

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 196**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C07K 14/79 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2017** **PCT/CN2017/082154**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2017** **WO17202172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2017** **E 17802018 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021** **EP 3450560**

54 Título: **Dominio de unión a ADN de transferrina modificado, ADN polimerasa recombinante y método de preparación de los mismos**

30 Prioridad:

23.05.2016 CN 201610345512

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2021

73 Titular/es:

FOREGENE COMPANY LIMITED (100.0%)
No. 701, 702, 705, 7/F 12 Bldg., No. 88, South of
Keyuan Road, High-tech Zone
Chengdu, Sichuan 610041, CN

72 Inventor/es:

LIU, HUAHUA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 883 196 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

Dominio de unión a ADN de transferrina modificado, ADN polimerasa recombinante y método de preparación de los mismos

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo técnico de la biología, y particularmente se refiere a una ADN polimerasa recombinante acoplada con un dominio de unión a ADN de transferrina modificado, y a un método de preparación de los mismos.

Antecedentes

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un portador para guardar y transferir la información genética de los organismos vivos, y la ADN polimerasa que participa en la síntesis de ácido desoxirribonucleico en una célula es una molécula clave para realizar las funciones de autoduplicación y transferencia de información genética de moléculas de ADN. El desarrollo de la biotecnología proporciona un método de duplicación *in vitro* de las moléculas de ADN, y la tecnología de pruebas de moléculas de ácidos nucleicos desarrollada de ese modo se ha convertido cada vez más en una tecnología clave de diversas pruebas biológicas y se aplica ampliamente a inspecciones e investigaciones teóricas tales como desarrollo de fármacos, pruebas de seguridad alimentaria, ensayo de microorganismos patógenos, mecanismos de enfermedades y direccionamiento de fármacos.

La clave para sintetizar moléculas de ADN a través del método enzimático *in vitro* es obtener ADN polimerasas termoestables para satisfacer diferentes necesidades, tales como ADN polimerasa termoestable para la amplificación por PCR, ADN polimerasa termoestable para resistir a inhibidores enzimáticos y ADN polimerasa termoestable capaz de amplificar ADN a una concentración de molde ultra baja.

Los ácidos nucleicos en los fluidos corporales necesitan frecuentemente pruebas de amplificación en el diagnóstico clínico *in vitro*, y existen muchos inhibidores de la reacción PCR en el fluido corporal, tales como clorhematina, ion calcio, hemoglobina, transferrina e inmunoglobulina. Estos inhibidores de la reacción PCR impiden el uso directo del fluido corporal para la amplificación por PCR, habitualmente se necesita purificación de los ácidos nucleicos para eliminar los inhibidores de la reacción PCR, y luego los ácidos nucleicos purificados se usan para la amplificación por PCR.

Investigaciones en el extranjero muestran que el dominio de unión a ADN de la proteína de unión a ácido nucleico de arqueobacterias y una ADN polimerasa termoestable se recombinan para construir una ADN polimerasa termoestable novedosa que tiene una infinidad superior de ADN molde y mantiene diversas funciones de la ADN polimerasa original. Esta ADN polimerasa recombinante tiene las siguientes características: (1) la infinidad de moléculas de ADN molde aumenta enormemente, y la ADN polimerasa recombinante puede unirse con las moléculas de ADN molde a baja concentración para iniciar la síntesis de ADN; (2) la ADN polimerasa recombinante con una infinidad superior de moléculas de ADN molde puede iniciar la síntesis de ADN en un entorno de reacción más complejo, tal como en una disolución de productos primarios de ADN o materiales originales que contienen contaminantes o moléculas interferentes; y (3) la ADN polimerasa recombinante tiene obviamente una infinidad superior de algunos segmentos de ADN de genoma de patógenos específico y puede iniciar la síntesis de ADN a una concentración de molde más baja o en presencia de moléculas interferentes más complejas. Estas características pueden mejorar el proceso de pruebas de ácido nucleico (para realizar una operación más simplificada y a gran escala) y aumentar la sensibilidad y estabilidad de la prueba.

Wang *et al.* notificaron una estrategia novedosa para diseñar por ingeniería genética ADN polimerasas para potenciar la procesividad y mejorar el rendimiento *in vitro* uniendo covalentemente el dominio de la polimerasa a una proteína de unión a ADNbc no específica de secuencia Sso7d (Wang *et al.*, Nucleic Acids Research (2004) 32 (3), 1197-1207).

Van Berkel *et al.* notificaron que el tramo N-terminal Arg², Arg³, Arg⁴ y Arg⁵ de lactoferrina humana es esencial para la unión a heparina, lipopolisacárido bacteriano, lisozima humana y ADN (van Berkel *et al.*, Biochem. J. (1997) 328, 145-151).

El documento US 2006/094082 A1 da a conocer una composición que consiste en una serie de péptidos biológicamente activos, en particular, péptidos relacionados con lactoferrina. Los péptidos de la presente invención comprenden al menos 33 aminoácidos en los que al menos cuatro aminoácidos en el extremo C y/o N terminal se sustituyen por aminoácidos positivos. Estos péptidos biológicamente activos pueden usarse para tratar una variedad de afecciones patológicas, por ejemplo, enfermedad hiperproliferativa, trastorno respiratorio, enfermedad cardiovascular, afección neurológica, trastorno autoinmunitario, enfermedad infecciosa, trastorno gastrointestinal, trastorno endocrino y/o del metabolismo, trastorno hematológico, trastorno ocular, trastorno del tegumento, dolor y una herida.

Sin embargo, existen pocas ADN polimerasas recombinantes con las ventajas anteriores, de modo que existe una necesidad imperiosa de fortalecer la investigación y el desarrollo de ADN polimerasas recombinantes.

Sumario

Es necesario que la presente invención solucione los problemas técnicos de adquirir una ADN polimerasa recombinante novedosa que no se inhiba fácilmente por biomacromoléculas (polisacáridos y proteínas), moléculas contaminantes orgánicas e inorgánicas (compuestos añadidos para liberar ADN y biomacromoléculas desnaturalizadas), etc. para realizar PCR directa; y adquirir una ADN polimerasa recombinante novedosa con una infinidad superior de moléculas molde para realizar la amplificación del molde a una concentración inferior y aumentar la sensibilidad y estabilidad de las pruebas.

Con el fin de solucionar los problemas técnicos anteriores, la presente invención adopta el siguiente esquema técnico:

La presente invención proporciona una ADN polimerasa recombinante acoplada con un dominio de unión a ADN de transferrina modificado, caracterizada porque: la transferrina es lactotransferrina (LTF), serotransferrina (TF), melanotransferrina (MTF) u ovotransferrina (OTF), y el extremo N terminal de cada transferrina tiene un dominio de unión a ADN homólogo, en el que el 10º sitio y 20º sitio del dominio de unión a ADN son C; y

la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a ADN de transferrina modificado es tal como sigue: C en el 10º sitio y 20º sitio se reemplaza por otros aminoácidos de modo que no puede formarse un enlace disulfuro, en el que C en el 10º sitio se reemplaza por R, y C en el 20º sitio se reemplaza por A o G.

La transferrina es lactotransferrina (LTF), serotransferrina (TF), melanotransferrina (MTF) u ovotransferrina (OTF), y el extremo N terminal de cada transferrina tiene un dominio de unión a ADN homólogo, en el que el 10º sitio y 20º sitio del dominio de unión a ADN son C; y la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a ADN de transferrina modificado es tal como sigue: C en el 10º sitio y 20º sitio se reemplaza por otros aminoácidos de modo que no puede formarse un enlace disulfuro.

Además, C en el 10º sitio se reemplaza por R, y C en el 20º sitio se reemplaza por A o G.

Además, los aminoácidos en los sitios 1º a 5º del dominio de unión a ADN se reemplazan por KFKYK y/o los aminoácidos en los sitios 28º a 31º se reemplazan por KKVK.

Además, el dominio de unión a ADN de la lactotransferrina (LTF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 1, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 2; el dominio de unión a ADN de la serotransferrina (TF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 3, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 4; el dominio de unión a ADN de la melanotransferrina (MTF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 5, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 6; y el dominio de unión a ADN de la ovotransferrina (OTF) se deriva de pollo, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 7.

La presente invención también proporciona un método de preparación de una ADN polimerasa recombinante, que comprende la etapa de acoplar el dominio de unión a ADN de transferrina modificado con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante; o conectar dominios de unión a ADN idénticos o dominios de unión a ADN diferentes en el dominio de unión a ADN de transferrina modificado en serie y luego acoplar con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante; o mezclar la ADN polimerasa recombinante construida con otras ADN polimerasas recombinantes o ADN polimerasas sin modificar para obtener una ADN polimerasa recombinante compuesta.

Además, la ADN polimerasa es ADN polimerasa termoestable o transcriptasa inversa.

Además, la ADN polimerasa termoestable es Taq ADN polimerasa.

La presente invención también proporciona una ADN polimerasa recombinante novedosa preparada mediante el método de preparación.

La presente invención también proporciona un kit de prueba de PCR que contiene la ADN polimerasa recombinante.

Con el esquema técnico anterior, la presente invención tiene al menos las siguientes ventajas:

Se obtiene un dominio de unión a ADN novedoso, concretamente dominio de unión a ADN de transferrina, que puede acoplarse con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante de la presente invención. La ADN polimerasa recombinante construida no se inhibe fácilmente por biomacromoléculas

(polisacáridos y proteínas), moléculas contaminantes orgánicas e inorgánicas (compuestos añadidos para liberar ADN y biomacromoléculas desnaturalizadas), etc. y puede realizar PCR directa. Por tanto, el procedimiento de prueba se simplifica, la eficiencia se mejora y la operación es conveniente.

- 5 Mientras tanto, el gasto se reduce, el coste disminuye, el tiempo de la prueba se acorta y la eficiencia aumenta. Además, la ADN polimerasa recombinante construida tiene una mayor infinidad de moléculas molde, puede realizar la amplificación del molde a una concentración más baja y aumenta la sensibilidad y estabilidad de la prueba.

Breve descripción de los dibujos

- 10 El esquema técnico de la presente invención solo se describió de manera resumida anteriormente. Para entender los medios técnicos de la presente invención más claramente, la presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los dibujos y realizaciones adjuntos.

- 15 La figura 1 es un diagrama de resultados de comparación entre la eficiencia de amplificación de la ADN polimerasa termoestable recombinante y la de la Taq ADN polimerasa en la realización 3;

la figura 2 es un diagrama de resultados de comparación entre la velocidad de amplificación de la ADN polimerasa termoestable recombinante y la de la Taq ADN polimerasa en la realización 3;

- 20 la figura 3 es un diagrama de resultados de comparación entre la tolerancia sérica de la ADN polimerasa termoestable recombinante y la de la Taq ADN polimerasa en la realización 3.

Descripción detallada

- 25 Con el fin de adquirir una ADN polimerasa novedosa que no se inhiba fácilmente y que tenga un requisito bajo de concentración de molde, la presente invención opta por construir una ADN polimerasa recombinante a través de recombinación. Muchas investigaciones han mostrado que, tras la modificación por reemplazo de aminoácidos parciales, puede usarse el dominio de unión a ADN de transferrina para construir una ADN polimerasa recombinante con las ventajas anteriores.

La transferrina tiene cuatro clases de proteínas homólogas: lactotransferrina (LTF), serotransferrina (TF), melanotransferrina (MTF) y ovotransferrina (OTF). Los extremos N terminales de estas cuatro proteínas tienen un dominio de unión homólogo, en el que los sitios 10° y 20° del dominio de unión a ADN son C.

35

Realización 1 (etapa de preparación)

En la realización, se detectan tres dominios de unión a ADN de transferrina derivados de ser humano, tres derivados de ratón y uno derivado de pollo, y las secuencias de aminoácidos son las siguientes, respectivamente:

40

LTF de ser humano (HLTF): GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVR (SEQ ID No. 1)

TF de ser humano (HTF): AVPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFRDHMKSVI (SEQ ID No. 3)

- 45 MTF de ser humano (HMTF): VLGGMEVRWCATSDPEQHKCGNMSEAFREAG (SEQ ID No. 5)

LTF de ratón (MLTF): LAKATTVQWCAVSNSEEEKCLRWQNMVRKVG (SEQ ID No. 2)

TF de ratón (MTF): AVPDKTVKWCAVSEHENTKCISFRDHMKTVL (SEQ ID No. 4)

50

MTF de ratón (MMTF): WCVMEVQWCTISDAEQKCKDMSEAFQGAG (SEQ ID No. 6)

OTF de pollo (GOTF): APPKSVIRWCTISSPEEKCCNNLRDLTQQR (SEQ ID No. 7)

- 55 Un método de modificación del dominio de unión a ADN anterior es tal como sigue:

Hay dos aminoácidos C en el dominio de unión a ADN de transferrina, que pueden formar un enlace disulfuro que es inestable a alta temperatura. C en el 10° sitio y 20° sitio puede reemplazarse por otros aminoácidos, de modo que no puede formarse un enlace disulfuro. Por ejemplo, preferiblemente, C en el 10° sitio del fragmento puede reemplazarse por R, y C en el 20° sitio puede reemplazarse por dos aminoácidos pequeños A o C. Este dominio de unión a ADN modificado puede acoplarse directamente con una ADN polimerasa termoestable para formar un ADN polimerasa termoestable recombinante.

60

La secuencia de aminoácidos del dominio de unión a ADN de transferrina modificado es tal como sigue:

65

LTF' de ser humano (HLTF'): GRRRRSVQWRAVSQPEATKAFQWQRNMRKVR (SEQ ID No. 8)

TF' de ser humano (HTF'): AVPDKTVRWRAVSEHEATKAQSFRDHMKSVI (SEQ ID No. 9)

MTF' de ser humano (HMTF'): VLGGMEVRWRATSDPEQHKAGNMSEAFREAG (SEQ ID No. 10)

LTF' de ratón (MLTF'): LAKATTVQWRAVSNSEEEKALRWQNMVRKVG (SEQ ID No. 11)

TF' de ratón (MTF'): AVPDKTVKWRAVSEHENTKAISFRDHMKTVL (SEQ ID No. 12)

MTF' de ratón (MMTF'): WCVMEVQWRTISDAEQQKAKDMSEAFQAG (SEQ ID No. 13)

OTF' de pollo (GOTF'): APPKSVIRWRTISSPEEKKANNLRDLTQQR (SEQ ID No. 14)

Realización 2 (etapa de preparación)

El dominio de unión a ADN de transferrina obtenido en la realización 1 puede modificarse adicionalmente. Los aminoácidos en los sitios 1° a 5° del dominio de unión a ADN de transferrina se reemplazan por KFKYK, y los aminoácidos en los sitios 28° a 31° se reemplazan por KKKV, en los que la modificación de los aminoácidos en los sitios 1° a 5° es relativamente importante. Las propiedades de la ADN polimerasa pueden mejorarse adicionalmente.

La secuencia de aminoácidos del dominio de unión a ADN de transferrina modificado en la segunda etapa es tal como sigue:

LTF" de ser humano (HLTF"): KFKYKSVQWRAVSQPEATKAFQWQRNMKKVK (SEQ ID No. 15)

TF" de ser humano (HTF"): KFKYKTVRWRAVSEHEATKAQSFRDHMKVK (SEQ ID No. 16)

MTF" de ser humano (HMTF"): KFKYKEVRWRATSDPEQHKAGNMSEAFKKVK (SEQ ID No. 17)

LTF" de ratón (MLTF"): KFKYKTVQWRAVSNSEEEKALRWQNMKKVK (SEQ ID No. 18)

TF" de ratón (MTF"): KFKYKTVKWRAVSEHENTKAISFRDHMKVK (SEQ ID No. 19)

MTF" de ratón (MMTF"): KFKYKEVQWRTISDAEQQKAKDMSEAFKKVK (SEQ ID No. 20)

OTF" de pollo (GOTF"): KFKYKVIRWRTISSPEEKKANNLRDLTKVK (SEQ ID No. 21)

Realización 3

Los dominios de unión a ADN de transferrina modificados en las realizaciones 1 y 2 se acoplan con Taq ADN polimerasa para formar una ADN polimerasa termoestable recombinante.

(I) Experimento de comparación de la eficiencia de amplificación:

Diluir Taq purificada, HLTF'-Taq, HLTF"-Taq, HTF'-Taq, HTF"-Taq, MMTF'-Taq, MMTF"-Taq, GOTF'-Taq y GOTF"-Taq de manera continua de un modo de mitad y mitad, tomar 1 µl en cada grado de dilución y amplificar hasta obtener fragmentos de ADN de 1,5 kb (25 ciclos) en un volumen de reacción de 20 µl. La figura 1 muestra los resultados de la amplificación de Tag con igual concentración de zimoproteína en los carriles de electroforesis en gel de agarosa 1-6 (carga de 5 µl/carril) o ADN polimerasa termoestable recombinante tras la dilución continua de un modo de mitad y mitad (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32).

(2) Experimento de comparación de la velocidad de amplificación: tal como se muestra en la figura 2, Taq, HLTF'-Taq, HLTF"-Taq, HTF'-Taq, HTF"-Taq, MMTF'-Taq, MMTF"-Taq, GOTF'-Taq y GOTF"-Taq se amplifican hasta obtener fragmentos de ADN de 1,5 kb, 2,5 kb, 3,5 kb y 4,5 kb dentro de condiciones de 20 s prolongadas.

Los resultados experimentales muestran que la ADN polimerasa termoestable recombinante tiene una mayor eficiencia de amplificación (tal como se muestra en la figura 1) y una velocidad de amplificación más rápida (tal como se muestra en la figura 2) que la Taq ADN polimerasa.

(3) Experimento de comparación de la tolerancia sérica

Preparar una cierta cantidad de sistema de reacción PCR (SYBR Green) a partir de Taq, HLTF'-Taq, HLTF"-Taq, HTF'-Taq, HTF"-Taq, MMTF'-Taq, MMTF"-Taq, GOTF'-Taq y GOTF"-Taq, y añadir partículas de virus de ADN PCV2 (10³ partículas de PCV2/reacción), cebador de PCV2 y diferentes cantidades de suero de cerdo (cada una 0, 1, 2, 3, 4 µl de suero de cerdo en 20 µl totales de disolución de qPCR) para la amplificación por PCR. La eficiencia

de amplificación de las muestras con suero añadido (1-4 µl) es obviamente menor que la de la muestra sin suero añadido (0 µl), y las muestras que usan la ADN polimerasa termoestable recombinante y Taq para la amplificación tienen una obvia diferencia en la disminución de la velocidad. (Tal como se muestra en la figura 3), los resultados experimentales muestran que la ADN polimerasa termoestable recombinante tiene una mayor tolerancia sérica que la Taq ADN polimerasa.

Realización 4

Los dominios de unión a ADN de transferrina modificados en las realizaciones 1 y 2 se acoplan con transcriptasa inversa para formar transcriptasa inversa recombinante. A través de análisis por experimentos de RT-PCR, el experimento de comparación de la eficiencia de amplificación, el experimento de comparación de la velocidad de amplificación y el experimento de comparación de la tolerancia sérica similares a la realización 3 producen resultados similares, concretamente una mayor eficiencia de amplificación, una velocidad de amplificación más rápida y mayor tolerancia sérica.

Realización 5

Se conectan en serie dominios de unión a ADN idénticos en los dominios de unión a ADN de transferrina modificados en las realizaciones 1 y 2 y luego se acoplan con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante; o se conectan en serie dominios de unión a ADN diferentes en los dominios de unión a ADN de transferrina modificados en las realizaciones 1 y 2 y luego se acoplan con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante. Ambos modos pueden producir resultados experimentales similares, concretamente una mayor eficiencia de amplificación, una velocidad de amplificación más rápida y mayor tolerancia sérica.

Además, las ADN polimerasas recombinantes construidas en las realizaciones 1 y 2 o las ADN polimerasas recombinantes anteriores construidas en esta realización pueden mezclarse con otras ADN polimerasas recombinantes en la técnica anterior o ADN polimerasas sin modificar para obtener una ADN polimerasa compuesta. En comparación con ADN polimerasas ordinarias, la ADN polimerasa compuesta tiene también las ventajas de una mayor eficiencia de amplificación, una velocidad de amplificación más rápida y mayor tolerancia sérica.

Finalmente, debe indicarse que los sitios 10° y 20° en la presente invención no son posiciones fijas, los aminoácidos correspondientes a estas dos posiciones son C y los dos C difieren en 10 aminoácidos, y el resto de los sitios 1° a 5° y los sitios 28° a 31° son posiciones en relación con el 10° sitio. Es decir, para un dominio de unión a ADN que contiene 40 aminoácidos, dos aminoácidos son C y difieren en 10 aminoácidos, y las posiciones correspondientes a estos dos aminoácidos se determinan como los sitios 10° y 20°.

Lista de secuencias

<110>Foregene Company Limited.

<120>DOMINIO DE UNIÓN A ADN DE TRANSFERRINA MODIFICADO, ADN POLIMERASA RECOMBINANTE Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS MISMOS

<160>21

<210>1

<211>31

<212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>1

Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Val	Gln	Trp	Cys	Ala	Val	Ser	Gln	Pro
1				5					10					15
Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val
				20					25					30
Arg														

<210>2

<211>31

<212>PRT

<213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>2

ES 2 883 196 T3

Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Val	Gln	Trp	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Ser
1				5					10				15	
Glu	Glu	Glu	Lys	Cys	Leu	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Met	Arg	Lys	Val
				20					25				30	
Gly														

<210>3

<211>31

5 <212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>3

Ala	Val	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Trp	Cys	Ala	Val	Ser	Glu	His
1				5					10				15	
Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Gln	Ser	Phe	Arg	Asp	His	Met	Lys	Ser	Val
				20					25				30	
Ile														

10

<210>4

<211>31

<212>PRT

<213>*Mus musculus (Mus musculus)*

15 <400>4

Ala	Val	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Lys	Trp	Cys	Ala	Val	Ser	Glu	His
1				5					10				15	
Glu	Asn	Thr	Lys	Cys	Ile	Ser	Phe	Arg	Asp	His	Met	Lys	Thr	Val
				20					25				30	
Leu														

<210>5

20 <211>31

<212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>5

Val	Leu	Gly	Gly	Met	Glu	Val	Arg	Trp	Cys	Ala	Thr	Ser	Asp	Pro
1				5					10				15	
Glu	Gln	His	Lys	Cys	Gly	Asn	Met	Ser	Glu	Ala	Phe	Arg	Glu	Ala
				20					25				30	

25

Gly

<210>6

<211>31

<212>PRT

30 <213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>6

Val	Val	Cys	Val	Met	Glu	Val	Gln	Trp	Cys	Thr	Ile	Ser	Asp	Ala
1				5					10				15	
Glu	Gln	Gln	Lys	Cys	Lys	Asp	Met	Ser	Glu	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala
				20					25				30	

Gly

35

<210>7

<211>31

<212>PRT

<213>*Gallus gallus (Gallus gallus)*

<400>7

40

Ala	Pro	Pro	Lys	Ser	Val	Ile	Arg	Trp	Cys	Thr	Ile	Ser	Ser	Pro
1				5					10				15	
Glu	Glu	Lys	Lys	Cys	Asn	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Gln	Glu
				20					25				30	
Arg														

<210>8

<211>31

ES 2 883 196 T3

<212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>8

Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Val	Gln	Trp	Arg	Ala	Val	Ser	Gln	Pro
1				5					10					15
Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val
				20					25					30
Arg														

5

<210>9

<211>31

<212>PRT

10 <213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>9

Ala	Val	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Trp	Arg	Ala	Val	Ser	Glu	His
1				5					10					15
Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Gln	Ser	Phe	Arg	Asp	His	Met	Lys	Ser	Val
				20					25					30
Ile														

15

<210>10

<211>31

<212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>10

20

Val	Leu	Gly	Gly	Met	Glu	Val	Arg	Trp	Arg	Ala	Thr	Ser	Asp	Pro
1				5					10					15
Glu	Gln	His	Lys	Ala	Gly	Asn	Met	Ser	Glu	Ala	Phe	Arg	Glu	Ala
				20					25					30
Gly														

<210>11

<211>31

25 <212>PRT

<213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>11

Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Val	Gln	Trp	Arg	Ala	Val	Ser	Asn	Ser
1				5					10					15
Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Met	Arg	Lys	Val
				20					25					30

30

Gly

<210>12

<211>31

<212>PRT

35 <213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>12

Ala	Val	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Lys	Trp	Arg	Ala	Val	Ser	Glu	His
1				5					10					15
Glu	Asn	Thr	Lys	Ala	Ile	Ser	Phe	Arg	Asp	His	Met	Lys	Thr	Val
				20					25					30
Leu														

40

<210>13

<211>31

<212>PRT

<213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>13

45

ES 2 883 196 T3

Val Val Cys Val Met Glu Val Gln TrpArg Thr Ile Ser Asp Ala
 1 5 10 15
 Glu Gln Gln LysAla Lys Asp Met Ser Glu Ala Phe Gln Gly Ala
 20 25 30
 Gly

<210>14

<211>31

5 <212>PRT

<213>*Gallus gallus (Gallus gallus)*

<400>14

Ala Pro Pro Lys Ser Val Ile Arg Trp Arg Thr Ile Ser Ser Pro
 1 5 10 15
 Glu Glu Lys Lys Ala Asn Asn Leu Arg Asp Leu Thr Gln Gln Glu
 20 25 30
 Arg

10

<210>15

<211>31

<212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

15 <400>15

Lys Phe Lys Tyr Lys Ser Val Gln Trp Arg Ala Val Ser Gln Pro
 1 5 10 15
 Glu Ala Thr Lys Ala Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Lys Lys Val
 20 25 30
 Lys

<210>16

20

<211>31

<212>PRT

<213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>16

Lys Phe Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Arg Ala Val Ser Glu His
 1 5 10 15
 Glu Ala Thr LysAla Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Lys Val
 20 25 30
 Lys

25

<210>17

<211>31

<212>PRT

30 <213>*Homo sapiens (Homo sapiens)*

<400>17

Lys Phe Lys Tyr Lys Glu Val Arg Trp Arg Ala Thr Ser Asp Pro
 1 5 10 15
 Glu Gln His Lys Ala Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Lys Lys Val
 20 25 30
 Lys

35

<210>18

<211>31

<212>PRT

40 <213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>18

Lys Phe Lys Tyr Lys Thr Val Gln Trp Arg Ala Val Ser Asn Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu LysAla Leu Arg Trp Gln Asn Glu Met Lys Lys Val
 20 25 30
 Lys

ES 2 883 196 T3

<210>19

<211>31

<212>PRT

<213>*Mus musculus (Mus musculus)*

5 <400>19

```

Lys Phe Lys Tyr Lys Thr Val Lys Trp Arg Ala Val Ser Glu His
1      5      10      15
Glu Asn Thr Lys Ala Ile Ser Phe Arg Asp His Met Lys Lys Val
      20      25      30
Lys

```

<210>20

10 <211>31

<212>PRT

<213>*Mus musculus (Mus musculus)*

<400>20

```

Lys Phe Lys Tyr Lys Glu Val Gln Trp Arg Thr Ile Ser Asp Ala
1      5      10      15
Glu Gln Gln Lys Ala Lys Asp Met Ser Glu Ala Phe Lys Lys Val
      20      25      30
Lys

```

15

<210>21

<211>31

<212>PRT

20 <213>*Gallus gallus (Gallus gallus)*

<400>21

```

Lys Phe Lys Tyr LysVal Ile Arg Trp Arg Thr Ile Ser Ser Pro
1      5      10      15
Glu Glu Lys Lys Ala Asn Asn Leu Arg Asp Leu Thr Lys Lys Val
      20      25      30
Lys

```

REIVINDICACIONES

1. ADN polimerasa recombinante acoplada con un dominio de unión a ADN de transferrina modificado, caracterizado porque: la transferrina es lactotransferrina (LTF), serotransferrina (TF), melanotransferrina (MTF) u ovotransferrina (OTF), y el extremo N terminal de cada transferrina tiene un dominio de unión a ADN homólogo, en la que el 10° sitio y 20° sitio del dominio de unión a ADN son C; y
 5 la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a ADN de transferrina modificado es tal como sigue: C en el 10° sitio y 20° sitio se reemplaza por otros aminoácidos de modo que no puede formarse un enlace disulfuro, en la que C en el 10° sitio se reemplaza por R y C en el 20° sitio se reemplaza por A o G.
2. ADN polimerasa recombinante según la reivindicación 1, caracterizada porque: los aminoácidos en los sitios 1° a 5° del dominio de unión a ADN se reemplazan por KFKYK y/o los aminoácidos en los sitios 28° a 31° se reemplazan por KKVK.
3. ADN polimerasa recombinante según la reivindicación 1, caracterizada porque: el dominio de unión a ADN de la lactotransferrina (LTF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 1, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 2;
 20 el dominio de unión a ADN de la serotransferrina (TF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 3, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 4;
 el dominio de unión a ADN de la melanotransferrina (MTF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 5, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 6; o
 25 el dominio de unión a ADN de la ovotransferrina (OTF) se deriva de pollo, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 7.
4. ADN polimerasa recombinante según la reivindicación 2, caracterizada porque: el dominio de unión a ADN de la lactotransferrina (LTF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 1, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 2;
 30 el dominio de unión a ADN de la serotransferrina (TF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 3, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 4;
 35 el dominio de unión a ADN de la melanotransferrina (MTF) se deriva de ser humano, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 5, o se deriva de ratón, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 6; o
 el dominio de unión a ADN de la ovotransferrina (OTF) se deriva de pollo, tal como se muestra mediante SEQ ID No. 7.
5. Método de preparación de una ADN polimerasa recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende la etapa de acoplar el dominio de unión a ADN de transferrina modificado tal como se define en las reivindicaciones 1-4 con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante; o
 45 conectar dominios de unión a ADN idénticos o dominios de unión a ADN diferentes en el dominio de unión a ADN de transferrina modificado tal como se define en las reivindicaciones 1-4 en serie y luego acoplar con una ADN polimerasa para construir una ADN polimerasa recombinante; o
 50 mezclar la ADN polimerasa recombinante construida con otras ADN polimerasas recombinantes o ADN polimerasas sin modificar para obtener una ADN polimerasa recombinante compuesta.
6. Método de preparación de una ADN polimerasa recombinante según la reivindicación 5, caracterizado porque: la ADN polimerasa es ADN polimerasa termoestable o transcriptasa inversa.
7. Método de preparación de una ADN polimerasa recombinante según la reivindicación 6, caracterizado porque: la ADN polimerasa termoestable es Taq ADN polimerasa.
8. ADN polimerasa recombinante acoplada con el dominio de unión a ADN de transferrina modificado preparado mediante el método de preparación descrito en cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
9. Kit de prueba de PCR, caracterizado porque contiene la ADN polimerasa recombinante descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8.

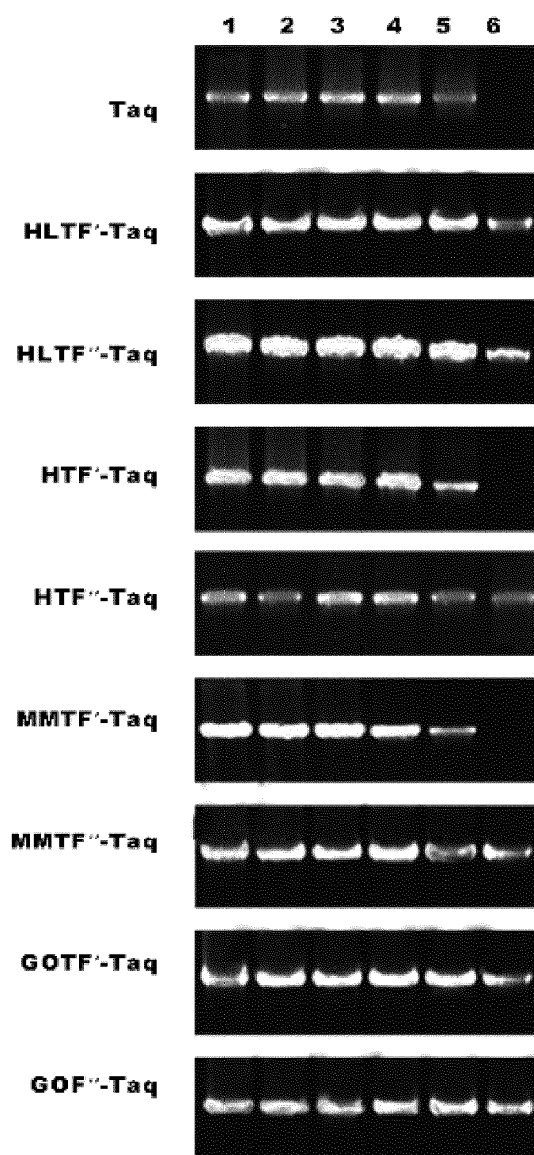


FIG. 1

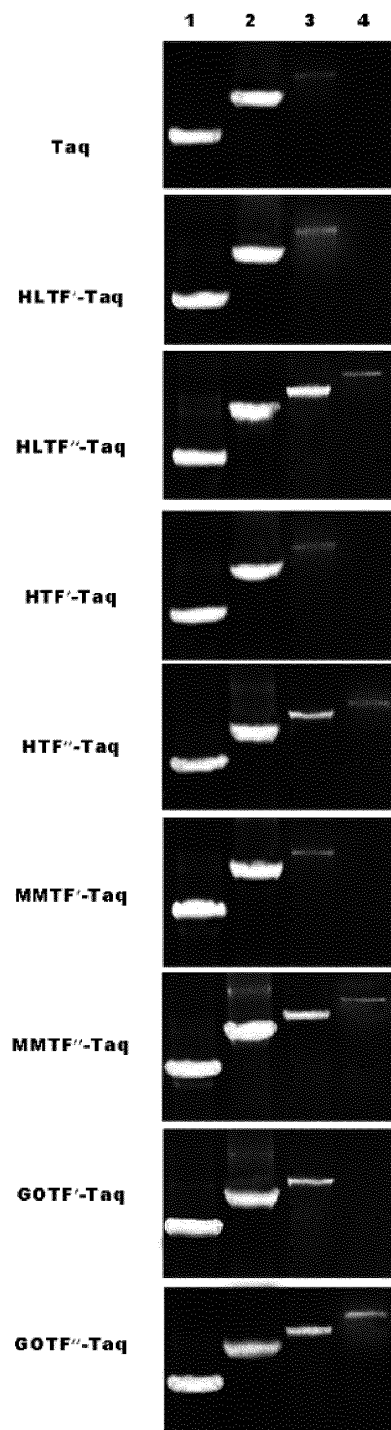


FIG. 2

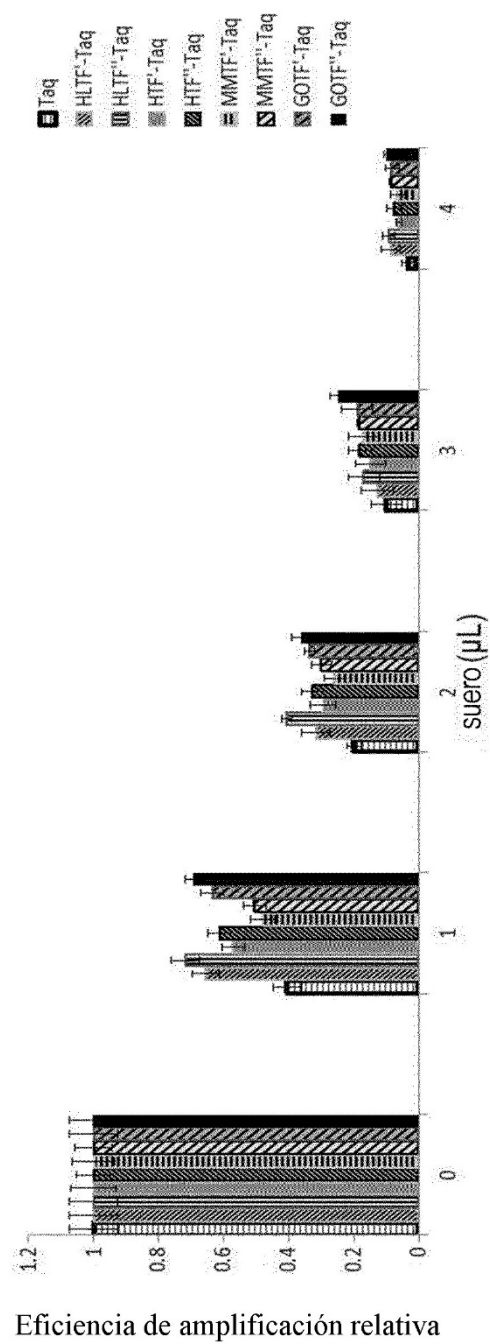


FIG. 3