleótido en uno o más de los cebadores en el conjunto. En ciertas situaciones, una o más de las posiciones (por ejemplo, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) pueden llenarse por una base fija o una combinación de dos o tres bases.

A. Amplificación

La amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como la introducida por Mullis (US 5,656,493) es una técnica indispensable usada en la investigación médica y biológica. Se ha usado con éxito en una variedad de aplicaciones como clonación, manipulación o secuenciación de ácidos nucleicos, análisis funcional y filogenético de genes basados en ADN, detección y diagnóstico de enfermedades, así como también en ciencia forense y pruebas de paternidad.

B. Amplificación de círculo rodante

La amplificación de círculo rodante es un método para amplificar una molécula de ADN cerrada covalentemente tal como una molécula de ADN de cadena simple, cerrada covalentemente. La molécula de ADN plantilla se activa con un cebador, por ejemplo, un cebador proporcionado por una primasa/polimerasa. Un ADN polimerasa realiza la extensión del cebador sobre el cebador alrededor de la molécula de ADN cerrada. La

polimerasa desplaza la copia hibridada y continúa la extensión polinucleotídica alrededor de la plantilla para producir un producto de amplificación concatenado.

C. Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)

5 La amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) es un método de amplificación de ADN no basado en PCR, isotérmico, en el que la iniciación y la extensión a partir de una plantilla producen cadenas de ADN de una sola hebra que pueden iniciarse y copiarse continuamente mediante síntesis por desplazamiento de hebra, lo que produce una estructura de ADN de múltiples ramificaciones. Después de una desnaturalización inicial de la muestra de ADN de doble hebra, la amplificación por desplazamiento de hebra múltiples (MDA) produce una estructura de múltiples ramificaciones, ya que la síntesis de ADN puede ser cebada y extendida continuamente desde muchas posiciones en las moléculas amplificadas, sin necesidad de más rondas de desnaturalización. Las ramas se desplazan entre sí a medida que se extienden nuevos cebadores desde una plantilla de molécula de ADN hacia el área ramificada. El MDA se describe además en, por ejemplo, W02011/047307A1, publicado el 21 de abril de 2011 ("Amplificación por desplazamiento múltiple"). La MDA podría describirse brevemente como: polimerización isotérmica que extiende los cebadores en múltiples sitios de cebado en plantillas de ADNhu autogeneradas.

20 En determinadas modalidades, MDA emplea trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros u octámeros aleatorios como cebadores para iniciar la amplificación en múltiples sitios de una plantilla inicial y copias amplificadas de esta. En determinadas modalidades de los métodos descritos, la activación se logra con una primasa/polimerasa de ADN, tal como TThPrimPol.

25 En determinadas modalidades, la amplificación de polinucleótidos lineales de doble hebra implica el uso de: 1) cebadores sintéticos aleatorios y/o una primasa/polimerasa dirigida al ADN, tal como TThPrimPol; 2) un ADN polimerasa modificada que tiene actividad de desplazamiento de hebra, tal como ADNpol Phi29; 3) dNTP. En determinadas modalidades, los sustratos de dNTP no están modificados. En otras modalidades, los dNTP pueden modificarse mediante la unión de un grupo marcado, por ejemplo, una molécula fluorescente. Como se usa en la presente, el término "etiqueta" se refiere a un resto químico unido a una molécula, tal como una molécula de ácido nucleico. Las etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas enzimáticas, etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio o perlas de plástico coloreadas y etiquetas radiactivas. En combinación, estos tres reactivos promueven la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) de un ADN dado, multiplicado por iniciadores sintéticos aleatorios o por la primasa/polimerasa y extendido por el ADN polimerasa. Además, la combinación de cebadores sintéticos aleatorios y/o primasa/polimerasa y ADN polimerasa puede afectar la amplificación por desplazamiento de hebra múltiple a través del cebado de moléculas amplificadas con la primasa/polimerasa y/o cebadores oligonucleotídicos aleatorios y la extensión del cebador por el ADN polimerasa.

40 1. ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra

Los métodos de amplificación como MDA pueden emplear un ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra, por ejemplo, una polimerasa con fuerte unión al ADN de una sola hebra, por ejemplo, en preferencia al ADN de doble hebra. La actividad de desplazamiento de hebra puede ser útil para desplazar hebras hibridadas de una molécula de ADN mientras se extiende una posición de cebador.

45 Los ADN polimerasas con actividad de desplazamiento de hebra útiles en los métodos descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa Phi29. La ADNpol Phi29 se puede obtener comercialmente de, por ejemplo, New England Biolabs (Ipswich, MA, Estados Unidos), ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos y Expedeon (Cambridge, Reino Unido). El ADNpol Phi29 tiene tanto una alta procesividad intrínseca como una capacidad de desplazamiento de hebra acoplada a la polimerización del ADN, siendo capaz de generar fragmentos de ADN no mayores de 70 kb a partir de un solo evento de unión enzima: ADN (Blanco y otros, 1989). Un potencial de este tipo posibilita que la ADNpol Phi29 replique plantillas de ADN que contienen estructuras secundarias tales como lazos en horquilla. La enzima también tiene actividad de corrección de lectura a exonucleasa 3'5' (Blanco and Salas, 1985; Garmendia y otros, 1992) y proporciona una fidelidad hasta 1000 mayor en comparación con los métodos basados en el ADN polimerasa Taq.

60 2. Desoxirribonucleósidos trifosfatos

La creación de cebadores y la extensión del cebador pueden lograrse mediante la combinación de una primasa/polimerasa de ADN especializada como TthPrimPol, capaz de sintetizar cebadores de ADN (Picher y otros, 2016), y un ADN polimerasa de elongación, como ADNpol Phi29, solo proporcionando desoxirribonucleótidos sustratos, por ejemplo, dNTP. Típicamente, estas incluyen las cuatro bases estándar, A, T, G y C. Sin embargo, en ciertas modalidades pueden incluirse nucleótidos no naturales, tales como la inosina. En determinadas modalidades, los nucleótidos pueden portar una etiqueta para la detección o captura de polinucleótidos en los que se incorporan.

D. Secuenciación de ADN

Hasta la fecha, existen varias técnicas de secuenciación diferentes, que comúnmente se clasifican como "secuenciación de primera generación", "secuenciación de segunda generación" (a menudo denominada "secuenciación de nueva generación" o NGS) y "secuenciación de tercera generación", también conocida como secuenciación de molécula única (SMS). La secuenciación de primera generación se refiere principalmente a los métodos de Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1977) o Sanger (Sanger y otros, 1977; Sanger y Coulson, 1978), de los cuales solo el último se usa hoy en día.

En segundo lugar, la secuenciación de segunda o de próxima generación se refiere a técnicas que producen muchas secuencias al mismo tiempo mediante el uso de métodos de detección técnicos (ópticos) avanzados de posiciones de bases. Una descripción general de los métodos existentes se da en (Metzker, 2010).

Las técnicas de secuenciación de tercera generación o de molécula única (SMS) no requieren amplificación previa, y las plantillas no son clones o conjuntos de ADN, sino moléculas individuales cuya secuencia a menudo se copia/lee y se registra en línea en "tiempo real", como resultado de la actividad de una polimerasa (Sam y otros, 2011; Thompson y Milos, 2011).

Como se usa en la presente, el término "secuenciación de alto rendimiento" se refiere a la secuenciación simultánea o casi simultánea de miles de moléculas de ácido nucleico. Las plataformas de secuenciación de alto rendimiento incluyen, entre otras, la secuenciación de firma paralela masiva (MPSS), la secuenciación de Polony, la pirosecuenciación 454, la secuenciación de Illumina (Solexa), la secuenciación SOLiD, la secuenciación semiconductora Ion Torrent, la secuenciación de nanobolas de ADN (Complete Genomics/BGI Shenzhen), la secuenciación de moléculas individuales Heliscope, la secuenciación en tiempo real de moléculas individuales (SMRT) (PacBio) y la secuenciación de ADN de nanoporos (por ejemplo, Oxford Nanopore).

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse, sin limitación, para la secuenciación del genoma completo, la secuenciación del exoma y la secuenciación de amplicones. Sin embargo, las moléculas amplificadas a sí mismas pueden estar sujetas a la amplificación de amplicones específicos. El uso de secuencias de captura mediante el uso de cebos dirigidos a secuencias génicas en el genoma puede usarse para aislar moléculas amplificadas que representan el exoma. Al transcribir inversamente el ARNm en ADNc de doble hebra, puede producirse un transcriptoma amplificado para la secuenciación.

V. Kits

También se proporcionan en la presente descripción kits para su uso en la realización de los métodos descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente, el término "kit" se refiere a una colección de artículos destinados a usarse juntos.

Ciertos kits descritos en la presente descripción incluyen 2, 3, 4, 5, 6, 7, elementos seleccionados de: (1) una enzima PrimPol (por ejemplo, TthPrimPol); (2) un ADN polimerasa (por ejemplo, ADNpol Phi29); (3) trímeros aleatorios; (4) tetrámeros aleatorios; (5) pentámeros aleatorios; (6) heptámeros aleatorios; (7) octámeros aleatorios; (8) cebadores aleatorios; (9) dNTP; (10) tampón de reacción; (11) un tampón para usar con cualquiera de los elementos mencionados anteriormente. Los kits pueden incluir contenedores para contener reactivos. Los contenedores, a su vez, pueden colocarse en un contenedor de envío. El contenedor puede transmitirse mediante entrega en mano o mediante un transportista común, tal como un sistema postal nacional o un servicio de entrega tal como FedEx. Los kits también pueden contener un contenedor para enviar la sangre recolectada a una instalación central, tal como una caja o una bolsa. Los kits también pueden incluir típicamente instrucciones de uso, así como también software para el análisis e interpretación de datos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cribado para detectar qué mutantes son capaces de usar cebadores sintéticos aleatorios más cortos que la ADNpol Phi29 WT en reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple

En la Figura 3 se muestra la amplificación de 1 ng de ADN genómico humano mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) que combina variantes de ADNpol Phi29 y TthPrimPol o cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N).

Como se observa en la Figura 3, la ADNpol Phi29 WT usó eficientemente pentámeros, hexámeros, heptámeros y octámeros, así como también TthPrimPol, para amplificar el ADN genómico humano. Los trímeros y tetrámeros no fueron adecuados para llevar a cabo la amplificación.

Del grupo de variantes de ADNpol Phi29 generadas, seis de ellas (K538R, T534K, T534R, L63LH, K64KG y K64KK) fueron completamente inactivas en MDA independientemente del tamaño del cebador o del uso alternativo de TthPrimPol. Otro conjunto de mutantes (K529R, M97R, R96K, L63LG y T499K) reveló un peor rendimiento de amplificación que Phi29 WT

5 ADNpol, que muestra menores rendimientos de amplificación y/o limitaciones para usar ciertos tamaños de cebadores. Por ejemplo, el mutante M97R fue capaz de usar pentámeros y hexámeros eficientemente, mientras que los heptámeros y octámeros no desencadenaron la amplificación. De manera similar, el mutante R96K solo fue capaz de usar hexámeros del conjunto de cebadores sintéticos aleatorios. Notablemente, el mutante de inserción L63LG fue capaz de amplificar el ADN con pentámeros, hexámeros, heptámeros y octámeros, pero la combinación con TthPrimPol no produjo ningún material amplificado. Por el contrario, el mutante T499K solo pudo amplificar ligeramente el ADN en presencia de TthPrimPol, mientras que ninguno de los cebadores sintéticos aleatorios promovió la MDA.

15 El mutante T499R mostró un comportamiento aproximadamente similar a ADNpol Phi29 WT.

Finalmente, los mutantes K64R y M97K mostraron mejoras significativas con respecto a ADNpol Phi29 WT. Ambos fueron los únicos capaces de usar tetrámeros, mientras que el ADNpol Phi29 WT y el resto de los mutantes no mostraron ningún rendimiento de amplificación.

20 Las dos mutaciones de "ganancia de función" se introdujeron en el mismo polipéptido para generar el mutante doble K64R/M97K, que se caracterizó profundamente en comparación con ADNpol Phi29 WT y los mutantes individuales K64R y M97K, como se muestra en los siguientes ejemplos.

25 Ejemplo 2: La actividad polimerasa se favorece frente a la actividad exonucleasa en el mutante de ADNpol Phi29 M97K y el mutante doble K64R/M97K

30 En la Figura 4 se muestra el análisis del equilibrio dinámico entre las actividades de exonucleasa 3-5' y polimerización 5-3' de los mutantes de la invención más relevantes con respecto a la ADNpol Phi29 WT (K64R, M97K y mutante doble K64R/M97K). Se usó un dúplex de ADN formado por un cebador etiquetado en 5' (5' GATCACAGTGAGTAC, SEQ ID NO: 5) hibridado con una plantilla (5' AGAAGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC, SEQ ID NO: 6) para analizar el acoplamiento entre la síntesis de ADN y la degradación del ADN en función de la concentración de dNTP (0, 10, 25, 50 100 y 500 nM). En ausencia de dNTP, se observa la degradación exonucleolítica del extremo terminal del cebador. El patrón de degradación refleja el nivel de actividad exonucleasa de las variantes de la invención con respecto a la ADNpol Phi29 WT. A medida que aumenta la concentración de dNTP, la actividad exonucleasa se supera progresivamente por la polimerización 5'-3' y la incorporación neta de dNMP puede observarse como un aumento en el tamaño del cebador marcado, lo que define la concentración de dNTP necesarios para obtener una elongación eficiente del cebador para cada mutante. Como se observa en la Figura 4, el mutante K64R mostró un equilibrio Pol/Exo aproximadamente similar al que se muestra por la enzima WT, que alcanzó la posición 28-mer a 25 nM de dNTP. Por otro lado, el mutante M97K y el mutante doble K64R/M97K alcanzó la misma posición (28-mer) con la concentración de dNTP más baja probada (10 nM), lo que indica que la actividad de la polimerasa de estos mutantes se favorece frente a la exonucleasa.

45 Ejemplo 3: Los mutantes de la invención (K64R, M97K y K64R/M97K) son capaces de usar cebadores sintéticos aleatorios más cortos que la ADNpol Phi29 WT en reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple

50 En la Figura 5 se muestra la amplificación de 1 ng de ADN genómico humano mediante amplificación por desplazamiento múltiple que combina variantes seleccionadas de ADNpol Phi29 (K64R, M97K y mutante doble K64R/M97K) y cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N). Los rendimientos de amplificación mostrados son la media de dos experimentos independientes que incluyeron 3 réplicas por cada condición. Se representa la desviación estándar de los dos experimentos.

55 Como se observa en la Figura 5, ninguna de las enzimas probadas fue capaz de amplificar eficientemente el ADN genómico mediante el uso de trímeros sintéticos aleatorios. Solo el mutante doble K64R/M97K mostró un rendimiento cercano a 1 pg.

60 Las tres variantes de la invención fueron capaces de usar tetrámeros para activar la amplificación, mientras que no se observó amplificación con la ADNpol Phi29 WT. La variante K64R mostró el rendimiento de amplificación más bajo (2,7 pg), el mutante M97K exhibió un rendimiento ligeramente mayor (3,8 pg) y el mutante doble K64R/M97K mostró un rendimiento mucho mayor (12,9 pg). El rendimiento más alto observado en el mutante doble indica efectos sinérgicos de ambas mutaciones en el mismo polipéptido.

65 La ADNpol Phi29 WT y las tres variantes de la invención fueron capaces de usar pentámeros aleatorios de manera eficiente para iniciar la amplificación. De nuevo, el mutante doble K64R/M97K produjo el rendimiento

más alto, más de 20 pg de ADN amplificado, superando claramente el rendimiento de variantes únicas y la enzima WT.

5 En el caso de hexámeros aleatorios, se observa un patrón comparativo similar, aunque los rendimientos de amplificación son mayores en todos los casos.

10 Mediante el uso de heptámeros aleatorios, la ADNpol Phi29 WT mantuvo el mismo rendimiento con respecto a los resultados obtenidos mediante el uso de hexámeros, mientras que las tres variantes de la invención tendieron a disminuir la eficiencia de amplificación, lo que produjo niveles de ADN similares a los obtenidos con pentámeros aleatorios.

15 En el caso de los octámeros, tanto los mutantes simples K64R como M97K mostraron rendimientos de amplificación inferiores a los de la ADNpol Phi29 WT. Por otro lado, el mutante doble K64R/M97K superó claramente a la ADNpol Phi29 WT, como ocurrió en todas las condiciones probadas, lo que confirma los valores de amplificación robustos y eficientes independientemente de la longitud del cebador sintético aleatorio usado para iniciar la amplificación.

20 Ejemplo 4: Efecto de la fuerza iónica en la amplificación de fondo observada en ausencia de ADN inicial en controles sin plantilla (NTC).

25 En la Figura 6 se muestran los rendimientos de amplificación observados en ausencia de ADN inicial cuando se combinan ADNpol Phi29 WT o las variantes de la invención seleccionadas (K64R, M97K y K64R/M97K) y cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N).

30 Bajo las condiciones de fuerza iónica baja probadas (KCl 20 mM; NaCl 57 mM), tanto el mutante único M97K como el K64R/El mutante doble M97K mostró rendimientos de amplificación significativos en ausencia de ADN inicial cuando se usan pentámeros y hexámeros, pero también tetrámeros en el caso del mutante doble (ver Figura 6). Sin embargo, los rendimientos de amplificación son significativamente menores que los obtenidos cuando se usa ADN (1 ng) como entrada en las mismas condiciones (ver Figura 5), lo que apunta a un mecanismo de amplificación diferente involucrado. Se conoce bien en el campo la capacidad de amplificación de dímeros de cebadores de ADNpol Phi29 en ausencia de ADN inicial (Alsmadi y otros, 2009), y la estabilidad de los dímeros de cebadores puede mejorarse en el mutante único M97K y K64R/ Mutante doble M97K bajo las condiciones probadas.

35 En la Figura 7 se muestran los rendimientos de amplificación observados en ausencia de ADN inicial pero que aumentan las condiciones de fuerza iónica mediante la adición de sulfato de amonio [(NH⁺SCU)]. En presencia de sulfato de amonio (45 mM), los niveles de amplificación observados en ausencia de ADN inicial se eliminan completamente en todas las variantes y todos los tamaños de cebadores.

40 Ejemplo 5: Las condiciones de alta fuerza iónica refuerzan la robustez y la eficiencia del mutante doble K64R/M97K para la amplificación de ADN mediante el uso de cebadores aleatorios de diferentes longitudes.

45 En la Figura 8 se muestra la amplificación de 1 ng de ADN genómico humano mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) que combina ADNpol Phi29 WT o las variantes de la invención seleccionadas (K64R, M97K y K64R/M97K) y cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: trímeros (3N), tetrámeros (4N), pentámeros (5N), hexámeros (6N), heptámeros (7N) u octámeros (8N), en condiciones de alta fuerza iónica (KCl 20 mM; NaCl 57 mM; (NH⁺SCU) 45 mM). Los rendimientos de amplificación mostrados son la media de dos experimentos independientes que incluyeron 3 réplicas por cada condición. Se representa la desviación estándar de los dos experimentos.

50 Como se observa en la Figura 8, ninguna de las enzimas probadas fue capaz de amplificar eficientemente el ADN genómico mediante el uso de trímeros sintéticos aleatorios. Solo el mutante doble K64R/M97K mostró un rendimiento cercano a 600 ng.

55 A diferencia de lo que se observó en condiciones anteriores (ver Figura 5), los tetrámeros se usaron eficientemente solo por el mutante simple M97K y el mutante doble K64R/M97K, mientras que el mutante simple K64R produjo solo un rendimiento menor cercano a 1 pg. Notablemente, los rendimientos de amplificación observados para el mutante único M97K y K64R/ El mutante doble M97K aumentó en comparación con los obtenidos en ausencia de sulfato de amonio (de 4 a 12, y de 13 a 16 pg respectivamente).

60 En el caso de pentámeros y hexámeros, mutante único M97K y K64R/El mutante doble M97K mostró resultados similares, superando claramente los rendimientos de amplificación obtenidos con la enzima WT o la variante K64R. Como se mostró en ausencia de sulfato de amonio, la ADNpol Phi29 WT mostró rendimientos más altos que la variante K64R.

65

- 5 En el caso de heptámeros, solo el mutante doble K64R/M97K mantuvo el rendimiento de amplificación obtenido con cebadores sintéticos aleatorios más cortos y/o en ausencia de sulfato de amonio. Tanto la ADNpol Phi29 WT como la variante K64R disminuyeron significativamente el rendimiento, al mostrar los mismos valores en estas condiciones. El rendimiento obtenido con el mutante M97K también se redujo en comparación con las condiciones anteriores.
- 10 Por último, los octámeros solo se desplegaron eficientemente mediante el doble mutante K64R/M97K, mientras que las otras tres enzimas mostraron rendimientos de amplificación muy bajos.
- 15 El mutante doble de ADNpol Phi29 K64R/M97K mantiene intacto el rendimiento de amplificación tanto en condiciones de baja como de alta fuerza iónica, probablemente como consecuencia de la ganancia de función adquirida por los contactos adicionales de la enzima con la base de nitrógeno del nucleótido 5 del cebador y el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos 4 y 5 (ver Figura 2). Estos contactos adicionales permiten que la enzima estabilice con destreza los cebadores de diferentes tamaños en diferentes condiciones de fuerza iónica.
- 20 Ejemplo 6: La mutación doble K64R/M97K da como resultado una amplificación muy sensible de cantidades mínimas de ADN independientemente del tamaño del cebador probado.
- 25 En la Figura 9 se muestra la amplificación de diferentes cantidades de ADN genómico humano (1, 10, 100 pg y 1 ng) mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) que combina ADNpol Phi29 WT o las variantes de la invención seleccionadas (K64R, M97K y K64R/M97K) y cebadores sintéticos aleatorios de diferentes tamaños: tetrámeros (4N), pentámeros (5N) o hexámeros (6N), en condiciones de baja (20 mM KCl; 57 mM NaCl) o alta (20 mM KCl; 57 mM NaCl; 45 mM (NH₄)₂SO₄) condiciones de fuerza iónica.
- 30 Bajo condiciones de baja fuerza iónica (Figura 9, paneles superiores), el mutante doble K64R/M97K produce los rendimientos de amplificación más consistentes y más altos en todas las condiciones probadas.
- 35 En el caso de tetrámeros sintéticos aleatorios, como se mostró anteriormente (ver Figura 5), la ADNpol Phi29 WT no pudo amplificar ninguna de las entradas de ADN probadas. La variante K64R produjo un rendimiento detectable solo con 1 ng de ADN inicial, lo que carece de sensibilidad para amplificar cantidades menores de ADN. Al contrario, tanto M97K como M97K/ Los mutantes K64R amplificaron eficientemente las entradas de ADN probadas, el doble mutante produjo mayores rendimientos en todos los casos.
- 40 En el caso de pentámeros sintéticos aleatorios, todas las enzimas fueron capaces de usarlos para iniciar la amplificación, pero mostraron diferentes niveles de sensibilidad y eficiencia. La ADNpol Phi29 WT mostró una disminución significativa en el rendimiento de amplificación cuando la cantidad de ADN inicial descendió, mientras que las tres variantes de la invención mantuvieron una eficiencia razonable en todas las condiciones probadas. Mutante doble M97K/ K64R mostró la mayor eficiencia de amplificación entre las tres variantes de la invención independientemente de la cantidad de ADN inicial, por lo que mostró la mejor sensibilidad.
- 45 En el caso de hexámeros sintéticos aleatorios, todas las enzimas fueron capaces de usarlos eficientemente para iniciar la amplificación de cada ADN inicial probada, lo que mostró rendimientos de amplificación notables en cada caso. Las tres variantes de la invención superaron a la ADNpol Phi29 WT, al mostrar mayores rendimientos de amplificación cuando se analizaron entradas de ADN bajas. Como ocurrió con los pentámeros, el mutante doble M97K/ K64R mostró la mayor eficiencia de amplificación entre las tres variantes de la invención independientemente de la cantidad de ADN inicial.
- 50 Como se mostró anteriormente (ver Figura 6), tanto M97K como M97K/ Las variantes K64R mostraron rendimientos de amplificación significativos en ausencia de ADN inicial (controles sin plantilla, NTC) cuando se usaron pentámeros y hexámeros. Por esta razón, se llevó a cabo el mismo análisis de sensibilidad en condiciones de alta fuerza iónica (KCl 20 mM; NaCl 57 mM; (NH⁺SCU) 45 mM para evitar este efecto artificial derivado de la amplificación de dímeros de cebadores.
- 55 Bajo condiciones de alta fuerza iónica (ver Figura 9, paneles inferiores), los tetrámeros sintéticos aleatorios mostraron un patrón de uso similar entre las variantes probadas en comparación con las condiciones de baja fuerza iónica, aunque los rendimientos de amplificación aumentaron en la mayoría de los casos. La excepción a esta regla fue la variante M97K que mostró rendimientos más bajos con entradas de ADN de 1 pg y 10 pg.
- 60 En el caso de pentámeros sintéticos aleatorios en condiciones de alta fuerza iónica, M97K y M97K/ Las variantes K64R mostraron el mejor rendimiento en términos de sensibilidad y eficiencia, al mostrar mayores rendimientos de amplificación en comparación con las condiciones de baja fuerza iónica con las mismas cantidades de ADN inicial. El aumento de la fuerza iónica de la reacción produjo una reducción en la eficiencia de amplificación de la variante K64R cuando se probaron cantidades limitadas de ADN (1 y 10 pg), mientras que la eficiencia fue similar (100 pg) o mayor (1 ng) con las otras dos entradas. Sorprendentemente, la ADNpol Phi29 WT superó a la variante K64R en estas condiciones en todos los casos.
- 65

En el caso de hexámeros sintéticos aleatorios en condiciones de alta fuerza iónica, el mutante doble K64R/M97K fue la única variante que aumentó los rendimientos observados con todas las entradas de ADN en comparación con los resultados obtenidos en condiciones de baja fuerza iónica. El mutante único M97K mostró rendimientos más bajos con las entradas más bajas (1 y 10 pg), mientras que aumentó los rendimientos con entradas de ADN de 100 pg y 1 ng, lo que indica una disminución en la sensibilidad. La variante K64R y ADNpol Phi29 WT mostraron un comportamiento similar. Como ocurrió con los pentámeros, la ADNpol Phi29 WT produjo mayores rendimientos de amplificación que la variante K64R en estas condiciones en todos los casos.

En resumen, el mutante doble K64R/M97K mostró el mejor rendimiento en términos de eficiencia de amplificación y sensibilidad en condiciones de fuerza iónica tanto baja como alta durante la reacción de amplificación con todos los cebadores de ADN probados.

Ejemplo 7: La eficiencia y la sensibilidad de la amplificación no se modifican mediante el uso de las variantes de la invención cuando los cebadores se generan mediante TthPrimPol

En la Figura 10 se muestra la amplificación de 1, 10, 100 pg y 1 ng de ADN genómico humano mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) que combina ADNpol Phi29 WT o las variantes de la invención seleccionadas (K64R, M97K y K64R/M97K) y TthPrimPol, una primasa de ADN capaz de sintetizar cebadores en el transcurso de la reacción para ADNpol Phi29 (Picher y otros, 2016).

Como se observa en la Figura 10, no hay diferencias de rendimiento significativas entre la ADNpol Phi29 WT y las variantes de la invención probadas, lo que da como resultado niveles de sensibilidad y eficiencia similares en esta configuración.

Ejemplo 8: Las variantes de la invención seleccionadas (K64R, M97K y K64R/M97K) mejoran la cobertura de amplificación medida por la tecnología CovCheck

La tecnología CovCheck permite el análisis de cobertura de amplificaciones de genoma completo mediante el uso de un panel de PCR que incluye 24 pares de cebadores diferentes que amplifican porciones pequeñas de cada cromosoma humano. La tecnología CovCheck se ha validado mediante la comparación de los valores de cobertura de CovCheck con la cobertura real obtenida a través de la secuenciación de genoma completo de paso bajo, que obtiene valores de correlación excelentes (<https://www.expedeon.com/products/genomics/dna-rna-products/covcheck-pcr-kits/>).

Para analizar la cobertura de amplificación obtenida con cada variante, se seleccionó una cantidad limitada de material de entrada: 30 pg de ADN genómico humano. Esta cantidad de ADN es equivalente a 5 genomas diploides humanos, y podría ser la cantidad más baja que garantice que haya disponibles copias suficientes de cada cromosoma para la amplificación. Debajo de este nivel, ciertas regiones o cromosomas completos podrían estar ausentes en la entrada para la amplificación debido a la distribución aleatoria de moléculas en una muestra de ADN purificada, lo que da como resultado regiones no cubiertas en el material amplificado debido a la ausencia de la plantilla, y no debido a fallas de amplificación.

En la Figura 11 se muestran los valores de cobertura estimados obtenidos del análisis CovCheck de reacciones de amplificación mediante el uso de hexámeros, pentámeros y tetrámeros, en combinación con ADNpol Phi29 WT o las variantes de la invención seleccionadas y 30 pg de ADN inicial genómico humano. Los valores de cobertura son medias de 6 reacciones independientes por condición.

En el caso de hexámeros sintéticos aleatorios, la cobertura de amplificación mejora cuando se usan las tres variantes de la invención en comparación con el valor obtenido por la ADNpol Phi29 WT.

En el caso de pentámeros sintéticos aleatorios, todas las enzimas mostraron valores de cobertura superiores al 90 % en estas condiciones. Por lo tanto, no se pudieron observar diferencias significativas. Sin embargo, la variante M97K destacó con una cobertura perfecta en las 6 réplicas probadas.

En el caso de tetrámeros sintéticos aleatorios, solo las variantes M97K y M97K/K64R produjeron ADN amplificado, lo que es consistente con la sensibilidad de la amplificación mostrada por el ADNpol de WT Phi29 y la variante K64R cuando se combinan con tetrámeros (Figura 9). El análisis de CovCheck reveló una excelente cobertura de amplificación en ambos casos (99 %), lo que apunta al beneficio de usar las variantes de la invención en combinación con los cebadores más cortos posibles, para maximizar la cobertura y uniformidad de la amplificación, lo que evita sesgos de amplificación y pérdida de secuencias.

En el caso de usar una enzima (TthPrimPol), se preparan cebadores de ADN para ADNpol Phi29, la Figura 12 muestra los valores de cobertura estimados obtenidos a partir del análisis CovCheck de las reacciones de amplificación realizadas por la combinación de TthPrimPol con ADNpol Phi29 WT o las variantes de la invención, mediante el uso de 30 pg (5 equivalentes genómicos) de ADN genómico humano como entrada en la reacción de amplificación. Los valores de cobertura son medias de 12 reacciones independientes por

condición. El análisis de CovCheck también reveló una mejora en la cobertura de amplificación cuando se usan las variantes de la invención, lo que respalda la ventaja de estas para mejorar la uniformidad del material amplificado con respecto al ADN inicial original.

5 Referencias

- Blanco L, Salas M. Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984 Sep;81(17):5325-9.
- 10 Blanco L, Salas M. Characterization of a 3'-5' exonuclease activity in the phage phi 29-encoded DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 25 de febrero de 1985; 13(4): 1239-49.
- Bernad A, Zaballos A, Salas M, Blanco L. Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J*. 1987 Dec 20;6(13):4219- 25.
- 15 Rodríguez I, Lazaro JM, Blanco L, Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Steitz TA, Salas M, de Vega M. A specific subdomain in phi29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005 May 3;102(18):6407-12.
- 20 Kamtekar, S. Berman, AJ, Wang, J, Lazaro, JM, de Vega, M, Blanco L, Salas M y Steitz TA. The phi29 DNA polymerase: protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition *EMBO J*. 2006 Mar 22;25(6): 1335-43. Epub 2006 Mar 2.
- Berman AJ, Kamtekar S, Goodman JL, Lazaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M, y Steitz TA. Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J*. 2007 Jul 25;26(14):3494- 505.
- 25 Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, Martin G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*. 1989 May 25;264(15):8935-40.
- 30 Esteban JA, Salas M, Blanco L. Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem*. 1993 Feb 5;268(4):2719-26.
- Esteban JA, Soengas MS, Salas M, Blanco L. 3'—>5' exonuclease active site of phi 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. *J Biol Chem*. 1994 Dec 16;269(50):31946-54.
- 35 Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Apr 16;99(8):5261-6.
- 40 Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):225-32.
- Picher AJ, Budeus B, Wafzig O, Kruger C, García-Gómez S, Martínez-Jiménez MI, Díaz-Talavera A, Weber D, Blanco L & Schneider A. TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol. *Nat Comm* 2016, Nov 29; 7:13296.
- 45 Alsmadi O, Alkayal F, Monies D, Meyer BF. Specific and complete human genome amplification with improved yield achieved by phi29 DNA polymerase and a novel primer at elevated temperature. *BMC Res Notes*. 2009 Mar 24; 2:48. doi: 10.1186/1756- 0500-2-48.
- 50 Povilaitis T, Alzbutas G, Sukackaite R, Siurkus J, Skirgaila R. In vitro evolution of phi29 DNA polymerase using isothermal compartmentalized self-replication technique. *Protein Eng Des Sei*. 2016 Dec;29(12):617-628. Epub 2016 Sep 26.
- 55 US5656493A, "System for automated performance of the polymerase chain reaction", 18 de febrero de 1994.
- Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U SA*. 1977 Feb;74(2):560-4.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- 60 Sanger F, Coulson AR. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett*. 1978 Mar 1;87(1):107-10.
- 65 Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46.

Sam LT, Lipson D, Raz T, Cao X, Thompson J, Milos PM, Robinson D, Chinnaiyan AM, Kumar-Sinha C, Maher CA. A comparison of single molecule and amplification based sequencing of cancer transcriptomes. *PLoS One*. 2011 Mar 1;6(3): e17305.

5 Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol*. 2011;12(2):217.

WO 2011/047307A1, "Multiple Displacement Amplification", 21 de abril de 2011.

10 Garmendia C, Bernad A, Esteban JA, Blanco L, Salas M. The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J Biol Chem*. 1992 Feb 5;267(4):2594-9.

Como se usa en la presente, las siguientes definiciones se aplican a menos que se especifique de cualquier otra manera. La palabra "puede" se usa en un sentido permisivo (es decir, que significa que tiene el potencial de), en lugar del sentido obligatorio (es decir, que significa que debe). Las palabras "incluye", "que incluye" y "incluye" y similares significan que incluyen, pero no se limitan a. Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un elemento" incluye una combinación de dos o más elementos, a pesar del uso de otros términos y frases para uno o más elementos, tales como "uno o más". El término "o" es, a menos que se indique de cualquier otra manera, no exclusivo, es decir, que abarca tanto "y" como "o". El término "cualquiera de" entre un modificador y una secuencia significa que el modificador modifica cada miembro de la secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, la frase "al menos cualquiera de 1, 2 o 3" significa "al menos 1, al menos 2 o al menos 3". En determinadas modalidades, las invenciones que "comprenden" elementos variados también pueden "consistir esencialmente en" estos elementos. El término "que consiste esencialmente en" se refiere a la inclusión de elementos enumerados y otros elementos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de una combinación reivindicada.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 3 015 001 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

Los aminoácidos en cursiva no se expresan en algunas modalidades

5	SEQ ID NO 1: ADN polimerasa Phi29 de tipo silvestre (UniProtKB - P03680)														
	<i>Met</i>	<i>Lys</i>	<i>His</i>	<i>Met</i>	Pro	Arg	Lys	<i>Met</i>	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr
	1				5					10					15
10	Thr	Thr	Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Arg	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Met
					20					25					30
15	Asn	Ile	Glu	Asp	His	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp
					35					40					45
20	Glu	Phe	Met	Ala	Trp	Val	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe
					50					55					60
25	His	Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	Ala	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Glu
					65					70					75
30	Arg	Asn	Gly	Phe	Lys	Trp	Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Thr	Tyr
					80					85					90
35	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Arg	Met	Gly	Gln	Trp	Tyr	Met	Ile	Asp	Ile
					95					100					105
40	Cys	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr
					110					115					120
45	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro	Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys
					125					130					135
50	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Ile	Asp	Tyr	His	Lys
					140					145					150
55	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu	Glu	Tyr	Ala	Tyr
					155					160					165
60	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	Gln
					170					175					180
65	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	Ser	Leu
					185					190					195
70	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	Val
					200					205					210
75	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala
					215					220					225
80	Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys
					230					235					240
85	Glu	Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro

ES 3 015 001 T3

				245					250					255	
5	Ala	Gln	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val
				260						265				270	
	Phe	Glu	Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile
10				275						280				285	
	Gln	His	Ile	Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro
				290						295				300	
15	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr
				305						310				315	
	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn
20				320						325				330	
	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val
				335						340				345	
25	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe
				350						355				360	
	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu
30				365						370				375	
	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr
				380						385				390	
35	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly	Lys	Val	Pro	Tyr
				395						400				405	
	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu	Glu
40				410						415				420	
	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Ala
				425						430				435	
45	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr	Asp
				440						445				450	
	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr
50				455						460				465	
	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu
55				470						475				480	
	Gly	Tyr	Trp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu
				485						490				495	
60	Arg	Gln	Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp
				500						505				510	
	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys
65				515						520				525	

ES 3 015 001 T3

Phe Ser Val Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu
 530 535 540
 5
 Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys
 545 550 555
 10
 Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp
 560 565 570
 Thr Phe Thr Ile Lys
 575
 15

SEQ ID NO 2: Mutante de ADNpol Phi29 K64R

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

ES 3 015 001 T3

				200						205				210	
5	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala
				215						220					225
	Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys
10				230						235					240
	Glu	Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro
				245						250					255
15	Ala	Gln	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val
				260						265					270
	Phe	Glu	Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile
20				275						280					285
	Gln	His	Ile	Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro
				290						295					300
25	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr
				305						310					315
	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn
30				320						325					330
	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val
35				335						340					345
	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe
				350						355					360
40	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu
				365						370					375
	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr
45				380						385					390
	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly	Lys	Val	Pro	Tyr
				395						400					405
50	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu	Glu
				410						415					420
	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Ala
55				425						430					435
	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr	Asp
				440						445					450
60	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr
				455						460					465
65	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu
				470						475					480

ES 3 015 001 T3

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu
 485 490 495

5 Arg Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp
 500 505 510

10 Gly Lys Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys
 515 520 525

15 Phe Ser Val Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu
 530 535 540

20 Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys
 545 550 555

25 Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp
 560 565 570

Thr Phe Thr Ile Lys
 575

SEQ ID NO 3: Mutante de ADNpol Phi29 M97K

30 *Met Lys His* Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr
 1 5 10 15

35 Thr Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met
 20 25 30

40 Asn Ile Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp
 35 40 45

45 Glu Phe Met Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe
 50 55 60

50 His Asn Leu Lys Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu
 65 70 75

55 Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr
 80 85 90

60 Asn Thr Ile Ile Ser Arg Lys Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile
 95 100 105

65 Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr
 110 115 120

70 Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys
 125 130 135

75 Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp Ile Asp Tyr His Lys
 140 145 150

80 Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu Glu Tyr Ala Tyr

ES 3 015 001 T3

				155					160					165	
5	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	Gln
				170						175				180	
	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	Ser	Leu
10				185						190				195	
	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	Val
				200						205				210	
15	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala
				215						220				225	
	Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys
20				230						235				240	
	Glu	Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro
				245						250				255	
25	Ala	Gln	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val
				260						265				270	
	Phe	Glu	Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile
30				275						280				285	
	Gln	His	Ile	Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro
				290						295				300	
35	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr
				305						310				315	
	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn
40				320						325				330	
	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val
45				335						340				345	
	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe
				350						355				360	
50	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu
				365						370				375	
	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr
55				380						385				390	
	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly	Lys	Val	Pro	Tyr
				395						400				405	
60	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu	Glu
				410						415				420	
	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Ala
65				425						430				435	

ES 3 015 001 T3

Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr Asp
 440 445 450

5 Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
 455 460 465

10 Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu
 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu
 485 490 495

15 Arg Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp
 500 505 510

20 Gly Lys Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys
 515 520 525

Phe Ser Val Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu
 530 535 540

25 Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys
 545 550 555

30 Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp
 560 565 570

35 Thr Phe Thr Ile Lys
 575

SEQ ID NO 4: Mutante doble ADNpol Phi29 K64R/M97K

40 *Met Lys His* Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr
 1 5 10 15

45 Thr Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met
 20 25 30

Asn Ile Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp
 35 40 45

50 Glu Phe Met Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe
 50 55 60

55 His Asn Leu Arg Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu
 65 70 75

60 Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr
 80 85 90

Asn Thr Ile Ile Ser Arg Lys Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile
 95 100 105

65

ES 3 015 001 T3

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

ES 3 015 001 T3

	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly	Lys	Val	Pro	Tyr
					395					400					405
5	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu	Glu
					410					415					420
	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Ala
10					425					430					435
	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr	Asp
					440					445					450
15	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr
					455					460					465
	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu
20					470					475					480
	Gly	Tyr	Trp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu
					485					490					495
25	Arg	Gln	Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp
					500					505					510
	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys
30					515					520					525
	Phe	Ser	Val	Lys	Cys	Ala	Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu
					530					535					540
35	Val	Thr	Phe	Glu	Asn	Phe	Lys	Val	Gly	Phe	Ser	Arg	Lys	Met	Lys
					545					550					555
	Pro	Lys	Pro	Val	Gln	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Asp	Asp
40					560					565					570
	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys										
					575										
45															
50															
55															
60															
65															

REIVINDICACIONES

1. Una ADN polimerasa de tipo Phi29, en donde la ADN polimerasa de tipo Phi29 tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99,5 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, en donde la ADN polimerasa de tipo Phi29 comprende la sustitución de aminoácido K64R y opcionalmente M97K, y en donde la ADN polimerasa de tipo Phi29: (a) tiene una afinidad mejorada por cebadores cortos en comparación con una polimerasa Phi29 de tipo silvestre con SEQ ID NO:1; o (b) es una polimerasa Phi29 con un reconocimiento de cebadores mejorado en comparación con una polimerasa Phi29 de tipo silvestre con SEQ ID NO:1.
2. El ADN polimerasa de tipo Phi29 de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o que tiene no más de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos además de la sustitución de aminoácido K64R y opcionalmente M97K.
3. El ADN polimerasa de tipo Phi29 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ADN polimerasa de tipo Phi29 tiene una afinidad mejorada por cebadores cortos en el límite entre 4 y 6 nucleótidos en comparación con una polimerasa Phi29 de tipo silvestre con SEQ ID NO:1.
4. Uso de un ADN polimerasa de tipo Phi29, en donde el ADN polimerasa de tipo Phi29 es un ADN polimerasa de tipo Phi29 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para mejorar la afinidad por cebadores cortos, idealmente en el límite entre 4 y 6 nucleótidos, en comparación con una polimerasa Phi29 de tipo silvestre con SEQ ID NO:1, preferentemente en una amplificación por desplazamiento múltiple basada en cebadores sintéticos aleatorios o amplificación de ADN TruePrime.
5. Un método para replicar, amplificar o secuenciar un ADN plantilla que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende al menos:
 - a) el ADN polimerasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
 - b) un tampón,
 - c) cloruro de magnesio,
 - d) un cebador, y
 - e) nucleósidos trifosfatos.
6. Un kit para llevar a cabo un método de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende: a) el ADN polimerasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, b) un tampón, y c) cloruro de magnesio, o que comprende el ADN polimerasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y uno o más de:
 - (a) una enzima PrimPol (por ejemplo, TthPrimPol);
 - (b) trímeros aleatorios;
 - (c) tetrámeros aleatorios;
 - (d) pentámeros aleatorios;
 - (e) heptámeros aleatorios;
 - (f) octámeros aleatorios;
 - (g) dNTP;
 - (h) tampón de reacción;
 - (i) un tampón para el uso con cualquiera de los elementos mencionados anteriormente.
7. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ADN polimerasa de tipo Phi29 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia reguladora de la transcripción unida operativamente con un ADN polimerasa de tipo Phi29 de acuerdo con la reivindicación 7.
9. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la secuencia reguladora de la transcripción comprende un promotor bacteriano o de mamífero, o en donde el ácido nucleico recombinante está contenido en un vector seleccionado de un vector plasmídico, un vector viral, un cósmido y un transposón, y preferentemente comprende un sitio de clonación posicionado con relación a la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa de tipo Phi29 de manera que una secuencia reguladora de la transcripción insertada en el sitio de clonación se una operativamente con la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa de tipo Phi29.
10. Una célula recombinante que comprende un ácido nucleico recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9.
11. Un método que comprende:

ES 3 015 001 T3

- a) poner en contacto una molécula plantilla de ácido nucleico con un ADN polimerasa de tipo Phi29 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y reactivos suficientes para la extensión del cebador; y
- b) realizar la extensión del cebador con la polimerasa usando la plantilla del ácido nucleico

5

12. El método de la reivindicación 11, en donde los reactivos suficientes para la extensión del cebador comprenden cebadores oligonucleotídicos.

10

13. El método de la reivindicación 12, en donde los cebadores oligonucleotídicos comprenden uno o más de trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros o 10-meros y en donde los cebadores son preferentemente cebadores aleatorios, o en donde los cebadores oligonucleotídicos tienen enlaces entre cinco y 25 nucleótidos.

15

14. El método de la reivindicación 11, en donde los reactivos suficientes para la extensión del cebador comprenden una primasa/polimerasa (por ejemplo, TthPrimPol), o en donde la extensión del cebador se realiza a una temperatura de aproximadamente, o superior a, cualquiera de 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, o 42 °C, o en donde la molécula de ácido nucleico plantilla está presente en una cantidad no mayor que 1 ng, 100 pg, 10 pg o 1 pg, o en donde la extensión del cebador comprende (i) amplificación por desplazamiento múltiple ("MDA") o (2) amplificación de círculo rodante, o en donde la extensión del cebador comprende ciclos de amplificación basados en múltiples hibridaciones y bucles (MALBAC)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

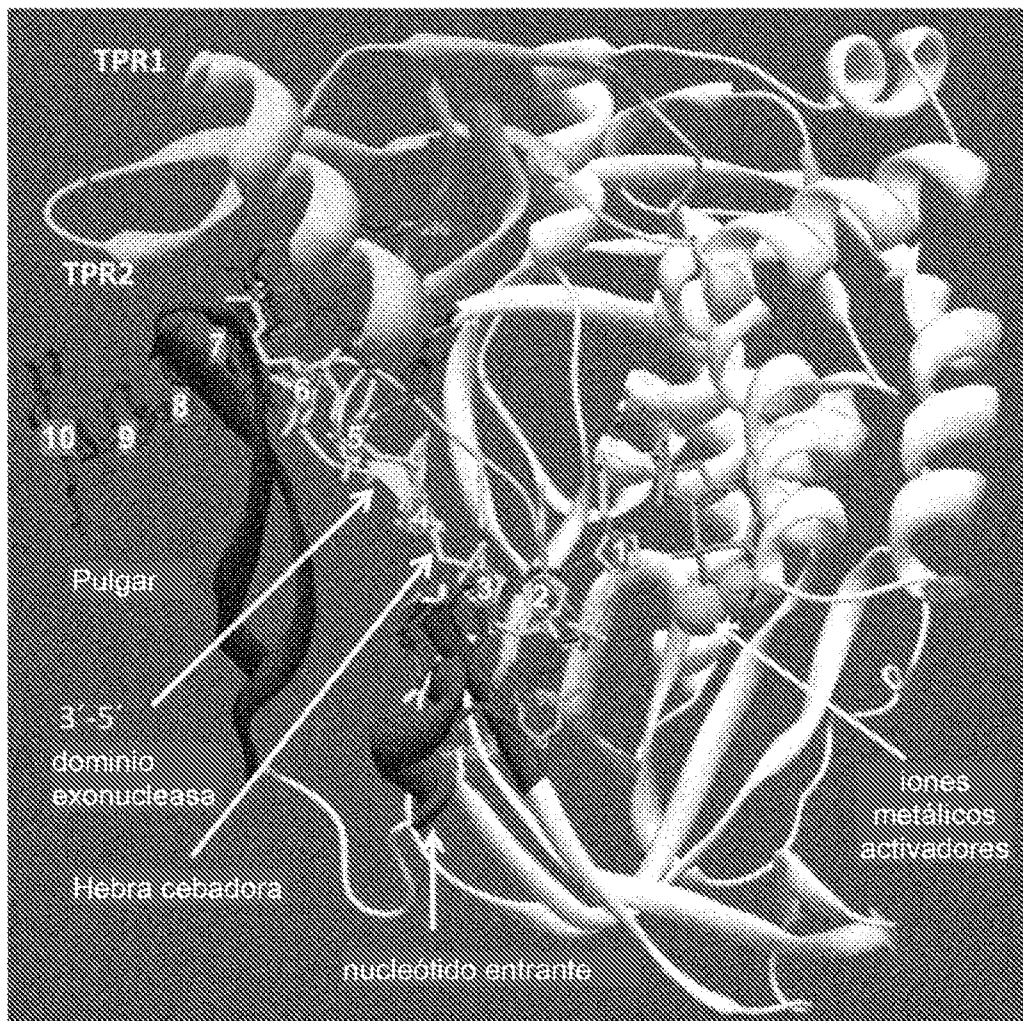


Figura 3

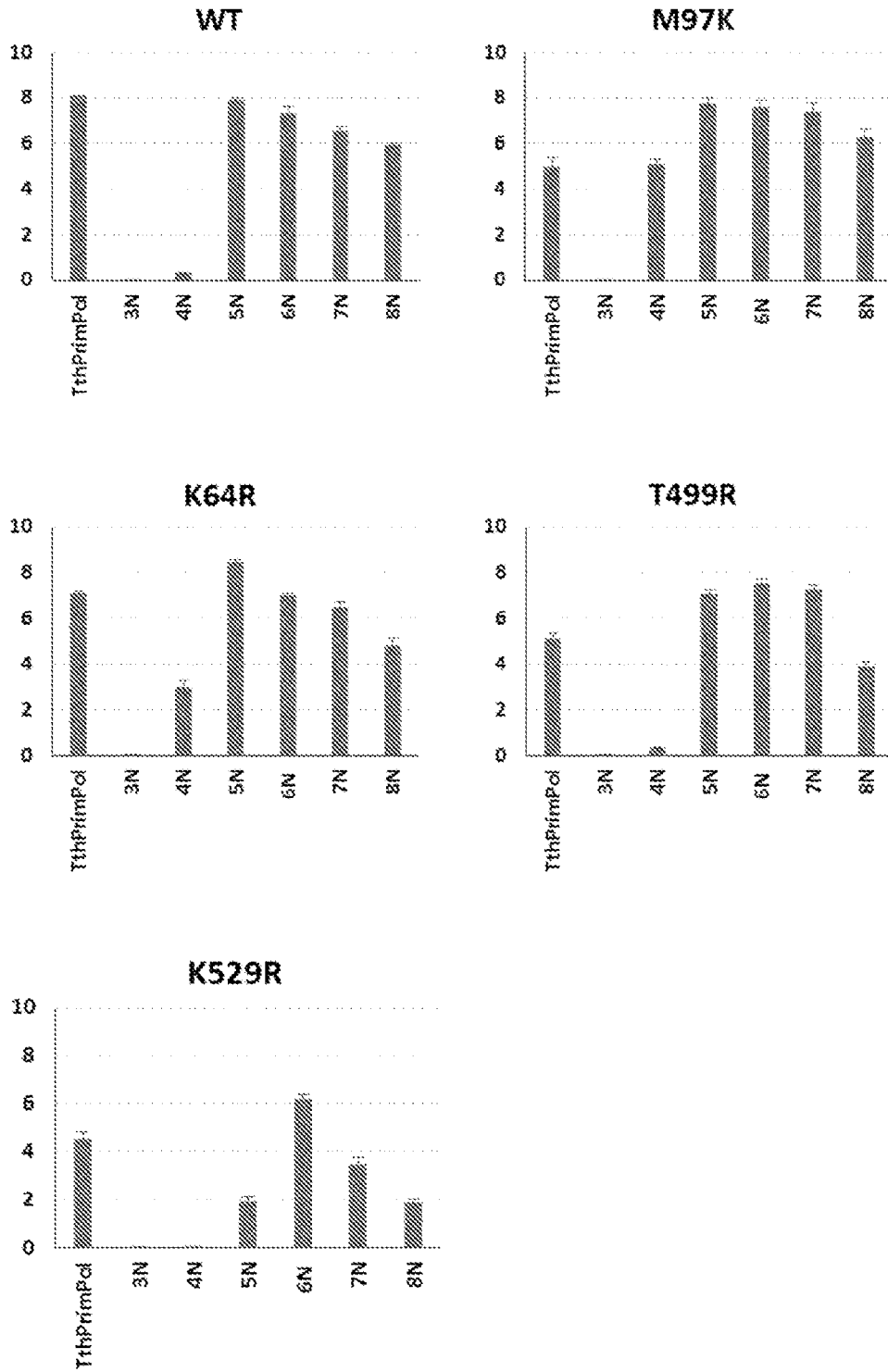


Figura 3 continuación

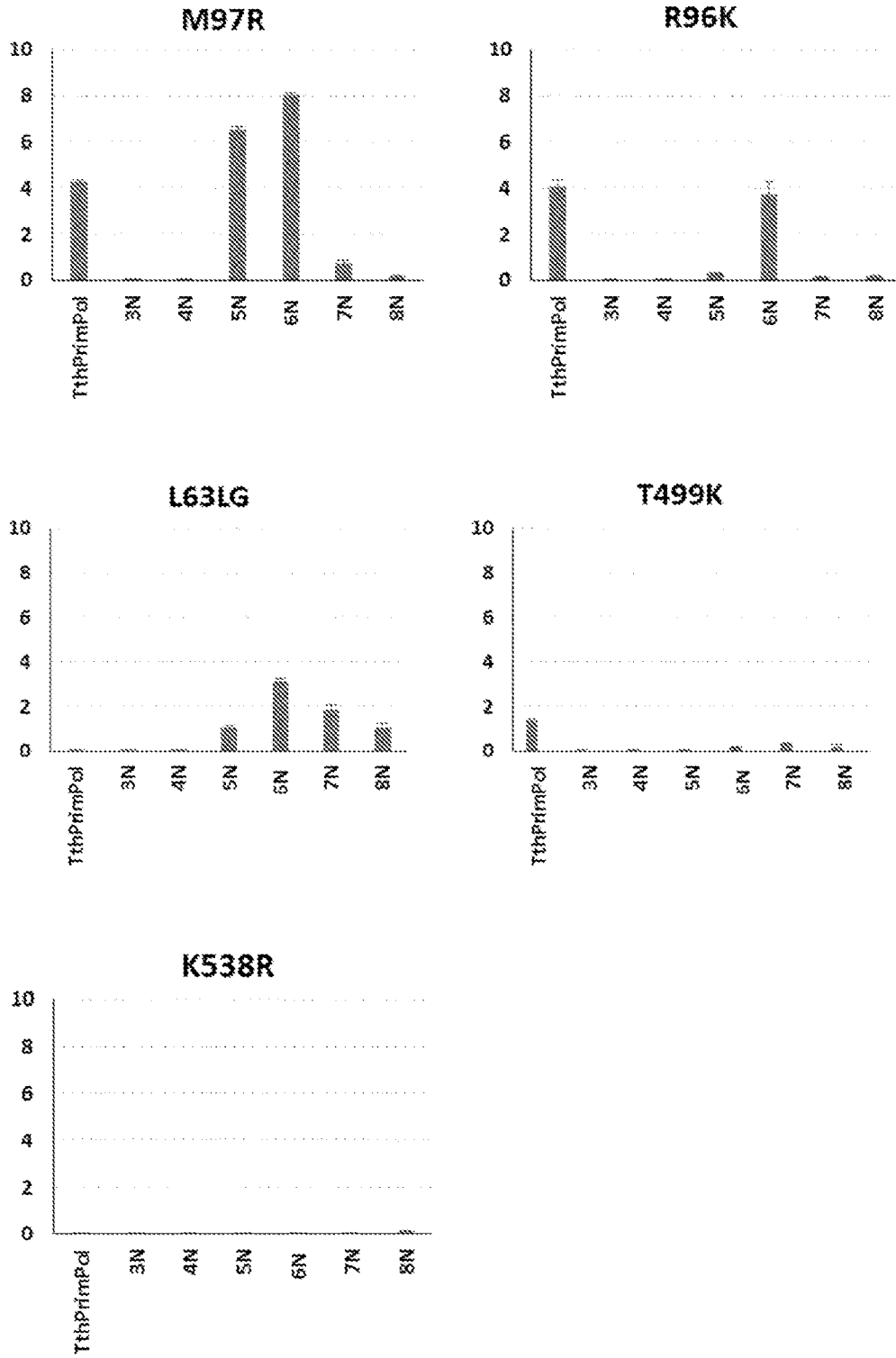


Figura 3 continuación

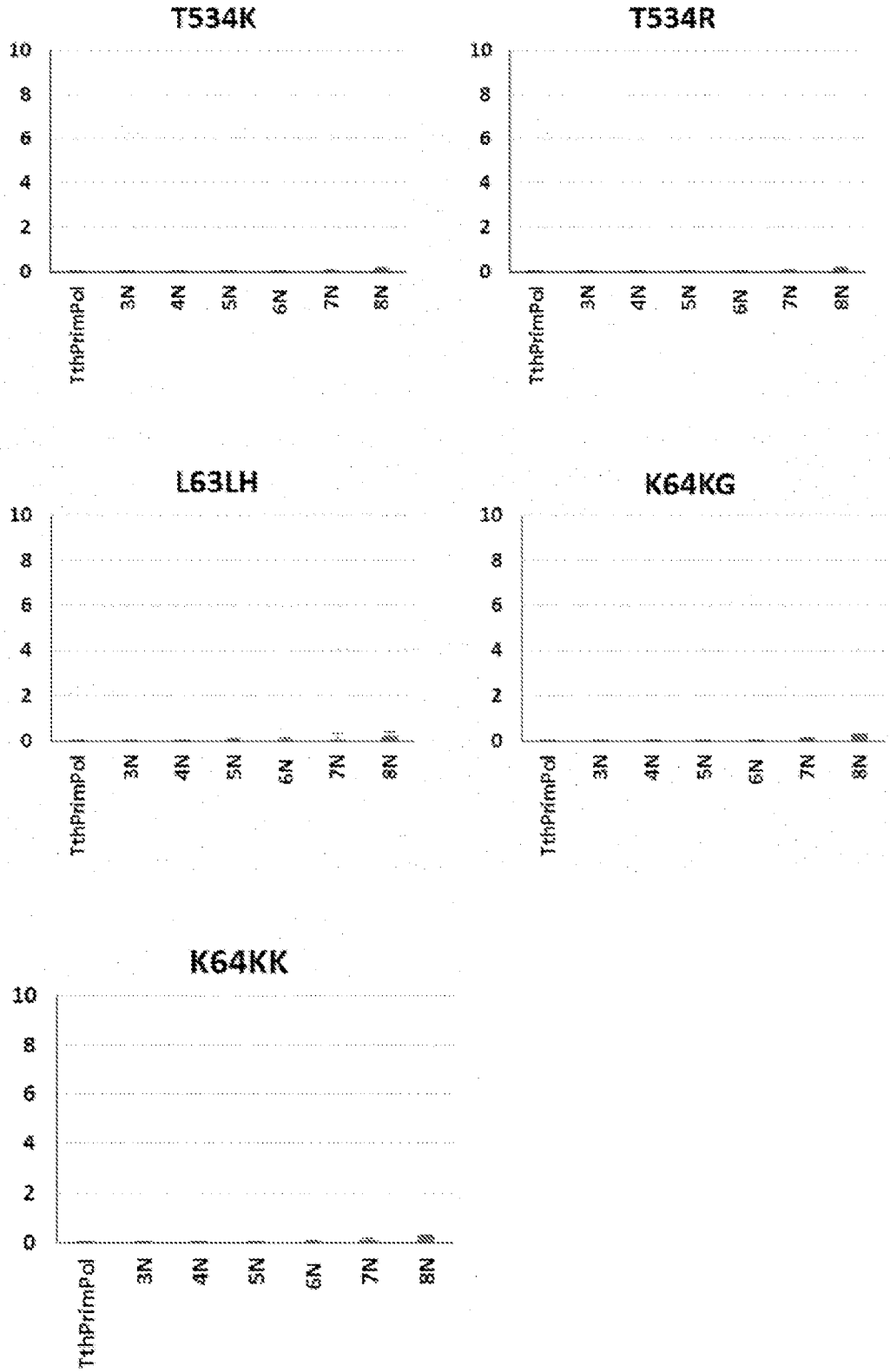


Figura 4

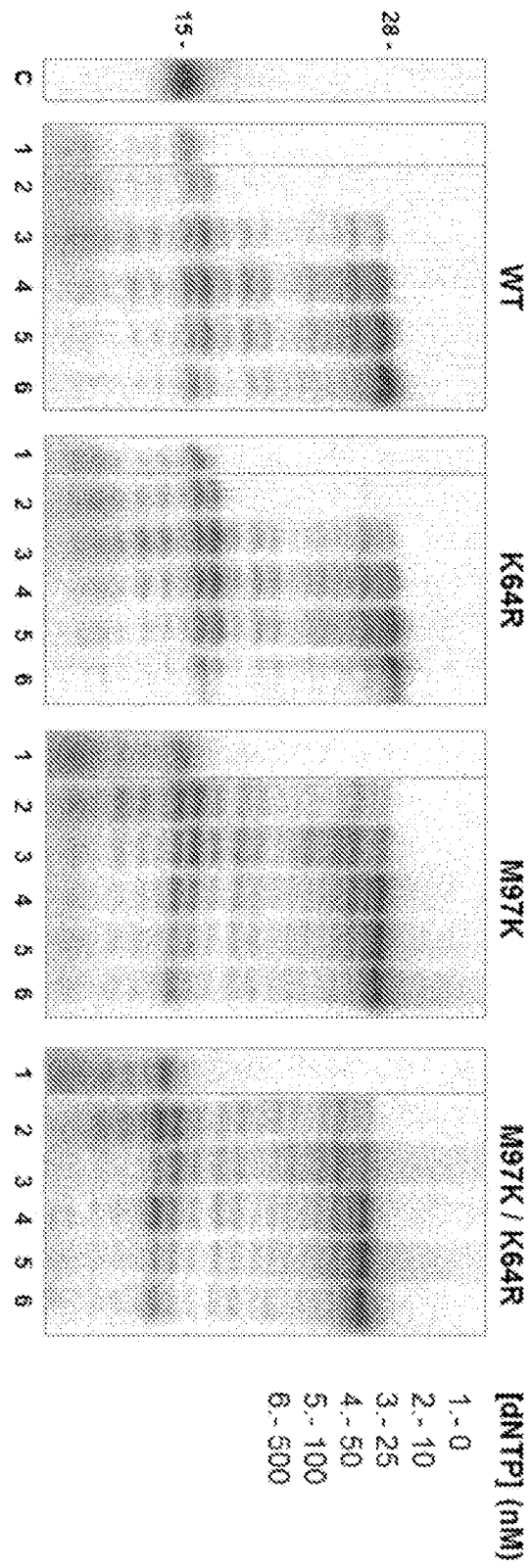


Figura 5

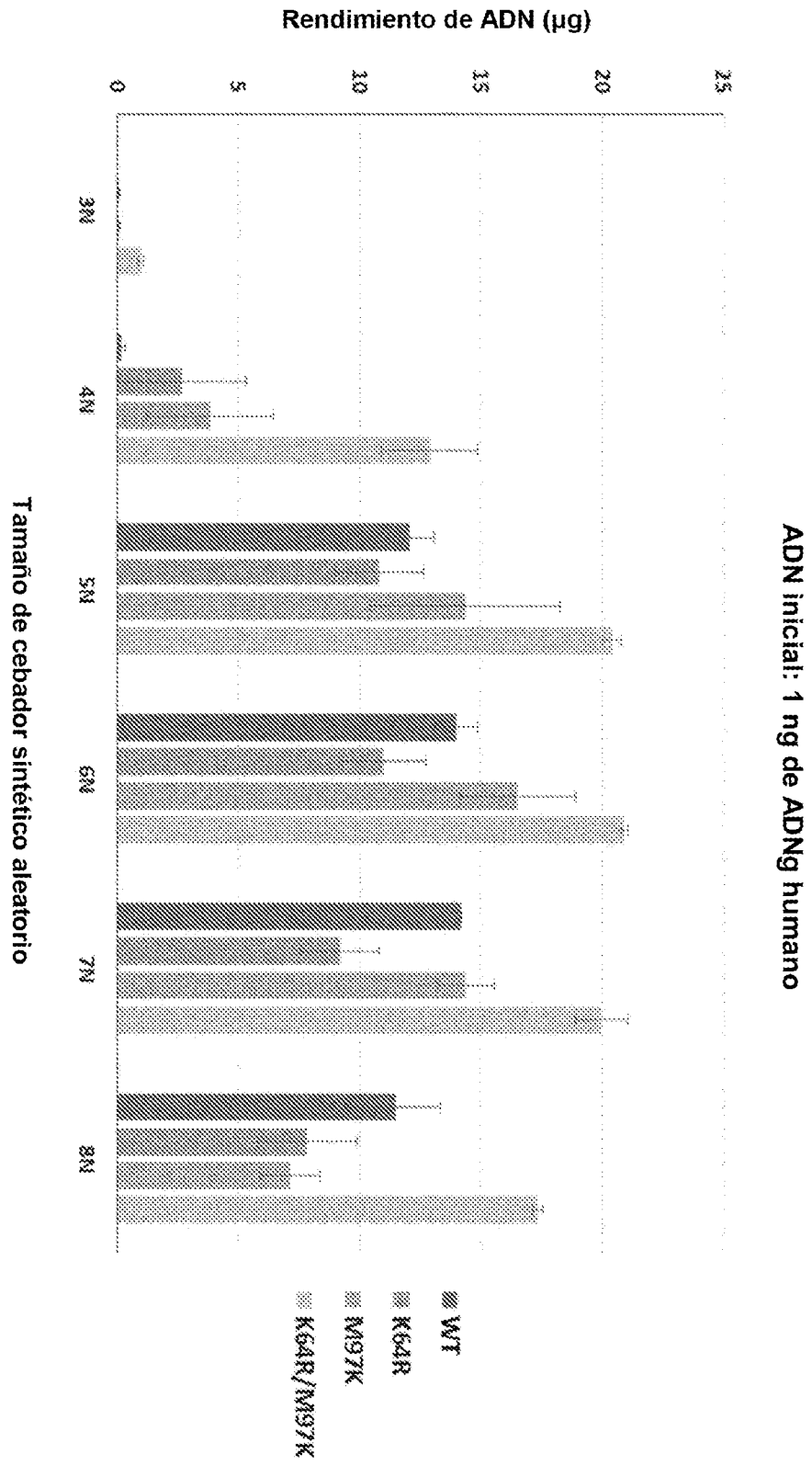


Figura 6

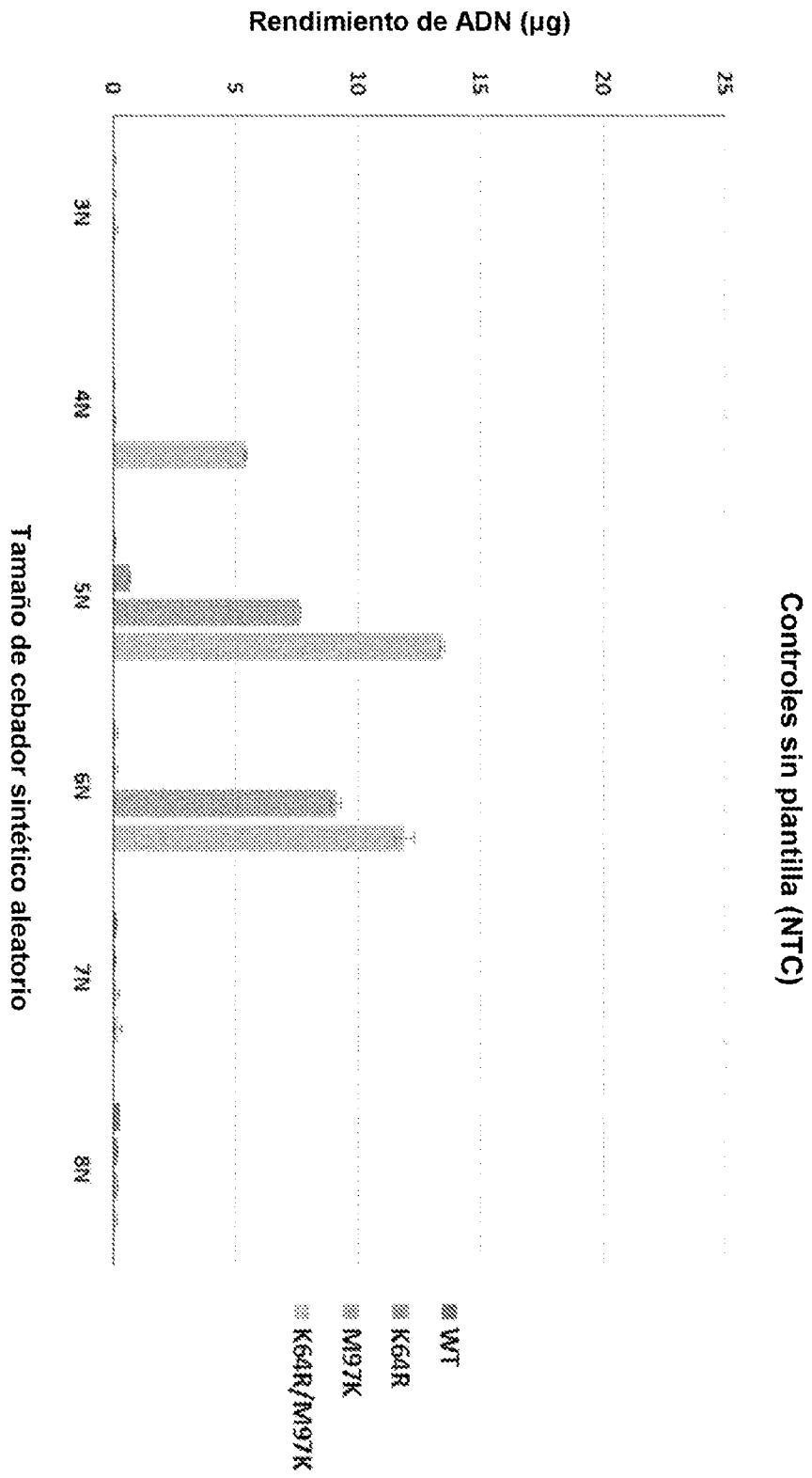


Figura 7

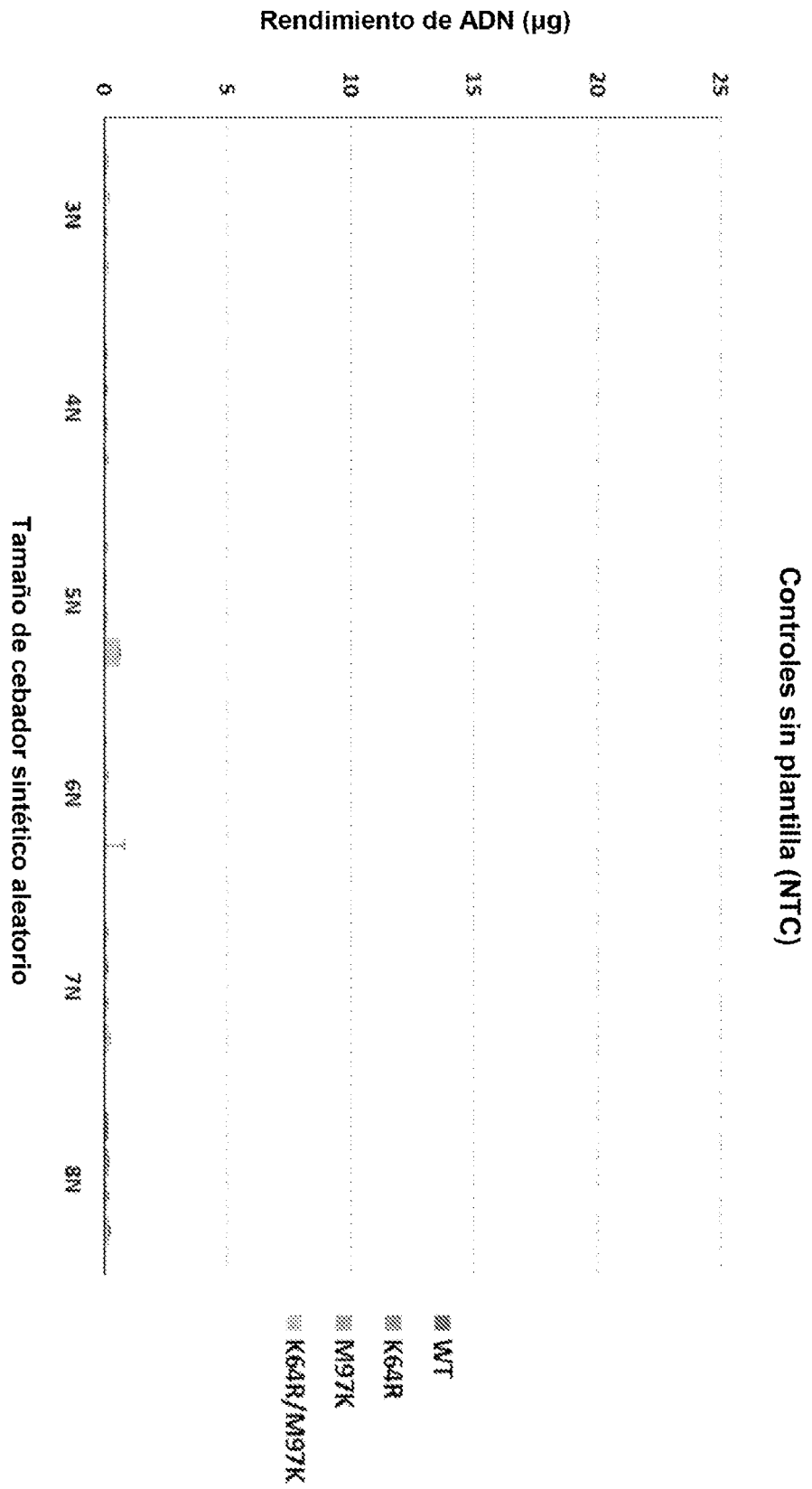


Figura 8

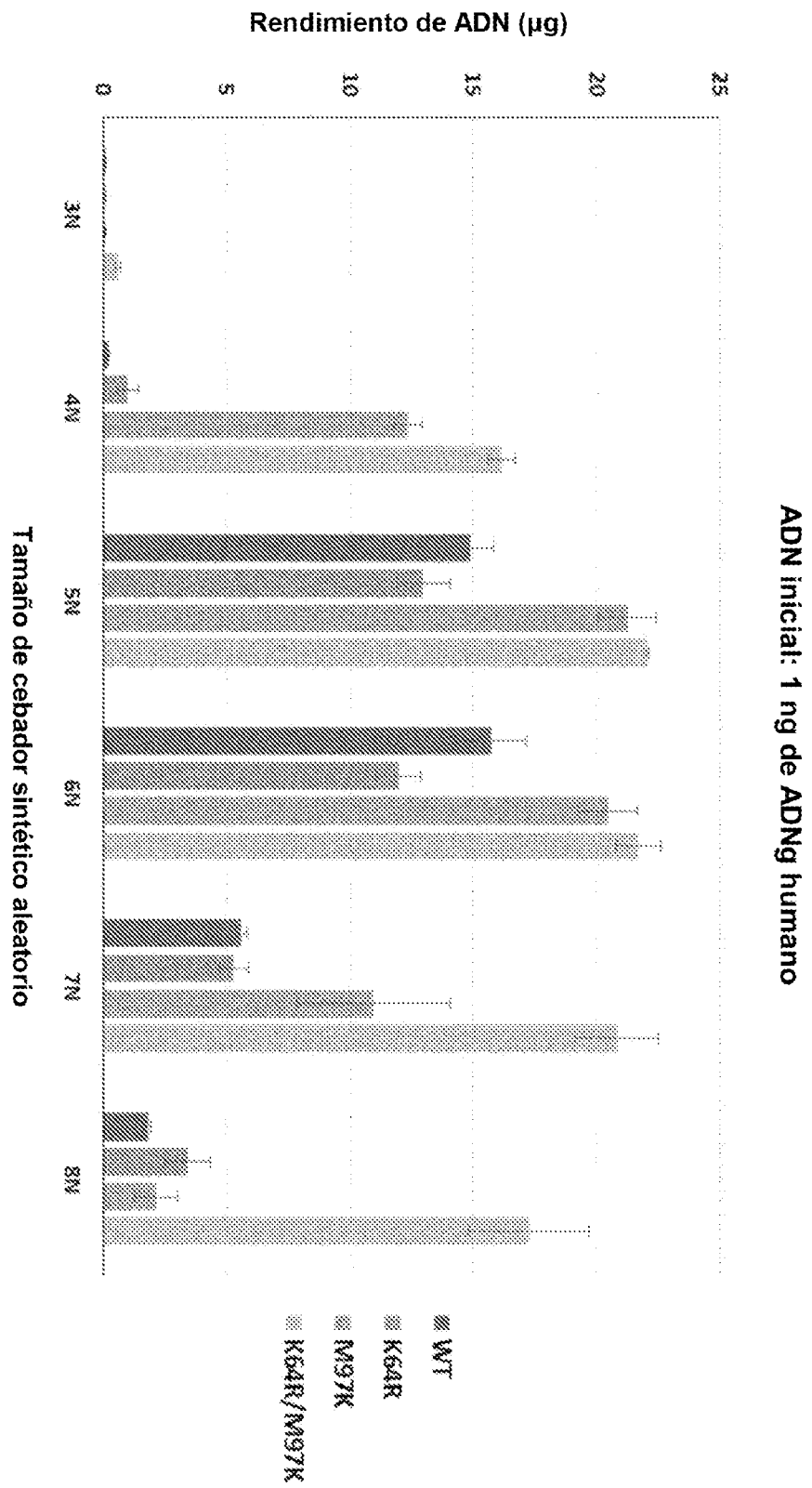
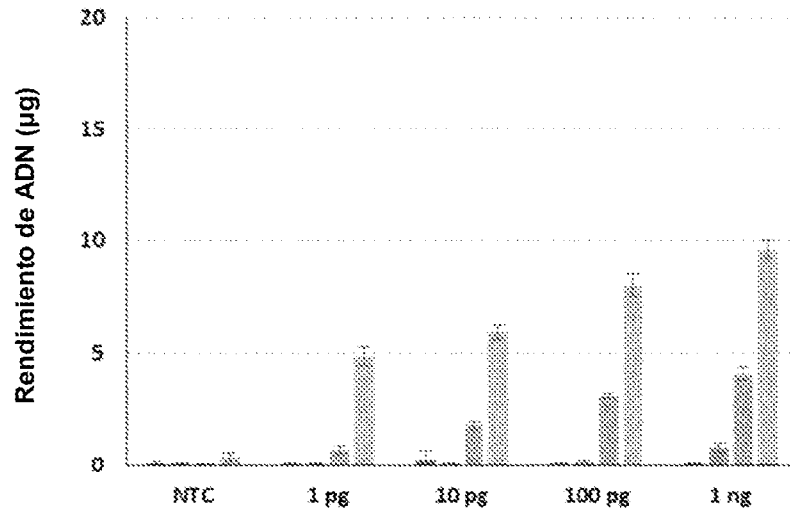


Figura 9

■ WT ■ K64R ■ M97K ■ K64R/M97K

4N

Bajo



Alto

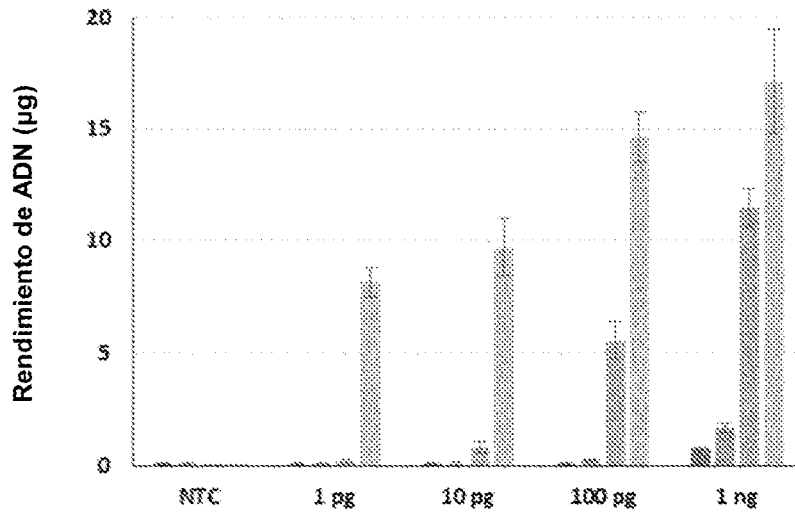


Figura 9 continuación

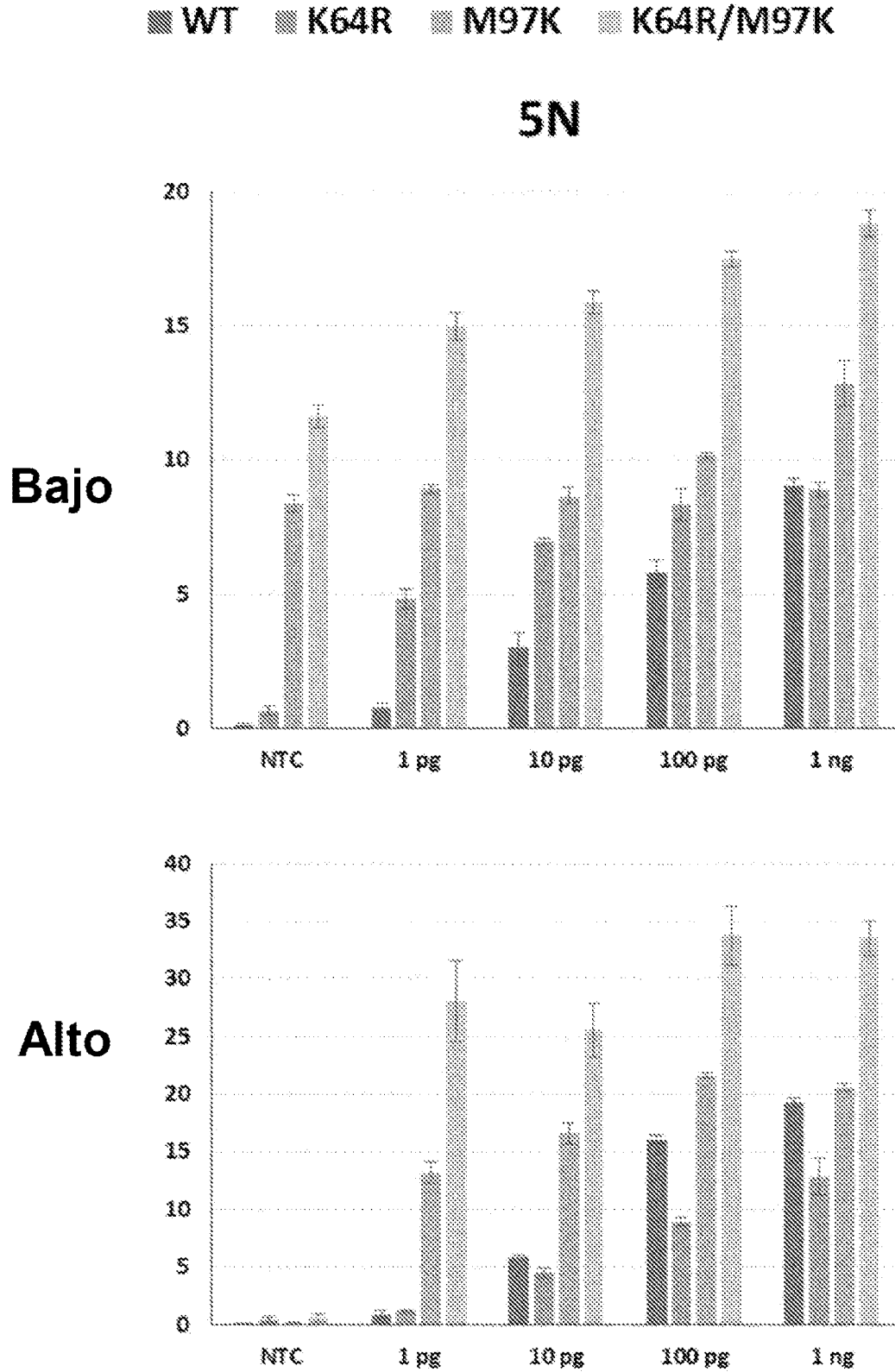


Figura 9 continuación

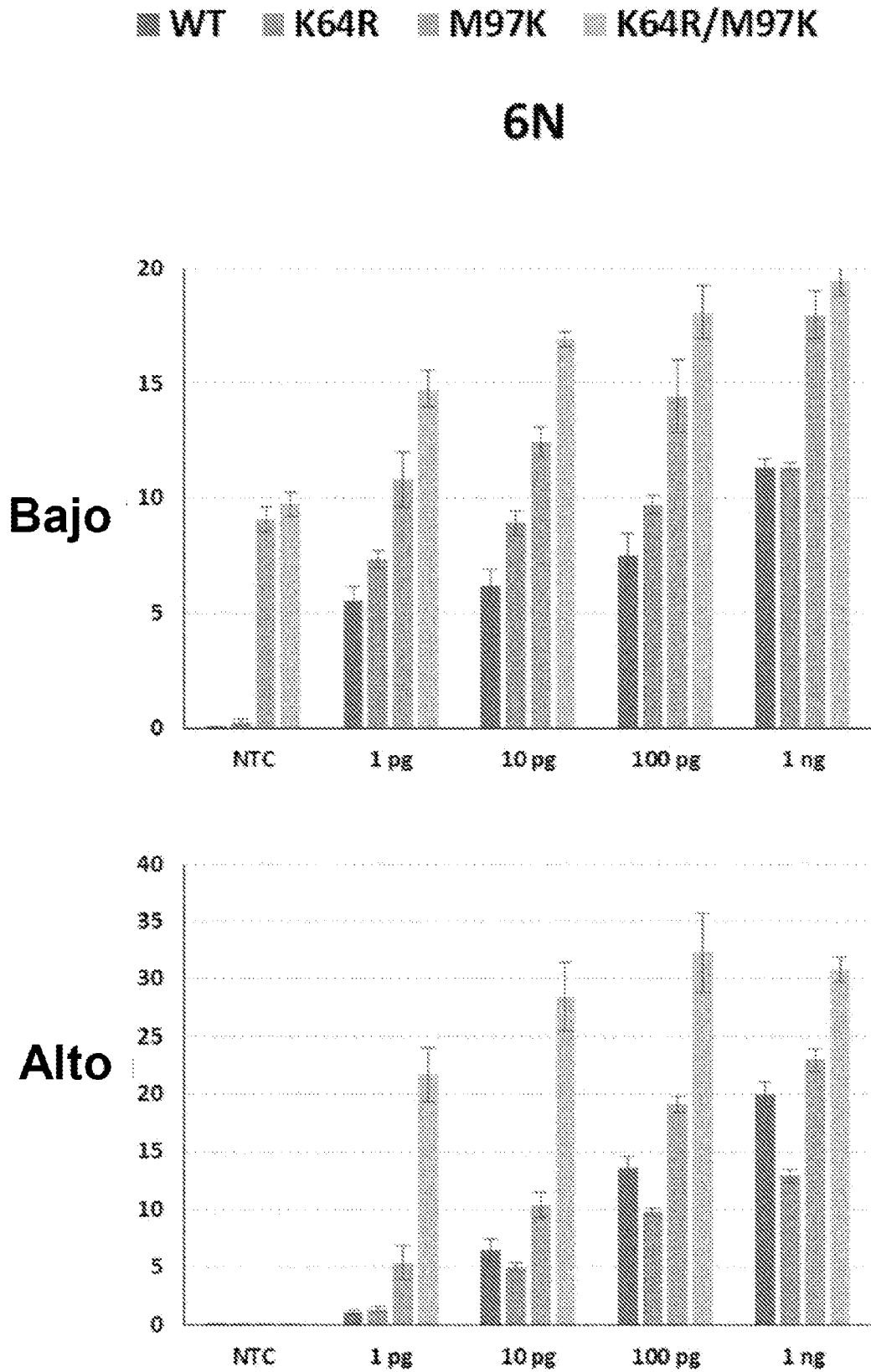


Figura 10

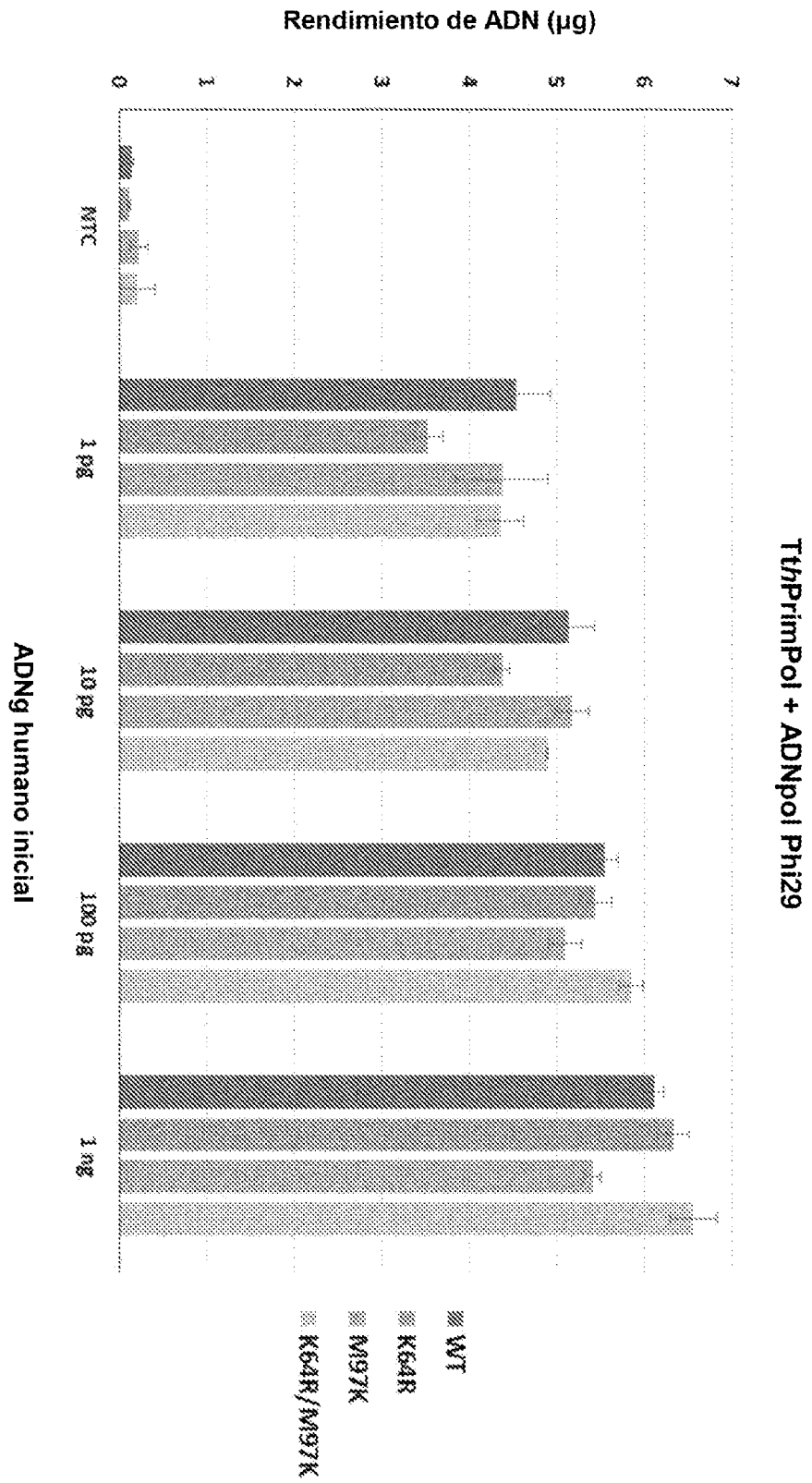


Figura 11

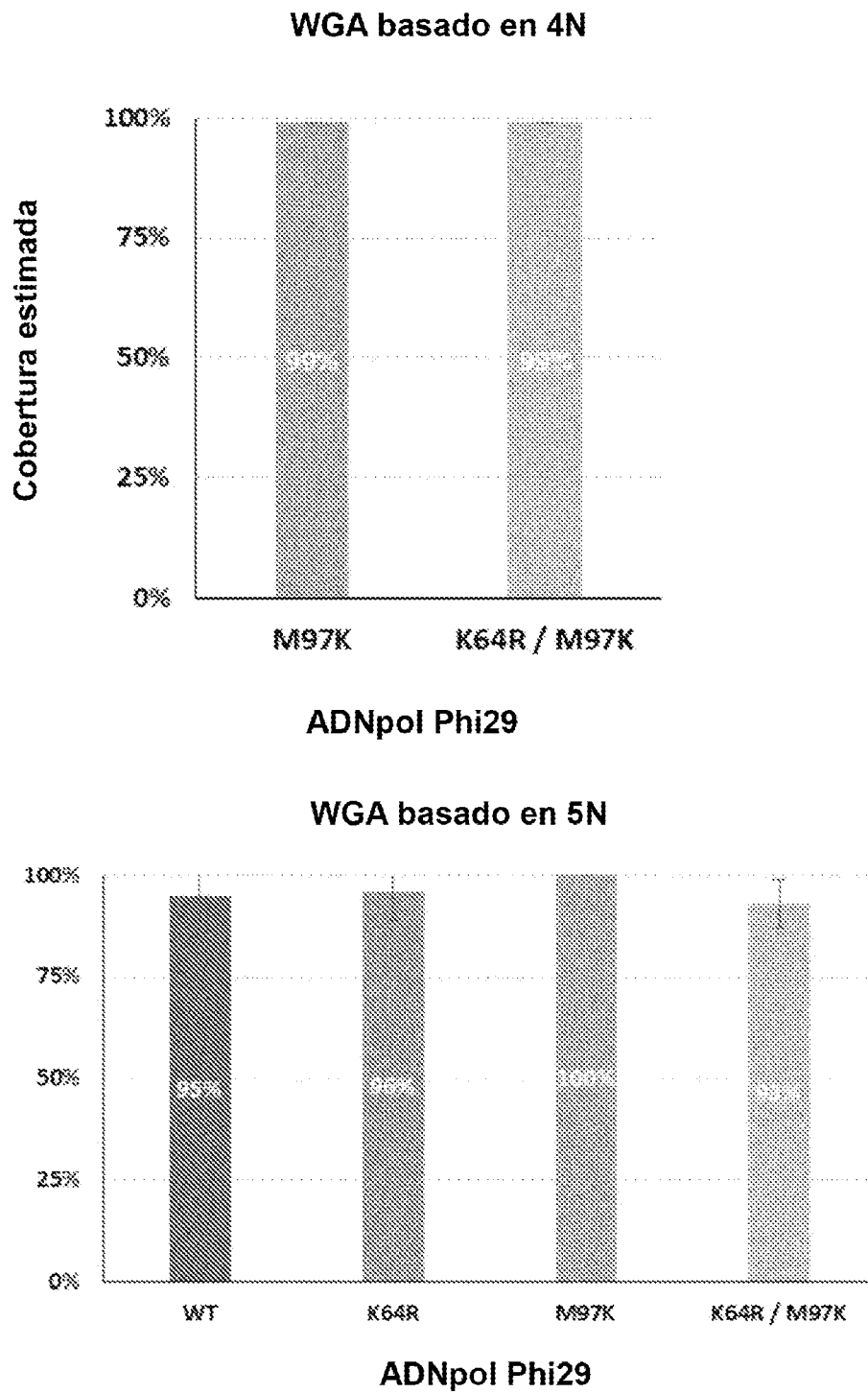


Figura 11 continuación

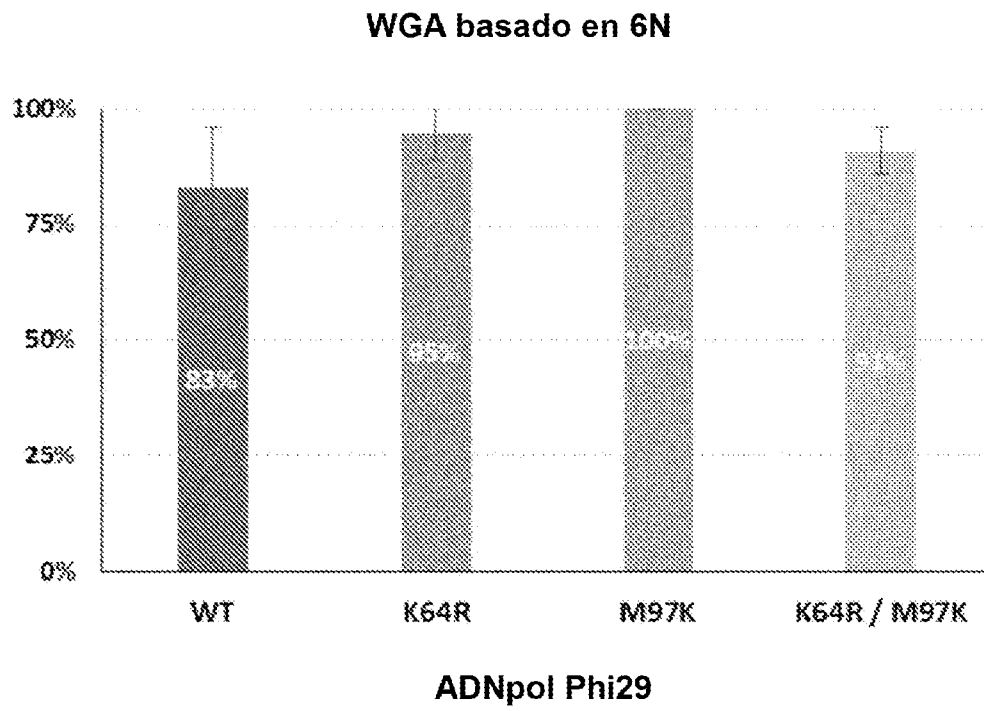


Figura 12

