

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 629**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6844** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2010** **E 16195596 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 3150722**

54 Título: **Producción de ADN lineal cerrado**

30 Prioridad:

**30.01.2009 GB 0901593**

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

**23.03.2020**

73 Titular/es:

**TOUHLIGHT IP LIMITED (100.0%)  
40 Queen Anne Street  
London W1G 9EL, GB**

72 Inventor/es:

**HILL, VANESSA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 749 629 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

Producción de ADN lineal cerrado

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso sin células *in vitro* para la producción de ácido desoxirribonucleico (ADN) lineal cerrado.

10 **Antecedentes de la invención**

Los procesos basados en células tradicionales para amplificación de ADN en grandes cantidades son costosos. Por ejemplo, el uso de bacterias requiere su crecimiento en grandes volúmenes en fermentadores caros que se requiere que se mantengan en un estado estéril para evitar la contaminación del cultivo. Las bacterias también necesitan 15 lisarse para liberar el ADN amplificado y es necesario que el ADN se limpie y purifique de otros componentes bacterianos. En particular, cuando se producen vacunas de ADN y otros agentes de ADN terapéuticos, se requiere alta pureza para eliminar la presencia de endotoxinas que sean tóxicas para mamíferos.

Además de los problemas de costes, el uso de bacterias puede en muchos casos presentar dificultades con 20 respecto a la fidelidad del proceso de amplificación. En el complejo ambiente bioquímico de la célula bacteriana, es difícil controlar la calidad y rendimientos del producto de ADN deseado. Las bacterias pueden alterar ocasionalmente el gen requerido clonado dentro del ADN amplificado y hacerlo inservible para el fin requerido. Los acontecimientos de recombinación también pueden conducir a problemas en la producción fiel de un ADN de interés. Los procesos enzimáticos sin células para amplificación de ADN evitan el requisito de usar una célula hospedadora y por lo tanto 25 son ventajosos.

Por ejemplo, la fabricación de casetes de ADN medicinales se basa casi exclusivamente en su inserción en plásmidos bacterianos y su amplificación en procesos de fermentación bacterianos.

Este proceso del estado de la técnica actual limita las oportunidades de mejorar la fabricación de tales medicinas de 30 ADN de varias maneras. Además, el producto plasmídico es esencialmente una molécula de ADN en bruto porque contiene secuencias de nucleótidos no requeridas para su función medicinal. En consecuencia, en el campo de la producción de productos de ADN, tales como medicina de ADN, se necesita proporcionar métodos mejorados para la amplificación de ADN en grandes cantidades. En particular, existe la necesidad de proporcionar métodos 35 mejorados para amplificación de formas específicas de ADN, tales como ADN lineales cerrados. Las moléculas de ADN lineal cerrado tienen utilidad particular para aplicaciones terapéuticas, ya que tienen estabilidad mejorada y seguridad frente a otras formas de ADN.

Deneke *et al* (PNAS (2000) 97: 7721-7726) describe la actividad de escisión-unión de protelomerasa de fago N15 de 40 *E. coli*.

Deneke *et al* (JBC (2002) 277: 10410-10419) describe requisitos de diana para reconocimiento y procesamiento por la protelomerasa.

Rodriguez (J. Mol Med (2004) 82: 500-509) describe vectores de ADN no virales para inmunización y diseño de 45 terapia y métodos para su obtención.

Heinrich *et al* (J. Mol Med (2002) 80: 648-654) describe que el mini ADN cerrado lineal generado por la enzima de 50 escisión-unión procariota TelN es funcional en células de mamífero.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para producción sin células *in vitro* de ADN cerrado covalentemente 55 lineal (ADN lineal cerrado). El proceso permite la producción potenciada de ADN cerrado covalentemente lineal en comparación con metodologías actuales que implican procesos celulares y amplificación dentro de plásmidos. Esto aumenta significativamente la productividad del proceso reduciendo a la vez el coste de purificación del producto.

De acuerdo con la presente invención, la producción de ADN cerrado covalentemente lineal a partir de un molde de 60 ADN se lleva a cabo de forma enzimática en ausencia de una célula hospedadora. El ADN molde comprende más de una secuencia diana de protelomerasa. El ADN molde se pone en contacto con al menos una ADN polimerasa en presencia de uno o más cebadores en condiciones que promuevan la amplificación del molde. El ADN amplificado a partir del molde se pone en contacto con al menos una protelomerasa en condiciones que promueven la producción de ADN lineal cerrado.

En consecuencia, la presente invención proporciona un proceso sin células *in vitro* para producción de un ácido 65 desoxirribonucleico (ADN) lineal cerrado que comprende:

- (a) amplificar un molde de ADN que comprende más de una secuencia diana de protelomerasa,  
 (b) poner en contacto ADN amplificado producido en (a) con al menos una protelomerasa en condiciones que promuevan la producción de ADN lineal cerrado.

5 La divulgación se refiere además a un kit que proporciona componentes necesarios en el proceso de la invención. Por tanto, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos una ADN polimerasa y al menos una protelomerasa e instrucciones para su uso en un proceso de la invención.

## 10 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Replicación de ADN cerrado covalentemente lineal en bacteriófagos y el papel de la protelomerasa. A. Representación de ADN cerrado covalentemente lineal bacteriófago extracromosómico. \* = Centro de la secuencia palindrómica del telómero. La secuencia R es una repetición palindrómica invertida de la secuencia L. B. Replicación de ADN de bacteriófago en hospedador: la burbuja indica replicación de cadena de ADN. La síntesis de la cadena complementaria de R y L conduce a secuencias RL bicatenarias idénticas. C. Productos formados por acción de la protelomerasa. La protelomerasa se une a la secuencia RL y corta y liga las hebras opuestas en el punto central de la secuencia palindrómica para reformar los telómeros y completar la replicación del ADN cerrado covalentemente lineal original.

Figura 2: La acción de la protelomerasa del fago N15 de *Escherichia coli* (TelN) en ADN bicatenario circular que contiene su sitio diana, telRL. TelRL es un palíndromo invertido con ramas derecha (telR) e izquierda (telL) de 28 pb indicadas por las flechas. Las secuencias subrayadas indican imperfecciones en el palíndromo telRL. Se requiere un palíndromo invertido perfecto de 22 pb central TelO para la unión de la enzima, TelN. TelN escinde esta secuencia de 22 pb en su punto medio y une los extremos de las hebras complementarias para formar extremos cerrados covalentemente.

Figura 3: Comparación de secuencias diana de protelomerasa halladas en diversos organismos. Las secuencias dentro de cajas muestran el alcance de la secuencia palindrómica perfecta o imperfecta. El subrayado muestra imperfecciones en el palíndromo. Las secuencias de pares de bases destacadas son comunes para todas las secuencias diana de protelomerasa lo que indica su importancia para la unión y acción de protelomerasa. A. fago N15 de *Escherichia coli*. B. Fago Phi KO2 de *Klebsiella*. C. Fago Py54 de *Yersinia*. Fago Phi HAP de *Halomonas*. E. Fago VP882 de *Vibrio*. Plásmido lpB31.16 de *Borrelia burgdorferi*. Las secuencias dentro de cajas muestran el alcance de las secuencias palindrómicas perfectas o imperfectas para cada bacteriófago. G. Se muestra la secuencia palindrómica inversa consenso para unión y acción de protelomerasa de bacteriófago. Esta es una secuencia repetida invertida perfecta de 22 pares de bases (11 pares de bases a cada lado del sitio de corte). La secuencia consenso deriva de los restos destacados conservados mostrados para A-E. Se indican pares de bases conservados y sus posiciones en el palíndromo. Las líneas discontinuas indican flexibilidad en la composición de secuencia, es decir cuando las bases pueden ser N (A, T, C o G).

Figura 4: Proceso específico para amplificación *in vitro* de un ADN cerrado covalentemente bicatenario lineal usando una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena RCA en combinación con protelomerasa TelN. A. Molde de ADN lineal cerrado. R y L representan las secuencias de ADN de las ramas derecha e izquierda de la secuencia de unión de protelomerasa TelN. B. Desnaturalización del molde de partida para formar ADN monocatenario circular. C. Unión de cebadores. D-E. Amplificación por círculo rodante a partir de molde de ADN monocatenario por una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena RCA. F. Formación de ADN bicatenario concatémico largo que comprende unidades individuales de molde amplificado separadas por secuencias de unión de protelomerasa (RL). G. Contacto con protelomerasa TelN específica de la secuencia RL. La protelomerasa escinde el ADN concatémico en el sitio RL y liga hebras complementarias para producir copias amplificadas del molde de ADN cerrado covalentemente lineal original.

Figura 5: Escisión de casete de ADN que expresa el gen de interés a partir de una molécula de ADN bicatenaria larga para crear un casete de ADN lineal cerrado. A. Molécula de ADN bicatenaria lineal que contiene un casete de ADN que contiene el gen de interés flanqueado por secuencias diana de protelomerasa. B. Escisión del casete de ADN como una molécula de ADN cerrada covalentemente lineal.

Figura 6: Amplificación de ADN lineal cerrado y expresión del gen indicador para casete de expresión "en forma de hueso".

A. Confirmación de la escisión por TelN de concatémicos amplificados por RCA para formar ADN lineal cerrado por electroforesis en gel de agarosa. Los carriles 1 a 3 muestran pUC18 amplificado por RCA. Carril 1: 3 microlitros de pUC18 amplificado por RCA no digerido. Carril 2: 2 microlitros de pUC18 amplificado por RCA digerido con Pvu1. Carril 3: 2 microlitros de pUC18 amplificado por RCA tratado con TelN (control negativo). Los carriles 4 a 6 muestran pUC18 telRL amplificado por RCA. Carril 4: 3 microlitros de pUC18 telRL amplificado por RCA no digerido. Carril 5: 1 microlitro de pUC18 telRL amplificado por RCA digerido con Pvu1. Carril 6: 4 microlitros de pUC18 telRL amplificado por RCA tratado con TelN. Se indica el ADN lineal cerrado de 2,7 kb generado tras el tratamiento con TelN. Los carriles flanqueantes son marcadores del tamaño de ADN.

B. Análisis en Lab-On-A-Chip (LOC) que muestra la resistencia del ADN lineal cerrado a la desnaturalización térmica. Carril 1: marcador de tamaño de ADN. Carriles 2 y 3: 100 ng de PCR DOG. Carriles 4 y 5: 100 ng de PCR DOG desnaturalizado. Carriles 6 y 7: ADN "en forma de hueso"-100 ng de pGL DOG tratado con TelN.

Carriles 6 y 7: "ADN en forma de hueso" - 100 ng de pGL DOG tratado con TeIN y desnaturalizado.

C. Validación de la expresión de ADN lineal cerrado en células por transfección. Eje y: relación de Luciérnaga/*Renilla* media; eje x: construcciones de ADN lineal usadas en la transfección. PCR pGL: fragmento de PCR lineal abierto de pGL4.13 a través del gen luc. PCR DOG: fragmento de PCR lineal abierto amplificado a partir de pGL DOG usando cebadores que flanquean los sitios telRL. "doggy MP": ADN lineal cerrado de pGL DOG aislado a partir de ADN de mini-prep digerido con PvuI (para retirar ADN del vector contaminante) y escindido con TeIN. "doggy RCA": ADN lineal cerrado de pGL DOG amplificado por RCA digerido con PvuI y escindido con TeIN.

## 10 Descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ácido nucleico de una ADN polimerasa de bacteriófago phi29 de *Bacillus*.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de una ADN polimerasa de bacteriófago phi29 de *Bacillus* codificada por SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de una ADN polimerasa Deep Vent de *Pyrococcus* sp.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ácido nucleico de ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus*.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus* codificada por SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico de protelomerasa de fago phiHAP-1 de *Halomonas*.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de una protelomerasa de fago phiHAP-1 de *Halomonas* codificada por SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de ácido nucleico de una protelomerasa de fago PY54 de *Yersinia*.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de una protelomerasa de fago PY54 de *Yersinia* codificada por SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de ácido nucleico de una protelomerasa de fago phiKO2 de *Klebsiella*.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de una protelomerasa de fago phiKO2 de *Klebsiella* codificada por SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de ácido nucleico de una protelomerasa de fago VP882 de *Vibrio*.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de una protelomerasa de fago VP882 de *Vibrio* codificada por SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de ácido nucleico de una protelomerasa de bacteriófago N15 de *Escherichia coli* (telN) y secuencia de ácido nucleico de represor de inmunidad secundario (cA).

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de una protelomerasa de bacteriófago N15 de *Escherichia coli* (telN) codificada por SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 16 es una secuencia de ácido nucleico consenso para una repetición invertida perfecta presente en secuencias diana de protelomerasa de bacteriófago.

SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 22 bases de fago N15 de *E. coli* y fago phiKO2 de *Klebsiella*.

SEQ ID NO: 18 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 22 bases de fago PY54 de *Yersinia*.

SEQ ID NO: 19 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 22 bases de fago phiHAP-1 de *Halomonas*.

SEQ ID NO: 20 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 22 bases de fago VP882 de *Vibrio*.

SEQ ID NO: 21 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 14 bases de plásmido lpB31.16 de *Borrelia burgdorferi*.

SEQ ID NO: 22 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 24 bases de fago VP882 de *Vibrio*.

SEQ ID NO: 23 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 42 bases de fago PY54 de *Yersinia*.

SEQ ID NO: 24 es una secuencia de ácido nucleico de repetición invertida perfecta de 90 bases de fago phiHAP-1 de *Halomonas*.

SEQ ID NO: 25 es una secuencia de ácido nucleico de fago N15 de *E. coli* que comprende una secuencia diana de protelomerasa.

SEQ ID NO: 26 es una secuencia de ácido nucleico de fago phiKO2 de *Klebsiella* que comprende una secuencia diana de protelomerasa.

SEQ ID NO: 27 es una secuencia de ácido nucleico de fago PY54 de *Yersinia* que comprende una secuencia diana de protelomerasa.

SEQ ID NO: 28 es una secuencia de ácido nucleico de fago VP882 de *Vibrio* que comprende una secuencia diana de protelomerasa.

SEQ ID NO: 29 es una secuencia de ácido nucleico de plásmido lpB31.16 de *Borrelia burgdorferi* que comprende una secuencia diana de protelomerasa.

SEQ ID NO: 30 es un cebador oligonucleotídico modificado usado en la amplificación de TeIN.

SEQ ID NO: 31 es un cebador oligonucleotídico modificado usado en la amplificación de TeIN.

SEQ ID NO: 32 es un oligonucleotídico sintético que contiene el sitio de reconocimiento de TeIN telRL.

SEQ ID NO: 33 es un oligonucleotídico sintético que contiene el sitio de reconocimiento de TelN telRL.  
 SEQ ID NO: 34 es una secuencia de cebador usada en la amplificación de PCR DOG.  
 SEQ ID NO: 35 es una secuencia de cebador usada en la amplificación de PCR DOG.

## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a procesos para la producción de ADN cerrado covalentemente bicatenario lineal, es decir moléculas de ADN lineal cerrado. Las moléculas de ADN lineal cerrado típicamente comprenden extremos cerrados covalentemente también descritos como bucles en horquilla, en los que no está presente formación de pares de bases entre cadenas de ADN complementarias. Los bucles en horquilla unen los extremos de cadenas de ADN complementarias. Las estructuras de este tipo típicamente se forman en los extremos teloméricos de cromosomas para proteger contra la pérdida o daño de ADN cromosómico secuestrando los nucleótidos terminales en una estructura cerrada. En ejemplos de moléculas de ADN lineal cerrado descritas en este documento, los bucles en horquilla flanquean cadenas de ADN complementarias con bases emparejadas, formando una estructura "en forma de hueso" (como se muestra en la Figura 1).

Los procesos de la presente invención posibilitan la producción de alto rendimiento de moléculas de ADN lineal cerrado incorporando una única etapa de procesamiento que convierte ADN amplificado en ADN lineal cerrado. Además, los procesos de la presente invención se llevan a cabo en un ambiente sin células *in vitro*, y como tales no están limitados al uso de moldes de ADN que tengan secuencias ajenas necesarias para la propagación bacteriana. Como se describe posteriormente, el proceso de la invención puede por lo tanto usarse para producir moléculas de ADN lineal cerrado que carecen de secuencias de vectores problemáticas y son particularmente adecuadas para usos terapéuticos.

Las moléculas de ADN cerrado tienen utilidad particular como agentes terapéuticos es decir medicinas de ADN que pueden usarse para expresar un producto génico *in vivo*. Esto se debe a que su estructura cerrada covalentemente evita el ataque por enzimas tales como exonucleasas, lo que conduce a estabilidad y longevidad potenciada de la expresión génica en comparación con moléculas de ADN "abiertas" con extremos de ADN expuestos. Se ha demostrado que los casetes de extremos abiertos bicatenarios lineales son ineficaces con respecto a expresión génica cuando se introducen en el tejido hospedador. Esto se ha atribuido a la inestabilidad de los casetes debido a la acción de exonucleasas en el espacio extracelular.

El secuestro de los extremos de ADN dentro de estructuras cerradas covalentemente también tiene otras ventajas. Se evita que los extremos de ADN se integren con el ADN genómico y por lo tanto las moléculas de ADN lineal cerrado tienen mejor seguridad. Por lo tanto, la estructura lineal cerrada evita la concatemerización de moléculas de ADN dentro de células hospedadoras y por lo tanto los niveles de expresión del producto génico pueden regularse de una manera más sensible. La presente invención proporciona un proceso sin células *in vitro* para la producción de moléculas de ADN lineal cerrado que comprende amplificación de ADN dirigida por molde, y procesamiento específico de ADN amplificado por protelomerasa.

Típicamente, el proceso de la invención puede usarse para producción de ADN para expresión *in vitro* en una célula hospedadora, particularmente en vacunas de ADN. Las vacunas de ADN típicamente codifican una forma modificada del ADN de un organismo infeccioso. Se administran vacunas de ADN a un sujeto en el que expresan después la proteína seleccionada del organismo infeccioso, iniciando una respuesta inmune contra esa proteína que es típicamente protectora. Las vacunas de ADN también pueden codificar un antígeno tumoral en un enfoque de inmunoterapia de cáncer.

Una vacuna de ADN puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno para el tratamiento o prevención de varias afecciones incluyendo pero sin limitación cáncer, alergias, toxicidad e infección por un patógeno tal como, pero sin limitación, hongos, virus, incluyendo Virus del Papiloma Humano (VPH), VIH, VHS2/VHS1, virus de la Gripe (tipos A, B y C), virus de la Polio, virus de RSV, Rinovirus, Rotavirus, virus de la Hepatitis A, Grupo de Virus Norwalk, Enterovirus, Astrovirus, virus del Sarampión, virus Paragripal, virus de las Paperas, virus de Varicela-Zoster, Citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, Adenovirus, virus de la Rubéola, virus de tipo I de Linfoma de linfocitos T Humano (HTLV-I), virus de la Hepatitis B (VHB), virus de la Hepatitis C (VHC), virus de la Hepatitis D, virus de la Viruela, Marburg y Ébola; bacterias incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Haemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, Campilobacteriosis, *Moraxella catarrhalis*, Donovanosis y Actinomicosis; patógenos fúngicos incluyendo Candidiasis y Aspergilosis; patógenos parasitarios incluyendo Tenia, Duelas, Nemátodos, Amebiasis, Giardiasis, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, Tricomoniasis y Triquinosis.

Las vacunas de ADN pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique un antígeno de un miembro de los adenoviridae (incluyendo por ejemplo un adenovirus humano), herpesviridae (incluyendo por ejemplo VHS-1, VHS-2, EBV, CMV y VZV), papovaviridae (incluyendo por ejemplo VPH), poxviridae (incluyendo por ejemplo viruela y vaccinia), parvoviridae (incluyendo por ejemplo parvovirus B19), reoviridae (incluyendo por ejemplo

un rotavirus), coronaviridae (incluyendo por ejemplo SARS), flaviviridae (incluyendo por ejemplo fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, dengue, hepatitis C y encefalitis transmitida por garrapatas), picornaviridae (incluyendo polio, rinovirus y hepatitis A), togaviridae (incluyendo por ejemplo virus de la rubéola), filoviridae (incluyendo por ejemplo Marburg y Ébola), paramixoviridae (incluyendo por ejemplo un virus paragripal, virus sincitial respiratorio, paperas y sarampión), rhabdoviridae (incluyendo por ejemplo virus de la rabia), bunyaviridae (incluyendo por ejemplo virus Hantaan), ortomixoviridae (incluyendo por ejemplo virus de la gripe A, B y C), retroviridae (incluyendo por ejemplo VIH y HTLV) y hepadnaviridae (incluyendo por ejemplo hepatitis B).

El antígeno puede ser de un patógeno responsable de una enfermedad veterinaria y en particular puede ser de un patógeno viral, incluyendo, por ejemplo, un reovirus (tal como virus de la peste equina o lengua azul) y virus del Herpes (incluyendo herpes equino). El antígeno puede ser uno del virus de la glosopeda, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, virus dengue, SARS, virus del Nilo Occidental y virus Hantaan. El antígeno puede ser de un virus de la inmunodeficiencia y puede ser, por ejemplo, de VIS o un virus de la inmunodeficiencia felina.

Las vacunas de ADN producidas por el proceso de la invención también pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique antígenos tumorales. Los ejemplos de antígenos asociados a tumores incluyen, pero sin limitación, antígenos de cáncer testicular tales como miembros de la familia MAGE (MAGE 1, 2, 3 etc.), NY-ESO-1 y SSX-2, antígenos de diferenciación tales como tirosinasa, gp100, PSA, Her-2 y CEA, autoantígenos mutados y antígenos tumorales virales tales como E6 y/o E7 de tipos de VPH oncogénico. Los ejemplos adicionales de antígenos tumorales particulares incluyen MART-1, Melan-A, p97, beta-HCG, GalNAc, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-4, MAGE-12, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC18, CEA, DDC, P1A, EpCam, antígeno de melanoma gp75, Hker 8, antígeno de melanoma de alto peso molecular, K19, Tyr1, Tyr2, miembros de la familia del gen pMel 17, c-Met, PSM (antígeno de mucina de próstata), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), proteína secretora de próstata, alfa-fetoproteína, antígeno CA125, CA19.9, TAG-72, BRCA-1 y BRCA-2.

Además, el proceso de la invención puede producir otros tipos de moléculas de ADN terapéuticas, por ejemplo las usadas en terapia génica. Por ejemplo, dichas moléculas de ADN pueden usarse para expresar un gen funcional en el que un sujeto tiene un trastorno genético provocado por una versión disfuncional de ese gen. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen distrofia muscular de Duchenne, fibrosis quística, Enfermedad de Gaucher y deficiencia de adenosina desaminasa (ADA). Otras enfermedades en las que la terapia génica puede ser útil incluyen enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, crónicas e infecciosas, incluyendo trastornos tales como SIDA, cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades cardiovasculares, hipercolesterolemia, diversos trastornos sanguíneos incluyendo diversas anemias, talasemia y hemofilia, y enfisema. Para el tratamiento de tumores sólidos, pueden expresarse genes supresores de tumores tales como p53, genes que codifican secuencias de ARNm que son antisentido para transformar oncogenes, péptidos antineoplásicos tales como factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citocinas, o mutantes negativos transdominantes de oncogenes transformantes.

También se contemplan otros tipos de moléculas de ADN terapéuticas para producción por el proceso de la invención. Por ejemplo, pueden producirse moléculas de ADN que se transcriben en una forma de ARN activa, por ejemplo un ARN de interferencia pequeño (ARNip) de acuerdo con el proceso de la invención.

En realizaciones dirigidas a la producción de moléculas de ADN que tengan utilidad terapéutica, el molde de ADN comprenderá típicamente un casete de expresión que comprende uno o más elementos potenciadores o promotores y un gen u otra secuencia codificante que codifica un ARNm o proteína de interés. En realizaciones particulares dirigidas a la generación de moléculas de vacuna de ADN o moléculas de ADN para terapia génica, el molde de ADN comprende un casete de expresión que consiste en un promotor eucariota unido operativamente a una secuencia que codifica una proteína de interés, y opcionalmente un potenciador y/o una secuencia de terminación de la transcripción eucariota. Típicamente, el molde de ADN puede estar en forma de un vector usado habitualmente para alojar un gen, por ejemplo un elemento genético extracromosómico tal como un plásmido.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que inicia y regula la transcripción de un polinucleótido. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (en los que se induce expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente con el promotor mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (en los que se reprime la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente con el promotor mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y promotores constitutivos. Se pretende que la expresión "promotor" o "elemento de control" incluya regiones promotoras de longitud completa y segmentos funcionales (por ejemplo, controles de transcripción o traducción) de estas regiones.

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos de este modo se configuran para realizar su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado unido operativamente con una secuencia de ácido nucleico es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia cuando están presentes las enzimas apropiadas. No es necesario que el promotor sea contiguo a la secuencia, siempre que actúe para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico y la secuencia promotora aún puede considerarse "unida operativamente" a la secuencia codificante. Por lo tanto, la expresión "unido operativamente" pretende abarcar cualquier separación u orientación del elemento promotor y la secuencia de ADN de interés que

permita el inicio de la transcripción de la secuencia de ADN de interés tras el reconocimiento del elemento promotor por un complejo de transcripción.

De acuerdo con la presente invención, se generan moléculas de ADN lineal cerrado mediante la acción de protelomerasa en ADN amplificado a partir de un molde de ADN que comprende más de una secuencia diana de protelomerasa. Una secuencia diana de protelomerasa es cualquier secuencia de ADN cuya presencia en un molde de ADN posibilite su conversión en un ADN lineal cerrado por la actividad enzimática de la protelomerasa. En otras palabras, se requiere la secuencia diana de protelomerasa para la escisión y religación de ADN bicatenario por protelomerasa para formar ADN lineal cerrado covalentemente.

Típicamente, una secuencia diana de protelomerasa comprende cualquier secuencia palindrómica perfecta es decir cualquier secuencia de ADN bicatenaria que tenga simetría rotacional doble, también descrita en este documento como una repetición invertida perfecta. Como se muestra en la Figura 3, las secuencias diana de protelomerasa de diversos bacteriófagos mesófilos, y un plásmido bacteriano comparten todos la características común de comprender una repetición invertida perfecta. La longitud de la repetición invertida perfecta difiere dependiendo del organismo específico. En *Borrelia burgdorferi*, la repetición invertida perfecta es de 14 pares de bases de longitud. En diversos bacteriófagos mesófilos, la repetición invertida perfecta es de 22 pares de bases de longitud o mayor. Además, en algunos casos, por ejemplo N15 de *E. coli*, el palíndromo invertido perfecto central está flanqueado por secuencias repetidas invertidas, es decir que forman parte de un palíndromo invertido imperfecto mayor (véase Figuras 2 y 3; las frases subrayadas indican donde se interrumpe la simetría de las repeticiones invertidas).

Una secuencia diana de protelomerasa como se usa en la invención comprende preferentemente una secuencia palindrómica bicatenaria (repetición invertida perfecta) de al menos 14 pares de bases de longitud. Las secuencias repetidas invertidas perfectas preferidas incluyen las secuencias de SEQ ID NO: 16 a 21 y variantes de las mismas. SEQ ID NO: 16 (NCATNNTANNCGNNTANNATGN) es una secuencia consenso de 22 bases para una repetición invertida perfecta de bacteriófago mesófilo. Como se muestra en la Figura 3, los pares de bases de la repetición invertida perfecta se conservan en ciertas posiciones entre diferentes bacteriófagos, mientras que es posible flexibilidad de la secuencia en otras posiciones. Por lo tanto, SEQ ID NO: 16 es una secuencia consenso mínima para una secuencia de repetición invertida perfecta para su uso con una protelomerasa de bacteriófago en el proceso de la presente invención.

Dentro del consenso definido por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 (CCATTATACGCGCGTATAATGG) es una secuencia de repetición invertida perfecta particularmente preferida para su uso con el fago N15 de *E. coli* (SEQ ID NO: 15), y protelomerasas de fago Phi KO2 de *Klebsiella* (SEQ ID NO: 11). Además dentro del consenso definido por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 a 20:

SEQ ID NO: 18 (GCATACTACGCGCGTAGTATGC),  
 SEQ ID NO: 19 (CCATACTATACGTATAGTATGG),  
 SEQ ID NO: 20 (GCATACTATACGTATAGTATGC),

son secuencias de repetición invertida perfecta particularmente preferidas para su uso respectivamente con protelomerasas de fago PY54 de *Yersinia* (SEQ ID NO: 9), fago phiHAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID NO: 7) y fago VP882 de *Vibrio* (SEQ ID NO: 13). SEQ ID NO: 21 (ATTATATATATAAT) es una secuencia de repetición invertida perfecta particularmente preferida para su uso con una protelomerasa de *Borrelia burgdorferi*. Esta secuencia de repetición invertida perfecta es de un plásmido cerrado covalentemente lineal, lpB31.16 comprendido en *Borrelia burgdorferi*. Esta secuencia de 14 bases es más corta que la repetición invertida perfecta consenso de 22 pb para bacteriófagos (SEQ ID NO: 16), lo que indica que las protelomerasas bacterianas pueden diferir en requisitos de secuencia diana específicos para protelomerasas de bacteriófagos. Sin embargo, todas las secuencias diana de protelomerasa comparten el motivo estructural común de una repetición invertida perfecta.

La secuencia de repetición invertida perfecta puede ser mayor de 22 pb de longitud dependiendo de los requisitos de la protelomerasa específica usada en el proceso de la invención. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la repetición invertida perfecta puede ser de al menos 30, al menos 40, al menos 60, al menos 80 o al menos 100 pares de bases de longitud. Los ejemplos de dichas secuencias de repetición invertida perfecta incluyen SEQ ID NO: 22 a 24 y variantes de las mismas.

SEQ ID NO: 22 (GGCATAC TATACGTATAGTATGCC)  
 SEQ ID NO: 23 (ACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAMTAGGT)  
 SEQ ID NO: 24 (CCTATATTGGGCCACCTATGTATGCACAGTTCGCCACTACTATACGT  
 ATAGTATGGCGAACTGTGCATACATAGGTGGCCCAATATAGG)

Se prefieren particularmente SEQ ID NO: 22 a 24 y variantes de las mismas para su uso respectivamente con protelomerasas de fago VP882 de *Vibrio* (SEQ ID NO: 13), fago PY54 de *Yersinia* (SEQ ID NO: 9) y fago phi HAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID NO: 7).

La repetición invertida perfecta puede estar flanqueada por secuencias de repetición invertida adicionales. Las

repeticiones invertidas flanqueantes pueden ser repeticiones perfectas o imperfectas, es decir pueden ser completamente simétricas o parcialmente simétricas. Las repeticiones invertidas flanqueantes pueden ser contiguas a o no contiguas al palíndromo central. La secuencia diana de protelomerasa puede comprender una secuencia de repetición invertida imperfecta que comprenda una secuencia de repetición invertida perfecta de al menos 14 pares de bases de longitud. Un ejemplo es SEQ ID NO: 29. La secuencia de repetición invertida imperfecta puede comprender una secuencia de repetición invertida perfecta de al menos 22 pares de bases de longitud. Un ejemplo es SEQ ID NO: 25.

Las secuencias diana de protelomerasa particularmente preferidas comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 25 a 29 o variantes de las mismas.

SEQ ID NO: 25: (TATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATTG TGTGCTGATA)

SEQ ID NO: 26 (ATGCGCGCATCCATTATACGCGCGTATAATGGCGATAATACA)

SEQ ID NO: 27 (TAGTCACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGG TTAGTG)

SEQ ID NO: 28: (GGGATCCCGTTCCATACATACATGTATCCATGTGGCATACTATACG TATAGTATGCCGATGTTACATATGGTATCATTCCGGGATCCCGTT)

SEQ ID NO: 29 (TACTAAATAAATATTATATATATAATTTTTTATTAGTA)

Las secuencias de SEQ ID NO: 25 a 29 comprenden secuencias de repetición invertida perfecta como se ha descrito anteriormente, y adicionalmente comprenden secuencias flanqueantes de los organismos relevantes. Se prefiere una secuencia diana de protelomerasa que comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 25 o una variante de la misma para su uso en combinación con protelomerasa TelN de N15 de *E. coli* de SEQ ID NO: 15 y variantes de la misma. Se prefiere una secuencia diana de protelomerasa que comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 26 o una variante de la misma para su uso en combinación con protelomerasa de fago Phi KO2 de *Klebsiella* de SEQ ID NO: 11 y variantes de la misma. Se prefiere una secuencia diana de protelomerasa que comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 27 o una variante de la misma para su uso en combinación con protelomerasa de fago PY54 de *Yersinia* de SEQ ID NO: 9 y variantes de la misma. Se prefiere una secuencia diana de protelomerasa que comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 28 o una variante de la misma para su uso en combinación con protelomerasa de fago VP882 de *Vibrio* de SEQ ID NO: 13 y variantes de la misma. Una secuencia diana de protelomerasa que comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 29 o una variante de la misma se prefiere para su uso en combinación con una protelomerasa de *Borrelia burgdorferi*.

Las variantes de cualquiera de las secuencias diana de protelomerasa o palíndromo descritas anteriormente incluyen homólogos o mutantes de las mismas. Los mutantes incluyen truncamientos, sustituciones o deleciones con respecto a la secuencia nativa. Una secuencia variante es cualquier secuencia cuya presencia en el molde de ADN posibilite su conversión a un ADN lineal cerrado por la actividad enzimática de protelomerasa. Esto puede determinarse fácilmente mediante el uso de un ensayo apropiado para la formación de ADN lineal cerrado. Puede usarse cualquier ensayo adecuado descrito en la técnica. Se describe un ejemplo de un ensayo adecuado en Deneke *et al*, PNAS (2000) 97, 7721-7726. Preferentemente, la variante posibilita unión y actividad de protelomerasa que es comparable a la observada con la secuencia nativa. Los ejemplos de variantes preferidas de secuencias palindrómicas descritas en este documento incluyen secuencias palindrómicas truncadas que preservan la estructura de repetición perfecta, y siguen siendo capaces de permitir la formación de ADN lineal cerrado. Sin embargo, las secuencias diana de protelomerasa variantes pueden modificarse de modo que ya no conserven un palíndromo perfecto, siempre que sean capaces de actuar como sustratos para actividad protelomerasa.

Debería entenderse que el experto en la materia sería fácilmente capaz de identificar secuencias diana de protelomerasa adecuadas para su uso en la invención basándose en los principios estructurales descritos anteriormente. Pueden explorarse secuencias diana de protelomerasa candidatas con respecto a su capacidad para promover la formación de ADN lineal cerrado usando los ensayos descritos anteriormente.

El molde de ADN puede comprender más de una secuencia diana de protelomerasa, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, diez o más secuencias diana de protelomerasa. El uso de múltiples secuencias diana de protelomerasa puede posibilitar la escisión de ADN lineales cerrados cortos que comprenden secuencias de interés de una molécula de ADN mayor. En particular, una o más secuencias de interés en el molde de ADN pueden estar flanqueadas en cada lado (es decir 5' y 3') por una secuencia diana de protelomerasa. Las dos secuencias de protelomerasa flanqueantes pueden mediar después en la escisión de cada secuencia corta de interés a partir del ADN amplificado como un ADN lineal cerrado, sometido a la acción de la protelomerasa (como se muestra en la Figura 5). El molde de ADN puede comprender una o más secuencias de interés (preferentemente casetes de expresión) flanqueadas en cada lado por secuencias diana de protelomerasa. El molde de ADN puede comprender dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de interés flanqueadas por secuencias diana de protelomerasa como se ha descrito anteriormente.

En una realización preferida, el proceso de la invención usa un molde de ADN que comprende un casete de

expresión flanqueado en cada lado por una secuencia diana de protelomerasa. El casete de expresión comprende preferentemente un promotor eucariota unido a una secuencia codificante de interés, y opcionalmente una secuencia de terminación de la transcripción eucariota. En esta realización, después de la amplificación del ADN molde, y puesta en contacto con protelomerasa de acuerdo con la invención, el casete de expresión se libera del molde amplificado como un ADN lineal cerrado. Las secuencias innecesarias en el ADN molde se suprimen de forma conjunta como resultado del producto.

Dichas secuencias innecesarias o externas (también descritas como secuencias bacterianas o de vector) pueden incluir orígenes de replicación bacterianos, marcadores de selección bacterianos (por ejemplo genes de resistencia a antibióticos) y dinucleótidos de CpG no metilados. La delección de dicha secuencia crea un casete de expresión "mínima" que no contiene material genético externo. Además, las secuencias bacterianas del tipo descrito anteriormente pueden ser problemáticas en algunos enfoques terapéuticos. Por ejemplo, dentro de una célula de mamífero, el ADN bacteriano/plasmídico puede provocar que el gen clonado se desactive de modo que no pueda conseguirse la expresión mantenida de la proteína de interés. Además, los genes de resistencia a antibiótico usados en la propagación bacteriana pueden provocar un riesgo para la salud humana. Además, el ADN de vector/plásmido bacteriano puede desencadenar una respuesta inmune no específica no deseada. Una característica específica de las secuencias de ADN bacterianas, la presencia de dinucleótidos de citosina-guanina no metilados, típicamente conocidos como motivos de CpG, también puede conducir a respuestas inmunes no deseadas.

En algunas realizaciones, en particular cuando el producto de ADN lineal cerrado es una vacuna de ADN, pueden conservarse motivos de CpG en la secuencia del producto. Esto se debe a que pueden tener un efecto adyuvante beneficioso en la respuesta inmune a la proteína codificada.

La divulgación proporciona un proceso *in vitro* para la producción de un ADN de casete de expresión lineal cerrado. Este proceso comprende a) poner en contacto un molde de ADN que comprende al menos un casete de expresión flanqueado en uno de los lados por una secuencia diana de protelomerasa con al menos una ADN polimerasa en presencia de uno o más cebadores en condiciones que promuevan la amplificación de dicho molde; y b) poner en contacto ADN amplificado producido en a) con al menos una protelomerasa en condiciones que promuevan la formación de un ADN de casete de expresión lineal cerrado. El producto de ADN de casete de expresión lineal cerrado puede comprender, consistir o consistir esencialmente en un promotor eucariota unido operativamente a una secuencia codificante de interés, y opcionalmente una secuencia de terminación de la transcripción eucariota. El producto de ADN de casete de expresión lineal cerrado puede carecer adicionalmente de una o más secuencias bacterianas o de vector, típicamente seleccionadas del grupo que consiste en: (i) orígenes bacterianos de replicación; (ii) marcadores de selección bacterianos (típicamente genes de resistencia a antibióticos) y (iii) motivos CpG no metilados.

Como se ha descrito anteriormente, puede amplificarse cualquier molde de ADN que comprenda al menos una secuencia diana de protelomerasa de acuerdo con el proceso de la divulgación. Por lo tanto, aunque se prefiere la producción de vacunas de ADN y otras moléculas de ADN terapéuticas, el proceso de la invención puede usarse para producir cualquier tipo de ADN lineal cerrado. El molde de ADN puede ser un ADN bicatenario (bc) o monocatenario (mc). Un molde de ADN bicatenario puede ser un ADN bicatenario circular abierto, un ADN bicatenario circular cerrado, un ADN bicatenario lineal abierto o un ADN bicatenario lineal cerrado. Preferentemente, el molde es un ADN bicatenario circular cerrado. Se prefieren particularmente moldes de ADNbc circular cerrado para su uso con ADN polimerasa de RCA. Un molde de ADNbc circular puede estar en forma de un plásmido u otro vector típicamente usado para alojar un gen para preparación bacteriana. Por lo tanto, el proceso de la invención puede usarse para amplificar cualquier plásmido disponible en el mercado u otro vector, tal como una medicina de ADN disponible en el mercado, y después convertir el ADN de vector amplificado en ADN lineal cerrado.

Puede usarse un ADNbc circular abierto como un molde en el que la ADN polimerasa es una polimerasa de desplazamiento de cadena que puede iniciar la amplificación a partir de una cadena de ADN con muesca. En esta realización, el molde puede incubarse previamente con una o más enzimas que cortan una cadena de ADN en el molde en uno o más sitios. También puede usarse un ADNbc lineal cerrado como un molde. El molde de ADNbc lineal cerrado (material de partida) puede ser idéntico al producto de ADN lineal cerrado. Cuando se usa un ADN lineal cerrado como un molde, este puede incubarse en condiciones desnaturalizantes para formar un ADN circular monocatenario antes o durante las condiciones que promueve la amplificación del molde de ADN.

Como se ha descrito anteriormente, el molde de ADN típicamente comprende un casete de expresión como se ha descrito anteriormente, es decir que comprende, consiste en o consiste esencialmente en un promotor eucariota unido operativamente con una secuencia que codifica una proteína de interés y opcionalmente una secuencia de terminación de la transcripción eucariota. Opcionalmente el casete de expresión puede ser un casete de expresión mínimo como se ha definido anteriormente, es decir que carece de una o más secuencias bacterianas o de vector, típicamente seleccionadas del grupo que consiste en: (i) orígenes de replicación bacterianos; (ii) marcadores de selección bacterianos (típicamente genes de resistencia a antibióticos) y (iii) motivos CpG no metilados.

El molde de ADN puede proporcionarse en una cantidad suficiente para su uso en el proceso por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el molde de ADN puede producirse por la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR). Cuando el molde de ADN es un ADNbc, este puede proporcionarse para la etapa de amplificación como cadenas únicas desnaturalizadas mediante incubación previa a una temperatura de al menos 94 grados centígrados. Por lo tanto, el proceso de la descripción preferentemente comprende una etapa de desnaturalización de un molde de ADNbc para proporcionar ADN monocatenario. Como alternativa, el molde de ADNbc puede proporcionarse en forma bicatenaria. La parte completa o una seleccionada del molde de ADN puede amplificarse en la reacción.

El molde de ADN se pone en contacto con al menos una ADN polimerasa en condiciones que promuevan la amplificación de dicho molde. Puede usarse cualquier ADN polimerasa. Cualquier ADN polimerasa disponible en el mercado es adecuada para su uso en el proceso de la invención. Pueden usarse dos, tres, cuatro, cinco o más ADN polimerasas diferentes, por ejemplo una que proporcione una función de corrección de errores y una o más distintas que no. Pueden usarse ADN polimerasas que tengan mecanismos diferentes, por ejemplo polimerasas de tipo desplazamiento de cadena y ADN polimerasas que replican ADN por otros métodos. Un ejemplo adecuado de una ADN polimerasa que no tiene actividad de desplazamiento de cadena es ADN polimerasa T4.

Se prefiere que una ADN polimerasa sea altamente estable, de modo que su actividad no se reduzca sustancialmente por incubación prolongada en condiciones de procesamiento. Por lo tanto, la enzima preferentemente tiene una semivida larga en una serie de condiciones de procesamiento incluyendo pero sin limitación temperatura y pH. También se prefiere que una polimerasa de ADN tenga una o más características adecuadas para un proceso de fabricación. La ADN polimerasa preferentemente tiene alta fidelidad, por ejemplo por tener actividad de corrección de errores. Además, se prefiere que una ADN polimerasa presente alta capacidad de procesamiento, alta actividad de desplazamiento de cadena y una baja Km para dNTP y ADN. Una ADN polimerasa puede ser capaz de usar ADN circular y/o lineal como molde. La ADN polimerasa puede ser capaz de usar ADNbc o ADNmc como un molde. Se prefiere que una ADN polimerasa no presente actividad exonucleasa no específica.

El experto en la materia puede determinar si una ADN polimerasa presenta o no características como se han definido anteriormente por comparación con las propiedades presentadas por ADN polimerasas disponibles en el mercado, por ejemplo phi29, DeepVent<sup>®</sup> y ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus* (Bst), SEQ ID NO: 2, 3 y 5 respectivamente. La ADN polimerasa I Bst está disponible en el mercado de New England Biolabs, Inc. Cuando se hace referencia a una alta capacidad de procesamiento, esto indica típicamente el número medio de nucleótidos añadido por una enzima ADN polimerasa por asociación/disociación con el molde, es decir la longitud de la extensión de cebador obtenida a partir de un acontecimiento de asociación único.

Se prefieren polimerasas de tipo desplazamiento de cadena. Las polimerasas de tipo desplazamiento de cadena preferidas son Phi 29 (SEQ ID NO: 2), Deep Vent<sup>®</sup> (SEQ ID NO: 3) y ADN polimerasa I de Bst (SEQ ID NO: 5) o variantes de cualquiera de las mismas. Las variantes de SEQ ID NO: 2, 3 y 5 pueden ser como se define posteriormente en relación con enzimas protelomerasa. La expresión "desplazamiento de cadena" se usa en este documento para describir la capacidad de una ADN polimerasa para desplazar cadenas complementarias al encontrar una región de ADN bicatenario durante la síntesis de ADN. Debería entenderse que los métodos de amplificación de desplazamiento de cadena difieren de los métodos basados en PCR porque los ciclos de desnaturalización no son esenciales para la amplificación eficaz del ADN, ya que el ADN bicatenario no es un obstáculo para la síntesis continuada de nuevas cadenas de ADN. Por el contrario, los métodos de PCR requieren ciclos de desnaturalización (es decir elevación de la temperatura a 94 grados centígrados o mayor) durante el proceso de amplificación para fundir el ADN bicatenario y proporcionar nuevos moldes monocatenarios.

Una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena usada en el método de la invención preferentemente tiene una capacidad de procesamiento (longitud de extensión de cebadores) de al menos 20 kb, más preferentemente, al menos 30 kb, la menos 50 kb, o al menos 70 kb o mayor. En realizaciones particularmente preferidas, la ADN polimerasa de desplazamiento de cadena tiene una capacidad de procesamiento que es comparable a, o mayor que la ADN polimerasa phi29.

Un proceso de replicación por desplazamiento de cadena preferido es de amplificación por círculo rodante (RCA). El término RCA describe la capacidad de ADN polimerasa de tipo RCA (también denominadas en este documento polimerasas RCA) para progresar continuamente alrededor de una hebra de molde de ADN circular extendiendo a la vez un cebador hibridado. Esto conduce a la formación de productos monocatenarios lineales con múltiples repeticiones de ADN amplificado. Estos productos monocatenarios lineales actúan como la base para hibridación múltiple, extensión de cebadores y acontecimientos de desplazamiento de cadena, dando como resultado la formación de productos de ADN bicatenarios concatémicos, que comprenden de nuevo múltiples repeticiones de ADN amplificado. Existen por lo tanto múltiples copias de cada ADN de "unidad individual" amplificado en los productos de ADN bicatenarios concatémicos.

Se prefieren particularmente RCA polimerasas para su uso en el proceso de la presente invención. Los productos de procesos de replicación de desplazamiento de cadena de tipo RCA requieren convencionalmente procesamiento complejo para liberar ADN de unidades individuales. Provechosamente, de acuerdo con la presente invención, el uso de funciones catalíticas de la protelomerasa permite que se lleve a cabo este procesamiento en una única etapa. El uso de protelomerasa también genera directamente la estructura de ADN lineal cerrado deseada sin necesidad de etapas de procesamiento adicionales para formar moléculas que tengan esta estructura.

Para posibilitar la amplificación de acuerdo con la invención, se prefiere que el molde de ADN también se ponga en contacto con uno o más cebadores. Los cebadores pueden ser no específicos (es decir de secuencia aleatoria) o pueden ser específicos para una o más secuencias comprendidas dentro del molde de ADN. Se prefiere que los  
 5 cebadores sean de secuencia aleatoria para posibilitar el inicio no específico en cualquier sitio en el molde de ADN. Esto posibilita una alta eficacia de amplificación a través de múltiples reacciones de inicio a partir de cada hebra molde. Son ejemplos de cebadores aleatorios hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros o secuencias de mayor longitud, por ejemplo de 12, 15, 18, 20 o 30 nucleótidos de longitud. Un cebador aleatorio puede ser de 6 a 30, 8 a 30 o 12 a 30 nucleótidos de longitud. Se proporcionan típicamente cebadores aleatorios  
 10 como una mezcla de oligonucleótidos que son representativos de todas las combinaciones potenciales de por ejemplo hexámeros, heptámeros, octámeros o nonámeros en el molde de ADN.

En otras realizaciones, los cebadores son específicos. Esto significa que tienen una secuencia que es complementaria de una secuencia en el molde de ADN a partir del que se desea iniciar la amplificación. En esta  
 15 realización, puede usarse un par de cebadores para amplificar específicamente una parte del molde de ADN que es interna a los dos sitios de unión de cebadores. Los cebadores pueden no estar marcados, o pueden comprender uno o más marcadores, por ejemplo radionúclidos o colorantes fluorescentes. Los cebadores también pueden comprender nucleótidos modificados químicamente. Las longitudes de cebador/secuencias pueden seleccionarse típicamente basándose en consideraciones de temperatura, es decir que sean capaces de unirse al molde a la  
 20 temperatura usada en la etapa de amplificación.

El contacto del molde de ADN con la ADN polimerasa y uno o más cebadores tiene lugar en condiciones que promueven la hibridación de cebadores con el molde de ADN. Las condiciones incluyen la presencia de ADN  
 25 monocatenario que permite la hibridación de los cebadores. Las condiciones también incluyen una temperatura y tampón que permiten la hibridación del cebador con el molde. Las condiciones de hibridación/recombinación apropiadas pueden seleccionarse dependiendo de la naturaleza del cebador. Un ejemplo de las condiciones de hibridación preferidas usadas en la presente invención incluye un tampón Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM. La hibridación puede llevarse a cabo después de la desnaturalización por enfriamiento gradual a la temperatura de reacción deseada.  
 30

Una vez que el molde de ADN se pone en contacto con la ADN polimerasa y uno o más cebadores, hay después una etapa de incubación en condiciones que promueven la amplificación de dicho molde. Preferentemente, las condiciones promueven la amplificación de dicho molde por desplazamiento de cadenas replicadas mediante  
 35 replicación de desplazamiento de cadena de otra cadena. Las condiciones comprenden el uso de cualquier temperatura que permite la amplificación de ADN, habitualmente en el intervalo de 20 a 90 grados centígrados. Un intervalo de temperaturas preferido puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 o de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 grados centígrados.

Típicamente, se selecciona una temperatura apropiada basándose en la temperatura a la que una ADN polimerasa específica tiene actividad óptima. Esta información está disponible habitualmente y forma parte del conocimiento general del experto en la materia. Por ejemplo, cuando se usa ADN polimerasa phi29, un intervalo de temperatura adecuado sería de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 grados centígrados, preferentemente  
 40 aproximadamente 30 grados centígrados. El experto en la materia sería capaz de forma rutinaria de identificar una temperatura adecuada para amplificación eficaz de acuerdo con el proceso de la invención. Por ejemplo, el proceso podría llevarse a cabo un intervalo de temperaturas y los rendimientos del ADN amplificado podrían supervisarse para identificar un intervalo de temperaturas óptimo para una ADN polimerasa dada.  
 45

Otras condiciones que promueven la amplificación del molde de ADN comprenden la presencia de una ADN polimerasa y uno o más cebadores. Las condiciones también incluyen la presencia de los cuatro dNTP, ATP, TTP, CTP y GTP, agentes tamponantes adecuados/pH y otros factores que se requieran para rendimiento o estabilidad de las enzimas. Las condiciones adecuadas incluyen cualquier condición usada para posibilitar la actividad de las enzimas ADN polimerasa conocidas en la técnica.  
 50

Por ejemplo, el pH puede estar dentro del intervalo de 3 a 10, preferentemente de 5 a 8 o aproximadamente 7, tal como aproximadamente 7,5. El pH puede mantenerse en este intervalo mediante el uso de uno o más agentes tamponantes. Tales tampones incluyen, pero sin restricción MES, Bis-Tris, ADA, ACES, PIPES, MOBS, MOPS, MOPSO, Bis-Tris Propano, BES, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, Trizma, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Tricina, Gly-Gly, Bicina, HEPBS, TAPS, AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS, CABS, fosfato, ácido cítrico-fosfato de hidrógeno sódico, ácido cítrico-citrato sódico, acetato sódico-ácido acético, imidazol y carbonato sódico-bicarbonato sódico. La reacción también puede comprender sales de metal divalentes tales como pero sin limitación sales de magnesio (Mg<sup>2+</sup>) y manganeso (Mn<sup>2+</sup>), incluyendo cloruros, acetatos y sulfatos. También pueden estar incluidas sales de metales monovalentes, tales como sales de sodio y sales de potasio, por ejemplo cloruro de potasio. Otras sales que pueden incluirse son sales de amonio, en particular sulfato de amonio.  
 55  
 60

También pueden incluirse detergentes. Los ejemplos de detergentes adecuados incluyen Triton X-100, Tween 20 y derivados de uno de los mismos. También pueden incluirse en la reacción agentes estabilizantes. Puede usarse  
 65

cualquier agente estabilizante adecuado, en particular, albúmina de suero bovino (BSA) y otras proteínas estabilizantes. Las condiciones de reacción también pueden mejorarse añadiendo agentes que relajen el ADN y hagan la desnaturalización del molde más fácil. Tales agentes incluyen, por ejemplo, dimetil sulfoxido (DMSO), formamida, glicerol y betaína.

5 Debería entenderse que el experto en la materia es capaz de modificar y optimizar las condiciones de amplificación e incubación para el proceso de la invención basándose en su conocimiento general. De forma similar las concentraciones específicas de agentes particulares pueden seleccionarse basándose en ejemplos previos de la técnica y optimizarse además basándose en el conocimiento general. Como ejemplo, un tampón de reacción  
10 adecuado usado en métodos basados en RCA en la técnica es Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, glicerol 5%, BSA 0,2 mM, dNTP 1 mM. Un tampón de reacción preferido usado en la amplificación por RCA de la invención es Tris-HCl 35 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 14 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 4 mM, dNTP 1 mM. Este tampón es particularmente adecuado para su uso con polimerasa RCA phi29.

15 Las condiciones de reacción también pueden comprender el uso de una o más proteínas adicionales. El molde de ADN puede amplificarse en presencia de al menos una pirofosfatasa, tal como pirofosfatasa Inorgánica de Levadura. Pueden usarse dos, tres, cuatro, cinco o más pirofosfatasas diferentes. Estas enzimas son capaces de degradar el pirofosfato generado por la ADN polimerasa a partir de dNTP durante la replicación de cadena. La acumulación de pirofosfato en la reacción puede provocar la inhibición de las ADN polimerasas y reducir la velocidad y eficacia de la  
20 amplificación de ADN. Las pirofosfatasas pueden degradar el pirofosfato en fosfato no inhibidor. Un ejemplo de una pirofosfatasa adecuada para su uso en el proceso de la presente invención es pirofosfatasa de *Saccharomyces cerevisiae*, disponible en el mercado de New England Biolabs, Inc.

25 Puede usarse cualquier proteína de unión monocatenaria (SSBP) en el proceso de la divulgación, para estabilizar ADN monocatenario. Las SSBP son componentes esenciales de las células vivas y participan en todos los procesos que implican ADNmc, tales como replicación, reparación y recombinación de ADN. En estos procesos, las SSBP se unen a ADNmc formado de forma transitoria y pueden ayudar a estabilizar la estructura del ADNmc. Un ejemplo de una SSBP adecuada es la proteína 32 del gen T4, disponible en el mercado de New England Biolabs, Inc.

30 Además de la etapa de amplificación, el proceso de la invención también comprende una etapa de procesamiento para la producción de ADN lineal cerrado. El ADN amplificado se pone en contacto con el medio con al menos una protelomerasa en condiciones que promueven la producción de ADN lineal cerrado. Esta etapa de procesamiento sencilla basada en la protelomerasa es provechosa frente a otros métodos usados para producción de moléculas de ADN lineal cerrado. Las etapas de amplificación y procesamiento pueden llevarse a cabo de forma simultánea o  
35 concurrente. Sin embargo, preferentemente, las etapas de amplificación y procesamiento se llevan a cabo secuencialmente, llevándose a cabo la etapa de procesamiento después de la etapa de amplificación (es decir en ADN amplificado).

40 Una protelomerasa usada en la invención es cualquier polipéptido capaz de escindir y volver a unir un molde que comprenda un sitio diana de protelomerasa para producir una molécula de ADN lineal cerrada covalentemente. Por lo tanto, la protelomerasa tiene funciones de escisión y ligación de ADN. Las enzimas que tienen actividad de tipo protelomerasa también se han descrito como telómero resolvasas (por ejemplo en *Borrelia burgdorferi*). Un sustrato típico para protelomerasa es el ADN bicatenario circular. Si este ADN contiene un sitio diana de protelomerasa, la enzima puede cortar el ADN en este sitio y ligar los extremos para crear una molécula de ADN cerrada  
45 covalentemente bicatenaria lineal. Los requisitos para los sitios diana de protelomerasa se han analizado anteriormente. Como se ha resumido también anteriormente, la capacidad de un polipéptido dado para catalizar la producción de ADN lineal cerrado a partir de un molde que comprende un sitio diana de protelomerasa puede determinarse usando cualquier ensayo adecuado descrito en la técnica.

50 Se han descrito enzimas protelomerasa en bacteriófagos. En algunas bacterias lisógenas, los bacteriófagos existen como ADN extracromosómico que comprende dobles cadenas lineales con extremos cerrados covalentemente. La replicación de este ADN y el mantenimiento de los extremos cerrados covalentemente (o extremos teloméricos) dependen de la actividad de la enzima protelomerasa. El papel de la protelomerasa en la replicación del ADN viral se ilustra en la Figura 1. Un ejemplo de esta actividad catalítica se proporciona por la enzima TelN del bacteriófago  
55 N15 que infecta *Escherichia coli*. TelN reconoce una secuencia de nucleótidos específica en el ADN bicatenario circular. Esta secuencia es una estructura palindrómica invertida ligeramente imperfecta denominada telR que comprende dos mitades, telR y tell, que flanquean una repetición perfecta invertida de 22 pares de bases (telO) (véase Figura 2). Se forman dos sitios telRL en el ADN bicatenario circular por la actividad inicial de ADN polimerasa específica que actúa en el ADN de profago lineal. TelN convierte este ADN circular en dos moléculas de ADN de profago lineales idénticas que completan el ciclo de replicación. TelR y tell comprenden los extremos cerrados del  
60 ADN de profago lineal que permiten que el ADN se replique adicionalmente del mismo modo.

El proceso de la invención requiere el uso de al menos una protelomerasa. El proceso de la invención puede comprender el uso de más de una protelomerasa, tal como dos, tres, cuatro, cinco o más protelomerasas diferentes:  
65 los ejemplos de protelomerasas adecuadas incluyen las de bacteriófagos tales como phiHAP-1 de *Halomonas aquamarina* (SEQ ID NO: 7), PY54 de *Yersinia enterocolitica* (SEQ ID NO: 9), phiKO2 de *Klebsiella oxytoca* (SEQ ID

NO: 11) y VP882 de *Vibrio sp.* (SEQ ID NO: 13) y N15 de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 15), o variantes de cualquiera de las mismas. Se prefiere particularmente el uso de la protelomerasa de bacteriófago N15 (SEQ ID NO: 15) o una variante de la misma.

- 5 Las variantes de SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 y 15 incluyen homólogos o mutantes de las mismas. Los mutantes incluyen truncamientos, sustituciones o deleciones con respecto a la secuencia nativa. Una variante debe producir ADN lineal cerrado a partir de un molde que comprende un sitio diana de protelomerasa como se ha descrito anteriormente.
- 10 Cualquier homólogo mencionado en este documento es típicamente un homólogo funcional y es típicamente al menos 40% homólogo de la región relevante de la proteína nativa. La homología puede medirse usando métodos conocidos. Por ejemplo el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo usado en sus ajustes por defecto) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear secuencias (típicamente en sus ajustes por defecto), por ejemplo como se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36: 290-300; Altschul, S, F *et al* (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10. Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- 20 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase por ejemplo Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma ( $P(N)$ ), que proporciona un indicio de la probabilidad con la que se producirá una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la menor probabilidad de suma en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferentemente menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

- 30 Un polipéptido variante comprende (o consiste en) una secuencia que tiene al menos 40% de identidad con la proteína nativa. En realizaciones preferidas, una secuencia variante puede ser al menos 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y más preferentemente al menos 95%, 97% o 99% homóloga de una región particular de la proteína nativa sobre al menos 20, preferentemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, 60, 100, 200, 300, 400 o más aminoácidos contiguos, o incluso sobre la secuencia completa de la variante. Como alternativa, la secuencia variante puede ser al menos 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y más preferentemente al menos 95%, 97% o 99% homóloga de la proteína nativa de longitud completa. Típicamente, la secuencia variante difiere de la región relevante de la proteína nativa en al menos, o menos de, 2, 5, 10, 20, 40, 50 o 60 mutaciones (cada una de las cuales pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones). Una secuencia variante de la invención puede tener un porcentaje de identidad con una región particular de la proteína nativa de longitud completa que es igual que cualquiera de los valores de porcentaje de homología específicos (es decir, puede tener al menos 40%, 55%, 80% o 90% y más preferentemente al menos 95%, 97% o 99% de identidad) a través de cualquiera de las longitudes de secuencia mencionadas anteriormente.

- 45 Las variantes de la proteína nativa también incluyen truncamientos. Puede usarse cualquier truncamiento siempre que la variante aún sea capaz de producir ADN lineal cerrado como se ha descrito anteriormente. Se realizarán típicamente truncamientos para retirar secuencias que no sean esenciales para la actividad catalítica y/o no afecten a la conformación de la proteína plegada, y en particular plegamiento del sitio activo. También pueden seleccionarse truncamientos para mejorar la solubilidad del polipéptido de protelomerasa. Pueden identificarse de forma rutinaria truncamientos apropiados por truncamiento sistemático de secuencias de diversa longitud desde el extremo N o C terminal.

- 50 Las variantes de la proteína nativa incluyen además mutantes que tienen una o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 40 o más, inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácido con respecto a una región particular de la proteína nativa. Se realizan deleciones e inserciones preferentemente fuera del dominio catalítico. Las inserciones se realizan típicamente en los extremos N o C terminales de una secuencia derivada de la proteína nativa, por ejemplo para los fines de expresión recombinante. Las sustituciones también se realizan típicamente en regiones que no son esenciales para la actividad catalítica y/o no afectan a la conformación de la proteína plegada. Tales sustituciones pueden realizarse para mejorar la solubilidad y otras características de la enzima. Aunque no se prefieran en general, también pueden realizarse sustituciones en el sitio activo o en la segunda esfera, es decir restos que afecten o entren en contacto con la posición y orientación de uno o más de los aminoácidos en el sitio activo. Estas sustituciones pueden realizarse para mejorar las propiedades catalíticas.

- 60 Las sustituciones preferentemente introducen uno o más cambios conservativos, que reemplazan aminoácidos con otros aminoácidos de estructura química similar, propiedades químicas similares o volumen de cadena lateral similar. Los aminoácidos introducidos pueden tener polaridad, hidrofilia, hidrofobicidad, basicidad, acidez, neutralidad o carga similar a los aminoácidos que reemplazan. Como alternativa, el cambio conservativo puede introducir otro aminoácido que sea aromático o alifático en lugar de un aminoácido aromático o alifático preexistente. Se conocen bien en la técnica cambios de aminoácidos conservativos y pueden seleccionarse de acuerdo con las

propiedades de los 20 aminoácidos principales como se definen en la Tabla A.

Tabla A – Propiedades químicas de los aminoácidos

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, cargado(+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

- 5 Se prefiere particularmente que la variante sea capaz de producir ADN lineal cerrado como se ha descrito anteriormente con una eficacia que sea comparable a, o la misma que, la proteína nativa.

10 Como se ha descrito anteriormente, se prefiere que la amplificación de ADN de acuerdo con el proceso de la invención se lleve a cabo por ADN polimerasa de desplazamiento de cadena, más preferentemente una ADN polimerasa RCA. La combinación de una ADN polimerasa RCA y una protelomerasa en un proceso sin células *in vitro* posibilitan una eficacia y simplicidad sorprendentes en la producción de ADN lineal cerrado.

15 Como se ha analizado anteriormente, se forman inicialmente moléculas de ADN monocatenarias lineales largas en reacciones de desplazamiento de cadena que después actúan como nuevos moldes, de modo que se forman moléculas bicatenarias (Figura 4). Las moléculas bicatenarias comprenden una serie continua de unidades en tándem del ADN amplificado formado por la acción de procesamiento de polimerasas de desplazamiento de cadena (un concatémero). Estos productos de ADN concatéméricos comprenden múltiples repeticiones del ADN molde amplificado. Un concatémero generado en el proceso de la invención comprende por lo tanto múltiples unidades de secuencia amplificada a partir del molde de ADN. El concatémero puede comprender 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 20 1000 o más unidades de secuencia amplificada, dependiendo de la longitud de la unidad individual que se va a amplificar. El concatémero puede ser de al menos 5 kb, al menos 10 kb, al menos 20 kb, más preferentemente al menos 30 kb, al menos 50 kb, o al menos 70 kb o de mayor tamaño.

25 En muchas realizaciones, por ejemplo en la producción de medicinas de ADN, el ADN purificado se requerirá para su uso como una unidad individual. Por lo tanto, tales concatémeros requieren procesamiento para liberar unidades individuales del ADN amplificado. Para convertir este ADN concatémérico en unidades individuales de ADN amplificado, es necesario que se corte de forma precisa y los extremos de las cadenas emparejadas requieren religación. Convencionalmente, esto podría hacerse mediante incorporación de sitios de endonucleasa de restricción en el molde de ADN. Por lo tanto, podrían incubarse endonucleasas de restricción con concatémeros para escindir 30 en sus sitios de reconocimiento y liberar unidades individuales. El ADN bicatenario lineal abierto formado por la acción de endonucleasas de restricción podía después incubarse con una enzima ADN ligasa para cerrar covalentemente los ADN de unidad individual.

35 De acuerdo con la presente invención, el procesamiento de ADN concatémérico en ADN de unidad individual lineal cerrado se consigue mediante el uso de una única enzima, protelomerasa. Esto representa una simplicidad y economía ventajosas en un proceso para la generación de moléculas de ADN lineal cerrado. En primer lugar, se consigue escisión y religación de unidades individuales mediante incubación con una única enzima. En segundo lugar, también se liberan unidades individuales que tienen la estructura lineal cerrada deseada, y por lo tanto no se requieren etapas de procesamiento adicionales para generar esta estructura (es decir de un ADN de unidad 40 individual circular cerrado covalentemente).

45 El ADN amplificado a partir del molde de ADN se incuba con al menos una protelomerasa en condiciones que promueven la producción de ADN lineal cerrado. En otras palabras, las condiciones promueven la escisión y realización de un ADN bicatenario que comprende una secuencia diana de protelomerasa para formar un ADN lineal cerrado covalentemente con extremos en horquilla. Las condiciones que promueven la producción de ADN lineal cerrado comprenden el uso de cualquier temperatura que permita la producción de ADN lineal cerrado, habitualmente en el intervalo de 20 a 90 grados centígrados. La temperatura puede estar preferentemente en un intervalo de 25 a 40 grados centígrados, tal como de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 grados centígrados, o aproximadamente 30 grados centígrados. Las temperaturas apropiadas para una protelomerasa 50 específica pueden seleccionarse de acuerdo con los principios descritos anteriormente en relación con las condiciones de temperatura para ADN polimerasas. Una temperatura adecuada para su uso con protelomerasa TeIN de bacteriófago de *E. coli* de SEQ ID NO: 15 es de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 grados centígrados

tal como aproximadamente 30 grados centígrados.

Las condiciones que promueven la producción de ADN lineal cerrado también comprenden la presencia de una protelomerasa y agentes tamponantes adecuados/pH y otros factores que se requieren para el rendimiento o estabilidad de la enzima. Las condiciones adecuadas incluyen cualquier condición usada para posibilitar la actividad de enzimas protelomerasa conocidas en la técnica. Por ejemplo, cuando se usa protelomerasa TeIN de bacteriófago de *E. coli*, un tampón adecuado puede ser TrisHCl 20 mM, pH 7,6; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; glutamato potásico 50 mM; EDTA 0,1 mM; Ditiotreitól 1 mM (DTT). Los agentes y condiciones para mantener la actividad y estabilidad óptimas pueden seleccionarse también de los enumerados para ADN polimerasas.

En algunas realizaciones, es posible usar las mismas condiciones para actividad de protelomerasa que se usan para amplificación de ADN. En particular, se describe el uso de las mismas condiciones cuando se llevan a cabo amplificación de ADN y procesamiento por protelomerasa simultáneamente o de forma concurrente. En otras realizaciones, puede ser necesario cambiar las condiciones de reacción cuando las condiciones usadas para proporcionar actividad ADN polimerasa óptima conducen a actividad protelomerasa subóptima. La retirada de agentes específicos y cambio de las condiciones de reacción pueden conseguirse mediante filtración, diálisis y otros métodos conocidos en la técnica. El experto en la materia puede identificar fácilmente las condiciones que posibilitan la actividad ADN polimerasa y/o actividad protelomerasa óptimas.

En una realización particularmente preferida, para su uso en la amplificación de ADN por una ADN polimerasa RCA, preferentemente phi29, la amplificación de ADN se lleva a cabo en condiciones de tampón sustancialmente idénticas a o que consisten esencialmente en Tris-HCl 35 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 14 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 4 mM, dNTP 1 mM a una temperatura de 25 a 35 grados centígrados, tal como aproximadamente 30 grados centígrados. La etapa de procesamiento con protelomerasa puede llevarse a cabo después preferentemente con TeIN y/o preferentemente en condiciones de tampón sustancialmente idénticas a o que consisten esencialmente en TrisHCl 20 mM, pH 7,6; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; glutamato potásico 50 mM; EDTA 0,1 mM; Ditiotreitól 1 mM (DTT) a una temperatura de 25 a 35 grados centígrados, tal como aproximadamente 30 grados centígrados.

Todas las enzimas y proteínas para su uso en el proceso de la invención pueden producirse de forma recombinante, por ejemplo en bacterias. Puede usarse cualquier medio conocido por los expertos en la materia que permita la expresión recombinante. Puede introducirse un plásmido u otra forma de vector de expresión que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique la proteína de interés en bacterias, de modo que expresen la proteína codificada. Por ejemplo, para expresión de SEQ ID NO: 2, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, el vector puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 1, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 respectivamente. Después típicamente se purificará la proteína expresada, mediante el uso de un marcador de afinidad, en una cantidad suficiente y se proporcionará en una forma adecuada para su uso en el proceso de la invención. Dicha metodología para producción de proteína recombinante está disponible de forma rutinaria para el experto en la materia basándose en su conocimiento general. El análisis anterior se aplica al suministro de cualquier proteína analizada en este documento.

Puede purificarse ADN amplificado obtenido por contacto del molde de ADN con una ADN polimerasa antes de su contacto con una protelomerasa. Por lo tanto, el proceso de la descripción puede comprender además una etapa de purificar ADN amplificado a partir del molde de ADN. Sin embargo, en una realización preferida, el proceso se lleva a cabo sin purificación de ADN amplificado antes de su contacto con protelomerasa. Esto significa que las etapas de amplificación y procesamiento pueden llevarse a cabo de forma consecutiva, típicamente en el mismo recipiente o solución. En algunas de dichas realizaciones, el proceso implica la adición de un tampón que posibilita la actividad protelomerasa, es decir para proporcionar condiciones que promuevan la formación de un ADN lineal cerrado.

Después de la producción de ADN lineal cerrado mediante la acción de protelomerasa, el proceso de la descripción puede comprender además una etapa de purificar el producto de ADN cerrado covalentemente lineal. La purificación referida anteriormente se realizará típicamente para retirar cualquier producto no deseado. La purificación puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el procesamiento de ADN purificado o ADN cerrado covalentemente lineal puede comprender purificación de ácido nucleico con fenol/cloroformo o el uso de una columna que se una selectivamente a ácido nucleico, tal como las disponibles en el mercado de Qiagen. El experto en la materia puede identificar de forma rutinaria técnicas de purificación adecuadas para su uso en el aislamiento de ADN amplificado.

Una vez que se ha generado ADN cerrado covalentemente lineal y se ha purificado en una cantidad suficiente, el proceso puede comprender además su formulación como una composición de ADN, por ejemplo una composición de ADN terapéutica. Una composición de ADN terapéutica comprenderá una molécula de ADN terapéutica del tipo indicado anteriormente. Dicha composición comprenderá una cantidad terapéuticamente eficaz del ADN en una forma adecuada para administración por una vía deseada, por ejemplo un aerosol, una composición inyectable o una formulación adecuada para administración oral, mucosa o tópica.

La formulación de ADN como una preparación farmacéutica convencional puede realizarse usando químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, que están disponibles para los expertos en la materia. Puede usarse cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Pueden estar presentes sustancias

adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento de pH y similares, en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias adyuvantes son generalmente agentes farmacéuticos que pueden administrarse sin toxicidad indebida y que, en el caso de composiciones de vacuna, no inducirán una respuesta inmune en el individuo que recibe la composición. Un vehículo adecuado puede ser un liposoma.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También puede incluirse en los mismos sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. También se prefiere, aunque no se requiere, que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que actúe como un estabilizador, particularmente para péptidos, proteínas u otras moléculas similares si se van a incluir en la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados que también actúan como estabilizadores para péptidos incluyen, sin limitación, usos farmacéuticos de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos sódicos o cálcicos, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles de alto peso molecular (PEG) y combinaciones de los mismos. Está disponible un análisis exhaustivo de excipientes, vehículos y sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

El proceso de la invención se lleva a cabo en un ambiente sin células *in vitro*. Por lo tanto, el proceso se lleva a cabo en ausencia de una célula hospedadora y típicamente comprende el uso de componentes enzimáticos purificados. En consecuencia, la amplificación de un molde de ADN y procesamiento por protelomerasa típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto los componentes de reacción en solución en un recipiente adecuado. Opcionalmente, pueden proporcionarse componentes particulares en forma inmovilizada, tal como unidos a un soporte sólido.

Debería entenderse que el proceso de la invención puede llevarse a cabo a cualquier escala. Sin embargo, se prefiere que el proceso se lleve a cabo para amplificar ADN a una escala comercial o industrial, es decir generando ADN amplificado en cantidades de miligramos o mayores. Se prefiere que el proceso genere al menos un miligramo, al menos 10 miligramos, al menos 20 miligramos, al menos 50 miligramos o al menos 100 miligramos de ADN amplificado. El producto de ADN lineal cerrado final derivado del ADN amplificado también puede generarse preferentemente en cantidades de miligramos o mayores. Se prefiere que el proceso genere al menos un miligramo, al menos 2 miligramos, al menos 5 miligramos, al menos 10 miligramos, al menos 20 miligramos, al menos 50 miligramos o al menos 100 miligramos de ADN lineal cerrado.

La descripción proporciona además un kit que comprende componentes necesarios para llevar a cabo el proceso de la invención. Este kit comprende al menos una ADN polimerasa y al menos una protelomerasa y opcionalmente instrucciones para su uso en un proceso como se describe en el presente documento. El kit puede comprender dos, tres, cuatro, cinco o más ADN polimerasas diferentes. Preferentemente el kit comprende al menos una ADN polimerasa de tipo desplazamiento de cadena, aún más preferentemente una ADN polimerasa RCA. Se prefiere particularmente que el kit comprenda ADN polimerasa phi29 (SEQ ID NO: 2), ADN polimerasa Deep Vent<sup>®</sup> (SEQ ID NO: 3) o ADN polimerasa Bst 1 (SEQ ID NO: 5) o una variante de cualquiera de las mismas. En algunas realizaciones, también pueden incluirse ADN polimerasas que repliquen el ADN por otros métodos. El kit comprende al menos una protelomerasa. El kit puede comprender dos, tres, cuatro o más protelomerasas diferentes. Las protelomerasas pueden seleccionarse de cualquiera de SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13 o 15 o variantes de cualquiera de las mismas. Se prefiere particularmente que el kit comprenda TelN de N15 de *E. coli* (SEQ ID NO: 15) o una variante de la misma.

El kit también puede comprender al menos una proteína de unión monocatenaria (SSBP). Una SSBP es la proteína 32 del gen T4 disponible en el mercado de New England Biolabs, Inc. Pueden incluirse dos, tres, cuatro o más SSBP diferentes en el kit. El kit puede comprender además una pirofosfatasa. Una pirofosfatasa preferida es pirofosfatasa de *S. cerevisiae*, disponible en el mercado de New England Biolabs, Inc. En algunas realizaciones, pueden incluirse dos, tres, cuatro, cinco o más pirofosfatasas diferentes. El kit puede comprender cualquier ADN polimerasa, protelomerasa, SSBP o pirofosfatasa descrita en este documento. El kit también puede comprender dNTP, tampones adecuados y otros factores que se requieran para el rendimiento o estabilidad de la enzima ADN polimerasa y/o protelomerasa como se ha descrito anteriormente.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 – Expresión de TelN y generación de construcciones de vector que comprenden secuencias diana de protelomerasa

Se amplificó TelN por PCR a partir del vector de clonación disponible en el mercado pJAZZ (Lucigen) usando cebadores oligonucleotídicos modificados:

PT1F 5' ATGAGCAAGGTAAAAATCGGTG 3' (SEQ ID NO: 30)

PT1R 5' TTAGCTGTAGTACGTTTCCCAT 3' (SEQ ID NO: 31)

para clonación en fase direccional en el vector pQE-30 disponible en el mercado (Qiagen). Este sistema permite la expresión inducible de proteínas marcadas con 6X His N terminal desde un promotor *lac* proporcionando a la vez fuerte represión en trans del plásmido que expresa *lacI* pREP4. Se identificaron varios clones recombinantes potenciales en *E. coli* M15, y se validaron por secuenciación para mostrar la inserción en fase de TelN. Se caracterizaron adicionalmente seis clones en experimentos de inducción a pequeña escala. Todos los clones expresaron una proteína de 74,5 kDa correspondientes en peso molecular a protelomerasa TelN recombinante.

TelN se expresó a partir de pREP4 de *E. coli* M15 induciendo la expresión proteica a partir de pQE-30 con IPTG, y las células inducidas se sonicaron (6 ráfagas de 30 segundos a 100%) y se centrifugaron (30 minutos a 25000 g) para producir fracciones solubles e insolubles del lisado celular. El análisis en gel mostró la presencia de TelN en la fracción soluble. La purificación de TelN se llevó a cabo en una columna HisTrap usando un sistema Akta Prime (GE Healthcare) con elución usando un gradiente de imidazol 0-100% (0,5 M). La TelN purificada se dializó para retirar el imitador y se almacenó en un tampón de Tris HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 75 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM y glicerol al 50%.

Se crearon construcciones de vector que posibilitaban la validación de actividad de TelN por clonación direccional de oligonucleótidos sintéticos que contenían el sitio de reconocimiento de TelN telRL:

RL1

5'AGCTTTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATAG 3' (SEQ ID NO: 32)

RL2

5'GATCCTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATAA 3' (SEQ ID NO: 33)

en los sitios BamHI y HindIII de los plásmidos pUC18 y pBR329. pUC18 tiene el número de referencia de Genbank L09136, y puede obtenerse en el mercado de Fermentas Cat nº SD0051; pBR329 tiene el número de Referencia de Genbank J01753 y puede obtenerse en el mercado de DSMZ Cat nº 5590.

Adicionalmente, para estudios de transfección, se clonaron dos copias del sitio de reconocimiento telRL en el plásmido de expresión de luciferasa pGL4.13 (Promega) en los sitios de restricción únicos SacI y BamHI que flanquean el casete de expresión para el gen de luciferasa de luciérnaga. El primer sitio telRL se clonó en el sitio SacI único cadena arriba del promotor de SV40 después de la rehibridación de oligonucleótidos sintéticos telRL con salientes SacI. El segundo sitio telRL se clonó cadena abajo de la señal de poliadenilación de SV40 en el sitio BamHI único usando oligonucleótidos sintéticos telRL con salientes BamHI. La construcción resultante se designó pGL DOG puesto que permite la formación de un ADN lineal cerrado covalentemente (en forma de hueso) que codifica luciferasa para expresar en células de mamífero.

#### Ejemplo 2 – Validación de la escisión de TelN

Se validó la escisión de construcciones de vector pGL DOG y pUC18 telRL circular, superenrollado mediante TelN. Se incubaron 100 ng de cada sustrato con 4,5 pmoles de TelN durante 1 hora y 40 minutos a 30 grados centígrados. La reacción se realizó en tampón de TelN [Tris HCl 10mM pH 7,6, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, glutamato potásico 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM].

Los productos de escisión se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa nativo. La incubación de pUC18 telRL circular, superenrollado, con TelN liberó un fragmento lineal de 2,7 kb, lo que indica escisión. La incubación de pGL DOG circular superenrollado con TelN liberó dos fragmentos de 2,4 kb lo que indica escisión en los dos sitios telRL.

Adicionalmente, se linealizaron pUC18 telRL y pGL DOG mediante digestión de restricción y se incubaron después con TelN para validar adicionalmente la escisión específica en telRL. Se linealizaron 100 ng de pUC18 telRL con Xmn1 y después se incubaron con TelN. Esto liberó fragmentos esperados de 1,9 kb y 0,8 kb. Se linealizaron 100 ng de pGL DOG con Pvu1 y después se incubaron con TelN. Esto liberó fragmentos esperados de 2,4 kb, 1,6 kb y 0,7 kb. De forma similar, pGL DOG linealizado con Pst1 y después incubado con TelN liberó fragmentos esperados de 2,4 kb, 1,1 kb y otros 1,1 kb. Esto demostró la actividad endonucleasa de TelN en sustratos de ADN circulares y lineales que comprenden una secuencia diana de protelomerasa.

En una evaluación preliminar de la actividad de escisión, se descubrió que un exceso de TelN a 3,4 pmoles corta al menos 200 ng de pUC18 telRL en 1 hora. En un experimento de transcurso de tiempo, se cortó la misma cantidad de ADN en un periodo de aproximadamente 10 minutos.

Ejemplo 3 – Validación de la actividad de reunión de TelN y formación de ADN lineal cerrado

Se llevó a cabo validación de la estructura de ADN lineal cerrado de los productos de escisión de TelN usando electroforesis en gel desnaturizante. Se incubó pGLDOG con TelN como en el Ejemplo 3. Se usó como un control un producto de PCR sintético (PCR DOG) correspondiente a la región contenida dentro de la forma de hueso, pero que tenía extremos de ADN abiertos. El fragmento lineal de PCR DOG se amplificó a partir de pGL DOG usando cebadores que flanqueaban los sitios telRL:

Sac pGL 5' GTGCAAGTGCAGGTGCCAGAAC 3' (SEQ ID NO: 34);  
Bam pGL 5' GATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGC 3' (SEQ ID NO: 35).

En un gel de agarosa nativo [agarosa 0,8% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM)], el producto de escisión de 2,4 kb obtenido por incubación de 100 ng de pGL DOG con TelN migró a un tamaño similar que PCR DOG (2,7 kb), puesto que ambos productos siguen siendo bicatenarios.

Sin embargo, cuando se procesan en un gel de agarosa desnaturizante [agarosa 1% en procesamiento de H<sub>2</sub>O en NaOH 50 mM, EDTA 0,1 mM y después del procesamiento neutralizado en Tris HCl 1 M pH 7,6, NaCl 1,5 M] que permite la desnaturización y separación de ADN bicatenario en ADN monocatenario, el fragmento “en forma de hueso” de TelN migró a un mayor peso molecular [aproximadamente 5 kb] que el control de PCR de extremos abiertos de pUC18 telRL linealizado con XmnI (ambos de 2,7 kb).

La diferencia en la migración indicó la formación de una estructura “en forma de hueso” lineal cerrada por TelN. La desnaturización de una estructura “en forma de hueso” produciría círculos abiertos monocatenarios que migran más lentamente a través del gel que las cadenas únicas lineales liberadas tras la desnaturización de un producto de PCR lineal de extremos abiertos.

También se mostró validación de la estructura lineal cerrada de productos formados por TelN en el análisis de desnaturización térmica por electroforesis capilar Lab-On-a-Chip (LOC). El análisis LOC representa una plataforma de electroforesis capilar para la separación rápida de moléculas biológicas. El Bioanalizador Agilent con microplacas de ADN 7500, (Agilent, Reino Unido) puede usarse para la separación y clasificación por tamaños aproximada de fragmentos de ADN hasta 7000 pb.

El sistema de microplaca no detecta ADN monocatenario. La desnaturización por calor (95 °C durante 5 minutos) y enfriamiento rápido (<1 °C/s) a 1 °C/s de ADN bicatenario en condiciones de baja salinidad, por ejemplo en H<sub>2</sub>O, da como resultado ADN monocatenario que no puede visualizarse en el sistema LOC. Sin embargo, los extremos de ADN que se unen covalentemente en ADN “en forma de hueso” (resultante de la escisión por TelN) no pueden separarse después de desnaturización y por lo tanto se vuelven a hibridar para reformar ADN bicatenario que permanece visible. La comparación de ADN desnaturizado por calor que se ha enfriado rápidamente permite por lo tanto diferenciar entre ADN en forma de hueso lineal cerrado covalentemente (ccl) y ADN bicatenario lineal abierto convencional (ol).

Se desnaturizaron muestras de ADN (100 ng) en H<sub>2</sub>O (95 °C durante 5 minutos), se enfriaron rápidamente (<1 °C/s) a 4 °C en tubos de PCR de pared fina en un termociclador (Biorad I-cycler, Biorad, Reino Unido). Para comparación con escisión por TelN, las muestras se incubaron en primer lugar en tampón TelN 1 X con 1 microlitro de enzima protelomerasa purificada a 30 °C durante 10 minutos. Las muestras de control se trataron de forma idéntica pero sin enzima. Las muestras (1 microlitro) se analizaron usando un Bioanalizador Agilent con microplacas de ADN 7500 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la Figura 6B. Estos muestran que el ADN “en forma de hueso” lineal cerrado obtenido por incubación de pGL DOG con TelN es resistente a desnaturización térmica en comparación con el ADN lineal abierto convencional equivalente (PCR DOG). También se obtuvo resistencia equivalente contra la desnaturización por calor usando ADN en forma de hueso amplificado por RCA resultante de la amplificación por RCA y escisión con TelN.

En otros experimentos, se llevó a cabo escisión con TelN en el PCR DOG de extremos abiertos. Esto dio como resultado la formación del producto de escisión termoestable, ADN “en forma de hueso” de 2,8 kb, y extremos “en forma de hueso” termoestables de 0,09 y 0,14 kb.

Los tamaños estimados de “forma de hueso” y PCR DOG en análisis de LOC variaron de 2,8 kb a 3,0 kb y 3,1-3,5 kb respectivamente en comparación con datos de secuencia que predijeron tamaños aproximados de 2,4 kb y 2,7 kb. Esto refleja diferencias basadas en la conformación en la migración que se producen en análisis de LOC no desnaturizante.

Ejemplo 4 – Formación de ADN lineal cerrado a partir de ADN concatémico formado por RCA (Amplificación de Círculo Rodante)

- Se llevó a cabo un proceso sin células *in vitro* para amplificar un molde de ADN y convertir el ADN amplificado en ADN “en forma de hueso” lineales cerrados. Se usó RCA usando la enzima phi29 del fago phi29 de *Bacillus subtilis* y hexámeros aleatorios como cebadores en diversas condiciones para amplificar los moldes plasmídicos cerrados covalentemente con y sin el sitio telRL. Esto condujo a la amplificación del ADN concatémico mediante la actividad de desplazamiento de cadena de procesamiento de phi29. El trabajo inicial se realizó usando un kit TempliPhi (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Sin embargo este se substituyó posteriormente por un proceso interno (usando phi29 proporcionado por NEB) dando como resultado mayores rendimientos de producto con pureza aumentada.
- 5
- 10 Se llevó a cabo desnaturalización de 40 pg-200 ng de molde circular cerrado e hibridación de cebadores en 10 microlitros de tampón de hibridación/desnaturalización, Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, hexámeros aleatorios 20 micromolar. Se llevó a cabo desnaturalización e hibridación por calentamiento a 95 °C durante 1 minuto, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 15 Se añadieron después 10 microlitros de tampón de reacción [Tris-HCl 35 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 14 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 4 mM, phi29 10U, PPI 0,002U (pirofosfatasa inorgánica de levadura), dNTP 1 mM] a 10 microlitros de ADN hibridado/reacción de cebador.
- 20 Las reacciones de 20 microlitros se incubaron a 30 °C durante 18 horas. Se procesó una muestra en gel para comprobar la formación de concatémicos y después la mezcla de reacción se digirió con enzima de restricción o TelN para comprobar los productos.
- 25 Se incubó después el ADN concatémico amplificado por RCA con TelN. Típicamente, el sustrato de ADN amplificado por RCA se diluyó en agua y tampón TelN 10x a un volumen final de 20 microlitros. Se muestran resultados para pUC18 telRL en la Figura 6A.
- 30 Como puede verse a partir del gel en el carril 1, el ADN amplificado concatémico no digerido forma una malla que no entra en el gel. Sin embargo, TelN fue capaz de escindir el material de RCA dando como resultado la liberación de un fragmento en forma de hueso de 2,7 kb (carril 6). Se consiguió confirmación de que el ADN amplificado por RCA era el molde de partida usado en la reacción mediante digestión de restricción con Pvu1 (carriles 2 y 5). pUC18 (sin telRL) actuó como un control negativo para la actividad de TelN (carril 3).
- 35 De forma similar, en otros experimentos, los concatémicos de pGL DOG generados por RCA también se escindieron por TelN. En consecuencia, se mostró que el proceso de la invención era eficaz en la amplificación de ADN lineal cerrado a partir de un molde de partida. Además, fue posible amplificar ADN lineal cerrado de una manera sencilla usando polimerasa de RCA y protelomerasa en etapas secuenciales, sin necesidad de purificación intermedia de ADN amplificado.
- 40 Ejemplo 5 – Expresión de ADN lineal cerrado amplificado
- 45 Se realizaron experimentos de transfección usando células HeLa para investigar la expresión de un gen indicador de luciferasa a partir de ADN “en forma de hueso” lineal cerrado producido de acuerdo con la invención. Se usaron como controles ADN circular cerrado covalentemente y el control de PCR DOG lineal.
- 50 Se llevó a cabo transfección al 60% de confluencia en pocillos de 20 mm de diámetro en RPMI y se usó Transfectam<sup>®</sup> (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada transfección usó 400 ng de ADN de la construcción. La frecuencia de transfección se normalizó dentro de y entre experimentos mediante la inclusión de un control interno usando 40 ng del plásmido que expresa luciferasa de *Renilla* pGL4.73 (que contiene el gen *hRluc* de *Renilla reniformis*) en cada transfección. Se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga (luminiscencia de *Photinus pyralis*) y luciferasa de *Renilla* secuencialmente usando el Sistema de Ensayo Indicador Dual-Luciferase<sup>®</sup> (DLR<sup>™</sup>) (Promega). Las unidades de luz relativas se midieron usando un Luminómetro GloMax Multi (Promega) y los resultados se expresaron como la relación de luciferasa de Luciérnaga/luciferasa de *Renilla*. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.
- 55 Las construcciones ensayadas en la transfección fueron las siguientes:
- ADN de control de pGL4.13 luc  
 pGL4.73 hRluc  
 PCR DOG  
 60 control de PCR (fragmento de pGL4.13 a través del gen luc)  
 pGL DOG (pGL4.13 que contiene 2 sitios telRL)  
 MP “en forma de hueso” (pGL DOG aislado de ADN de mini-prep digerido con PvuI (para retirar el ADN del vector contaminante) seguido de escisión por TelN)  
 RCA “en forma de hueso” (pGL DOG amplificado por RCA digerido con PvuI y después escindido con TelN)  
 65 RCA pGL DOG – ADN concatémico producido en la amplificación por RCA inicial de pGL DOG.

Los resultados se muestran en la Figura 6C. Se mostró que el ADN lineal cerrado, incluyendo el amplificado por RCA expresaba luciferasa a niveles mayores que las construcciones de PCR lineales abiertas. Esto demuestra que el ADN lineal cerrado producido de acuerdo con la invención puede usarse para expresar de forma exitosa luciferasa cuando se introduce en células de mamífero.

5

Secuencias de la invención

Tabla A

Secuencia de ácido nucleico de ADN polimerasa de bacteriófago phi29 de <i>Bacillus</i> (SEQ ID NO: 1)						
atgaagcata	tgccgagaaa	gatgtatagt	tgtgactttg	agacaactac	taaagtggaa	60
gactgtaggg	tatgggcgta	tggttatatg	aatatagaag	atcacagtga	gtacaaaata	120
ggtaatagcc	tggatgagtt	tatggcgtgg	gtggtgaagg	tacaagctga	tctatatttc	180
cataacctca	aatttgacgg	agctttttatc	attaactggt	tggaacgtaa	tggttttaag	240
tggtcggctg	acggattgcc	aaacacatat	aatacgatca	tatctcgcac	gggacaatgg	300
tacatgattg	atatatgttt	aggctacaaa	gggaaacgta	agatacatac	agtgatatat	360
gacagcttaa	agaaactacc	gtttcctggt	aagaagatag	ctaaagactt	taaactaact	420
gttcttaaag	gtgatattga	ttaccacaaa	gaaagaccag	tcggctataa	gataacaccc	480
gaagaatacg	cctatattaa	aaacgatatt	cagattattg	cggaacgtct	gttaattcag	540
tttaagcaag	gttttagaccg	gatgacagca	ggcagtgaca	gtctaaaagg	tttcaaggat	600
aaataacca	ctaagaaatt	caaaaagggtg	tttctacat	tgagtcttgg	actcgataag	660
gaagtggatg	acgcctatag	aggtgggtttt	acatggttaa	atgatagggt	caaagaaaaa	720
gaaatcggag	aaggcatggt	cttcgatggt	aatagtctat	atcctgcaca	gatgtatagc	780
cgtctccttc	catatggtga	acctatagta	ttcgagggtg	aatacgtttg	ggacgaagat	840
taccactac	acatacagca	tatcagatgt	gagttcgaat	tgaaagaggg	ctatataccc	900
actatacaga	taaaaagaag	taggttttat	aaagtaatg	agtacctaata	aagtagcggc	960
ggggagatag	ccgacctctg	gttgtcaaat	gtagacctag	aattaatgaa	agaacactac	1020
gatttatata	acgttgaata	tatcagcggc	ttaaaattta	aagcaactac	aggtttgttt	1080
aaagatttta	tagataaatg	gacgtacatc	aagacgacat	cagaaggagc	gatcaagcaa	1140
ctagcaaaac	tgatgttaaa	cagtctatac	ggtaaatctg	ctagtaaccc	tgatgttaca	1200
gggaaagtcc	cttattttaa	agagaatggg	gcgctaggtt	tcagacttgg	agaagaggaa	1260
acaaaagacc	ctgttttatac	acctatgggc	gttttcatca	ctgcatgggc	tagatacacg	1320
acaattacag	cggcacaggc	ttgttatgat	cggataatat	actgtgatac	tgacagcata	1380
catttaacgg	gtacagagat	acctgatgta	ataaaagata	tagttgacct	taagaaattg	1440
ggatactggg	cacatgaaag	tacattcaaa	agagttaaat	atctgagaca	gaagacctat	1500
atacaagaca	tctatatgaa	agaagtagat	ggtaagttag	tagaaggtag	tccagatgat	1560
tacactgata	taaaatttag	tgtaaattgt	gcgggaatga	ctgacaagat	taagaaagag	1620
gttacgtttg	agaatttcaa	agtcggattc	agtcggaaaa	tgaagcctaa	gcctgtgcaa	1680
gtgccgggcg	gggtggttct	ggttgatgac	acattcacaa	tcaataa		1728
Secuencia de aminoácidos de ADN polimerasa de bacteriófago phi29 de <i>Bacillus</i> (SEQ ID NO: 2)						
MKHMPRKMY	S	CD	FET	TTK	VE	DCRVWAYGYM NIEDHSEYKI GNSLDEFMAW VLKVQADLYF 60
HNLKFDGAFI	I	NW	LERN	GF	K	WSADGLENTY NTIISRMGQW YMIDICLGYK GKRKIHTVIY 120
DSLKKLFPFV	K	KI	AKDF	KLT		VLKGDIDYHK ERPVGYKITP EEYAYIKNDI QIIAERLLIQ 180
FKQGLDRMTA	G	SD	SLK	GFKD		IITTKKFKKV FPTLSLGLDK EVRYAYRGGF TWLNDRFKEK 240
EIGEGMVFDV	N	SL	PAQ	MYS		RLLPYGEPV FEGKYVWDED YPLHIQHRC EFELKEGYIP 300
TIQIKRSRFY	K	G	NEY	LK	SSG	GEIADLWLSN VDLELMKEHY DLYNVEYISG LKFKATTGLF 360
KDFIDKWTYI	K	T	TSE	GA	IKQ	LAKLMLNSLY GKFNPNPDVT GKVPYLKENG ALGFRLGEEE 420
TKDPVYTPMG	V	F	IT	A	WARYT	TITAAQACYD RIIYCDTDSI HLTGTEIPDV IKDIVDPKKL 480
GYWAHESTFK	R	V	KY	LR	QKTY	IQDIYMKEVD GKLVEGSPDD YTDIKFSVKC AGMTDKIKKE 540
VTFENFKVGF	S	R	KMK	PK	PVQ	VPGGVVLVDD TFTIK 575

10

Tabla B

Secuencia de aminoácidos de ADN polimerasa Deep Vent de *Pyrococcus sp* (SEQ ID NO: 3)

MILDADYITE	DGKPIIRIFK	KENGEFKVEY	DRNFRPYIYA	LLKDDSQIDE	VRKITAERHG	60
KIVRIIDA EK	VRKKFLGRPI	EVWRLYFEHP	QDVPAIRDKI	REHSAVIDIF	EYDIPFAKRY	120
LIDKGLIPME	GDEELKLLAF	DIETLYHEGE	EFAKGPIIMI	SYADEEEAKV	ITWKKIDLPY	180
VEVVSSEREM	IKRFLKVIRE	KDPDVIIITYN	GDSFDLPYLV	KRAEKLGIKL	PLGRDGSEPK	240
MQR LGDMTAV	EIKGRIHFDL	YHVIRRTINL	PTYTLEAVYE	AIFGPKPEKV	YAHEIAEAW E	300
TGKGLERVAK	YSMEDAKVTY	ELGREFFPME	AQLSRLVGQP	LWDVSRSTG	NLVEWYLLRK	360
AYERNELAPN	KPDEREYERR	LRESYAGGYV	KEPEKGLWEG	LVSLDFRSLY	PSIIITHNVS	420
PDTLNREGCR	EYDVAVEVGH	KFCKDFPGFI	PSLLKRLLE	RQEIKRKMKA	SKDPIEKML	480
DYRQRAIKIL	ANSYYGYGY	AKARWYCKEC	AESVTAWGRE	YIEFVRKELE	EKFGFKVLYI	540
DTDGLYATIP	GAKPEEIKKK	ALEFVDYINA	KLPGLLELEY	EGFYVRGFFV	TKKKYALIDE	600
EGKIITRGL E	IVRRDWSEIA	KETQAKVLEA	ILKHGNVEEA	VKIVKEVTEK	LSKYEIPPEK	660
LVIYEQITRP	LHEYKAIGPH	VAVAKRLAAR	GVKVRPGMVI	GYIVLRGDGP	ISKRAILAE E	720
FDLRKHKYDA	EYYIENQVLP	AVLRILEAFG	YRKEDLRWQK	TKQTGLTAWL	NIKKK	775

Tabla C

Secuencia de ácido nucleico de ADN polimerasa I (polA) de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID NO: 4)

atgaagaaga	agctagtact	aattgatggc	aacagtgctg	cataccgcgc	cttttttgcc	60
ttgccacttt	tgcataacga	caaaggcatt	catacgaatg	cggtttacg	gtttacgatg	120
atggtgaaca	aaattttggc	ggaagaacaa	ccgaccatt	tacttgtagc	gtttgacgcc	180
ggaaaaacga	cgttccggca	tgaaacgttt	caagagtata	aaggcggacg	gcaacaaact	240
cccccggaac	tgtccgagca	gtttccgctg	ttgctgcgagc	tattaaagc	gtaccgcatt	300
cccgcattatg	aacttgatca	ttacgaagcg	gacgatatta	tcgggacgct	cgctgcccgc	360
gctgagcaag	aagggtttga	agtgaaaatc	atttccggcg	accgcgattt	aacccagctc	420
gcctcccgtc	atgtgacggt	cgatattacg	aaaaaaggga	ttaccgacat	tgagccgcat	480
acgccagaga	cggttcgcca	aaaatacggc	ctgactccgg	agcaaatagt	ggatttaaaa	540
ggattgatgg	gcgataaatc	cgacaacatc	ccggcgctgc	ccggcatcgg	ggaaaaaacg	600
gcggtcaagc	tgctgaagca	atgttgtagc	gtggaaaatg	tgctcgcac	gattgatgag	660
gtgaaagggg	aaaaactgaa	agaaaacttg	cgccaacacc	gggatttagc	tctcttgagc	720
aaacagctgg	cgccattttg	ccgctgcgac	ccggttgagc	tgctcgttaga	tgacattgtc	780
tacgaaggac	aaagccgcca	aaaagtcac	gcggttatta	aaagactcgg	gtttcagtcg	840
ttcttggaaa	aaatggccgc	gccggcagcc	gaaggggaga	aaccgcttga	ggagatggag	900
tttgccatcg	ttgacgtcat	taccgaagag	atgcttgccg	acaaggcagc	gcttgctgct	960
gagggtgatg	aagaaaacta	ccacgatgcc	ccgattgtcg	gaatcgcact	agtgaacgag	1020
catgggcatg	tttttatgcg	cccggagacc	gcgctggctg	attcgcaatt	tttagcatgg	1080
cttgccgatg	aaacgaagaa	aaaaagcatg	ttgacgcca	agcgggagc	cgttgcctta	1140
aagtggaaaag	gaattgagct	tcgctggcgt	gcctttgatt	tattgtctgc	tgctattttg	1200
ctcaatccgg	ctcaagatgc	ggcgatatac	gctgcggtgg	cgaaaatgaa	acaatattga	1260
gcggtgcggt	cgatgaagc	ggctatggc	aaagcgtca	agcggctcgt	gccggacgaa	1320
cagacgcttg	ctgagcatct	cgttcgcaaa	gcggcagcca	tttgggctg	tgagcagccg	1380
tttatggacg	atgtgcgga	caacgaacaa	gatcaattat	taacgaaget	tgagcagccg	1440
ctggcggcga	ttttggctga	aatggaattc	actggggtga	acgtggatac	aaagcggctt	1500
gaacagatgg	gttcggagct	cgccgaacaa	ctgcgtgcca	tcgagcagcg	catttacgag	1560
ctagccggcc	aagagttcaa	cattaactca	ccaaaacagc	tcggagtcac	tttatttgaa	1620
aagctgcagc	taccggtgct	gaagaagacg	aaaacaggct	attcgacttc	ggctgatgtg	1680
cttgagaagc	ttgcgcgcca	tcatgaaatc	gtcgaaaaca	ttttgcatta	ccgcagctt	1740
ggcaaaactgc	aatcaacgta	tattgaagga	ttgttgaag	ttgtgcgccc	tgataccggc	1800
aaagtgcata	cgatgttcaa	ccaagcgtg	acgcaaatc	ggcggctcag	ctcggccgag	1860
ccgaacttgc	aaaacattcc	gattcggctc	gaagaggggc	ggaaaatccg	ccaagcgttc	1920
gtcccgtcag	agccggactg	gctcattttc	gccgccgatt	actcacaat	tgaattgcgc	1980
gtcctcgccc	atctcgccga	tgacgacaat	ctaattgaag	cgttccaacg	cgatttggat	2040
attcacacga	aaacggcgat	ggacattttc	catgtgagcg	aagaggaagt	cacggccaac	2100
atgcccgcgc	agtcgaaaggc	cgtaactctt	ggatctgctt	acggaattag	cgattacgga	2160
ttggcgcaaa	actgaacat	tacgcgcaaa	gaagctgccc	aatttatcga	acgttacttc	2220
gccagctttc	cgggcgtaaa	gcagtatatg	gaaaacattg	tgcaagaagc	gaaacagaaa	2280
ggatatgtga	caacgctggt	gcctcggcgc	cgctattttg	ctgatattac	aagccgcaat	2340
ttcaacgtcc	gcagttttgc	agagcggacg	gccatgaaca	cgccaattca	aggaagcggc	2400
gctgacatta	ttaaaaaagc	gatgattgat	ttagcggcac	ggctgaaaga	agagcagctt	2460
caggctcgtc	ttttgctgca	agtgcacgac	gagctcattt	tggaagcggc	aaaagaggaa	2520
attgagcgat	tatgtgagct	tgttccggaa	gtgatggagc	aggccgttac	gctccgctg	2580
ccgctgaaaag	tcgactacca	ttacggccca	acatgggatg	atgccaaata	a	2631

(continuación)

Secuencia de aminoácidos de ADN polimerasa I (polA) de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID NO: 5)

MKKKLVLIDG	NSVAYRAFFA	LPLLLHNDKGI	HTNAVYGFMT	MLNKILAEEQ	PTLLLVAFDA	60
GKTTFRHETF	QEYKGGRQQT	PELSEQFPL	LRELLKAYRI	PAYELDHIEA	DDIIGTLAAR	120
AEQEGFEVKI	ISGDRDLTQL	ASRHVTVDIT	KKGITDIEPY	TPETVREKYG	LTPEQIVDLK	180
GLMGDKSDNI	PGVPGIGKKT	AVKLLKQFGT	VENVLASIDE	VKGEKLEKLN	RQHRDLALLS	240
KQLASICRDA	PVELSLDDIV	YEQDREKVI	ALFKELGFQS	FLEKMAAPAA	EGEKPLEEME	300
FAIVDVITEE	MLADKAALVV	EVMEENYHDA	PIVGIALVNE	HGRFFMRPET	ALADSQFLAW	360
LADETKKKSM	FDKRAVVAL	KWKGIELRGV	AFDLLLAAYL	LNPAQDAGDI	AAVAKMKQYE	420
AVRSDEAVYG	KGVKRSPLPE	QTLAEHLVRK	AAAIWALEQP	FMDDLNRNEQ	DQLLTKLEQP	480
LAAILAEMEF	TGVNVDTKRL	EQMGSELAEQ	LRAIEQRIYE	LAGQEFNINS	PKQLGVILFE	540
KLQLPVLKKT	KTGYSTSADV	LEKLAPHHEI	VENILHYRQL	GKLQSTYIEG	LLKVVRPDTG	600
KVHTMFNQAL	TQTGRLLSSAE	PNLQNIPIRL	EEGRKIRQAF	VPSEPDWLIF	AADYSQIELR	660
VLAHIADDDN	LIEAFQRDL	IHTKTAMDIF	HVSEEEVTAN	MRRQAKAVNF	GIVYGISDYG	720
LAQNLNITRK	EAAEFIERYF	ASFPGVKQYM	ENIVQEAKQK	GYVTLLHRR	RYLPDITSRN	780
FNVRSAFAERT	AMNTPIQGSA	ADIKKAMID	LAARLKEEQ	QARLLLQVHD	ELILEAPKEE	840
IERLCELVPE	VMEQAVTLRV	PLKVDYHYGP	TWYDAK			876

Tabla D

Secuencia de ácido nucleico de protelomerasa de fago phi-HAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID NO: 6)

atgagcgggtg	agtcacgtag	aaaggtcgat	ttagcggaat	tgatagagtg	gttgcctcagc	60
gagatcaaag	agatcgacgc	cgatgatgag	atgccacgta	aagagaaaac	caagcgcattg	120
gcgcggtctg	cacgtagctt	caaaacgcgc	ctgcatgatg	acaagcgccg	caaggattct	180
gagcggatcg	cggtcacgac	ctttcgccgc	tacatgacag	aagcgcgcaa	ggcgggtgact	240
gcgcagaact	ggcgccatca	cagcttcgac	cagcagatcg	agcggctggc	cagccgctac	300
ccggcttatg	ccagcaagct	ggaagcgctc	ggcaagctga	ccgatatacag	cgccattcgt	360
atggcccacc	gagagctgct	cgaccagatc	cgcaacgatg	acgacgctta	tgaggacatc	420
cgggcgatga	agctggacca	tgaaatcatg	cgccacttga	cgctgagctc	tgacacgaaa	480
agcacgctgg	ctgaagagcc	cagcgagacg	ctggaagagc	gcgcggtgaa	cacggtcgag	540
atcaactacc	actggttgat	ggagacgggt	tacgagctgc	tgagtaaccg	ggagagaatg	600
gtcgatgggg	agtatcgcg	ctttttcagt	tacctagcgc	ttgggctggc	gctggccacc	660
gggctgctg	cgatcgaggt	gctgaagacc	ggacggatca	cgaaggtggg	cgagtatgag	720
ctggagttca	gcgccagggc	gaaaaagcgc	ggcggcgtcg	actatagcga	ggcttaccac	780
atttataccc	tggtgaaagc	tgacctgggt	atcgaagcgt	gggatgagct	tcgctcgctg	840
ccggaagctg	ctgagctgca	gggcatggac	aacagcgtatg	tgaaccgccc	cacggcgaag	900
acgctcaaca	cgctcactaa	gcgatctttt	aacaacgatg	agcgcgcttt	caaggacagc	960
cgggcgatct	ggcgcggtc	ggtggttgag	ctgcacttct	cgcgcgacaa	cgctgggaag	1020
aaagtcaccg	aggacgtggt	ctggcgtgag	atgctggggc	atgaggacat	ggataccag	1080
cgcagctacc	gcgctttaa	aatcgactac	gacgagccgg	atcaagccga	ccaggaagat	1140
tacgaacacg	ctagccgcct	cgccgcgctg	caggcgtg	acggccatga	gcagcttgag	1200
agcagcgacg	cccagggcgc	tgtgcatgcc	tgggtgaaag	cgagatcga	gcaggagcct	1260
gacgcgaaaa	ttacgcagtc	tctgatcagc	cgggagctgg	gctgtttatcg	ccctgccata	1320
aaagcgtacc	tgagctggc	gagagagggc	ctgcagcgc	cgaacgtcga	tctggacaag	1380
gtcgcggcgc	cagtgccgaa	ggaagtagcc	gagcgaaagc	cccggctgaa	cgccaccaca	1440
caaggggatg	gcaggtgggt	cggggtggct	tcaatcaacg	gggtggaagt	tgacaggggtg	1500
ggcaaccagg	caggccggat	cgaagcgatg	aaagcggcct	ataaagcggc	gggtggcgcg	1560
tga						1563

Secuencia de aminoácidos de protelomerasa de fago phi-HAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID NO: 7)

MSGESRRKVD	LAELIEWLLS	EIKEIDADDE	MPRKEKTKRM	ARLARSFKTR	LHDDKRRKDS	60
ERIAVTTFR	YMTEARKAVT	AQNWRHHSFD	QQIERLASRY	PAYASKLEAL	GKLTDISAIR	120
MAHRELLDQI	RNDDDAYEDI	RAMKLDHEIM	RHLTLSSAQK	STLAEASET	LEERAVNTVE	180
INYHWMETV	YELLSNRERM	VDGEYRGFFS	YLALGLALAT	GRRSIEVLKT	GRITKVG EYE	240
LEFSGQAKKR	GGVDYSEAYH	IYTLVKADLV	IEAWDELRS	PEAAELQGM	NSDVNRRTAK	300
TLNLTTKRIF	NNDERVFKDS	RAIWARLVFE	LHFSRDKRWK	KVTEDVFWRE	MLGHEDMDTQ	360
RSYRAFKIDY	DEPDQADQED	YEHASRLAAL	QALDGHEQLE	SSDAQARVHA	WVKAQIEQEP	420
DAKITQSLIS	RELGVYRPAI	KAYLELAREA	LDAPNVDLDK	VAAAVPKEVA	EAKPRLNAHP	480
QGDGRWVGVA	SINGVEVARV	GNQAGRIEAM	KAAYKAAGGR			520

Tabla E

Secuencia de ácido nucleico de protelomerasa de fago PY54 de <i>Yersinia</i> (SEQ ID NO: 8)						
atgaaaatcc	attttcgcca	tttagttagt	ggttttagtta	aagagatcga	tgaaatagaa	60
aaatcagacc	gggcgcaggg	tgacaaaact	cggcggtatc	agggcgcggc	cagaaagttc	120
aaaaatgccg	tgtttatgga	taaaccgaaa	tatcgcggta	acggtatgaa	gaatagaata	180
tcgttaacaa	catttaataa	atatttaagt	cgagcacggt	ctcggtttga	agaaaggcct	240
caccatagtt	ttcctcaatc	tatagcaact	atctcaaata	aatatcctgc	attcagcgaa	300
ataataaaaag	atctggataa	tagaccgct	catgaagtta	gaataaaaact	taaagaatta	360
ataactcatc	ttgaatccgg	tgtaattta	ttagaaaaaa	taggtagctt	agggaaaata	420
aaaccatcta	cagctaaaaa	aatagttagc	ttaaaaaaa	tgtacccatc	atgggcta	480
gatctagata	ctttaattag	tactgaagat	gctacagaat	tacaacaaa	gtagagcaa	540
gggaccgacc	tacttaacgc	attacattct	ctaaaagtaa	accatgaagt	tatgtatgca	600
ttaacgatgc	agccttctga	cagagctgca	ttaaaagcta	ggcatgacgc	tgcccttcac	660
tttaaaaagc	gtaacatcgt	acctatcgat	tatcccggct	atatgcaacg	aatgacggac	720
atactacatc	ttccagatat	agcttttgaa	gattcogatg	catcacttgc	cccttagca	780
tttgctctag	cagctgctag	cggtcgcaga	caaattgaaa	tactaattac	tggtgagttt	840
gacgccaaaa	ataaaaagcat	cattaaattt	tctggacaag	caaaaaaag	aatggccggt	900
tcaggtggac	attatgaaat	atacagtcta	attgactcag	agctattcat	tcaacgggta	960
gagtttttac	gttctcatag	ctcaatactt	cgattacaaa	atgtgaaat	agcacaatgat	1020
gaacatcgta	ctgaactatc	tgttattaac	ggttttgtag	ccaaaccttt	aatgatgca	1080
gcaaaacagt	tctttgtcga	tgacagaaga	gtatttaaag	ataccctgct	aatttacgct	1140
cgcatagcat	atgaaaaatg	gtttagaaca	gatcctcgct	gggccaagt	cgacgaagt	1200
gttttcttct	ctgaattatt	aggccatgac	gaccagata	ctcagctggc	atataaaca	1260
ttcaagctgg	taaatttcaa	tccaaaatgg	acacctaata	tatcagatga	aaacctcgg	1320
ttagctgcac	ttcaagagct	tgacaatgat	atgcccgcc	tagcacgtgg	cgatgcccga	1380
gttcgcatac	atgagtgggt	taaagagcaa	ctggcgcaga	accctgccc	aaaaataact	1440
gcataccaaa	tcaagaaaa	tttaaattgt	cgaaatgact	tggccagccg	atacatggca	1500
tggtgtgctg	acgcgctagg	ggttgttatt	ggtgatgatg	gacaggcaag	gccagaagaa	1560
ctcccacat	cgctcgtgct	tgatattaac	gctgatgaca	ctgacgctga	agaagatgaa	1620
atagaggaag	actttactga	tgaggaaata	gacgacaccg	aattcgacgt	atcagataac	1680
gccagtgatg	aagataagcc	cgaagataaa	cctcgctttg	cagcaccaat	tcgtagaagt	1740
gaggactctt	ggctgattaa	atttgaattt	gctggcaagc	aatatagctg	ggagggtaat	1800
gccgaaagtg	ttatcgatgc	gatgaaacaa	gcatggactg	aaaatatgga	gtaa	1854
Secuencia de aminoácidos de protelomerasa de fago PY54 de <i>Yersinia</i> (SEQ ID NO: 9)						
MKIHFRDLVS	GLVKEIDEIE	KSDRAQGDKT	RRYQGAARKF	KNAVFMDKRK	YRNGMKNRI	60
SLTTFNKYLS	RARSFEERL	HHSFPQSIAT	ISNKYPAFSE	IIKDLNRP	HEVRIKLKEL	120
ITHLESGVNL	LEKIGSLGKI	KPSTAKKIVS	LKKMYPWAN	DLDTLISTED	ATELQKLEQ	180
GTDLLNALHS	LKVNHEVMYA	LTMQPSDRAA	LKARHDAALH	FKKRNI	VPID YPGYMRMTD	240
ILHLPDIAFE	DSMASLAPLA	FALAAASGRR	QIEILITGEF	DAKNKSI	IKF SGQAKRMAV	300
SGGHYEIYSL	IDSELFIQRL	EFLRSHSSIL	RLQNL	IEAHD EHRTELSVIN	GFVAKPLNDA	360
AKQFFVDDRR	VFKDTRAIYA	RIAYEKWFRT	DPRWAKCDED	VFFSELLGHD	DPDTQLAYKQ	420
FKLVNFNPKW	TPNISDENPR	LAALQELDND	MPGLARGDAA	VRIHEWVKEQ	LAQNPAAKIT	480
AYQIKKNLNC	RNDLASRYMA	WCADALGVVI	GDDGQARPEE	LPPSLVLDIN	ADDTDAEED	540
IEEDFTDEEI	DDTEFDVSDN	ASDEDKPEDK	PRFAAPIRRS	EDSWLIKFEF	AGKQYSWEGN	600
AESVIDAMKQ	AWTENME					617

Tabla F

Secuencia de ácido nucleico de protelomerasa de fago phiKO2 de *Klebsiella* (SEQ ID NO: 10)

atgcgtaagg	tgaaaattgg	tgagctaate	aattcgcttg	tgagcgaggt	cgaggcaatc	60
gatgcctctg	atcgctccgca	aggcgataaa	acgaagaaaa	ttaaagccgc	agcattaaaa	120
tataagaatg	cattatttaa	tgacaaaaga	aagtttcgcg	gtaaagggtt	agaaaaaga	180
atttctgcca	acacgttcaa	ctcgtatatg	agtcgggcaa	ggaaaagatt	tgatgataga	240
ttgcatcata	actttgaaaa	gaatgtaatt	aaactatcag	aaaaatatcc	tttatatagt	300
gaagaattat	cttcgtggct	ttctatgcct	gcgcatcaa	ttagacagca	tatgtcaaga	360
ttgcaagcca	agctaaaaga	gataatgcc	ttggcagaag	acttatccaa	tataaagatt	420
ggtacaaaaa	atagcgaagc	aaaaataaat	aaactcgcta	ataaatatcc	tgaatggcaa	480
ttcgctatta	gtgatttaa	tagcgaagat	tggaggata	aaagagatta	tctttataaa	540
ctattccaac	aaggttcttc	gctcctggaa	gacttgaata	acctgaaagt	aaacctgag	600
gttctctatc	atctgcagct	tagttctgcc	gagcgaacct	ctatccagca	gcgctgggcc	660
aacgtcctca	gcgagaaaa	gcgcaacggt	gtcgtgattg	actatccgcg	ctatgacag	720
gcatctacg	atataatcaa	caagcctata	gttctgtcgc	atttgactac	tcgtcgtggt	780
atggcccgcg	tggcgctcgc	ccttgccgcg	ctatctggtc	gccgaatgat	tgaatcagtg	840
ctccagggtg	aattttccgt	cgcaggtaaa	tatacagtaa	cattcctggg	gcaagctaaa	900
aaacgctcgg	aagataaagg	tatatcaagg	aaaatatata	ccttatgcga	cgctacttta	960
tttgtagtt	tggtaaatga	acttcgctca	tgcccgcgtg	ctgcccgttt	tgatgaagta	1020
ataaaaggat	atggcgaaaa	tgacactcgc	tcagaaaatg	ggcgtattaa	tgcaattctc	1080
gctacagctt	ttaatccgtg	ggtaaaaaact	ttcttaggcg	atgaccgccc	cgtttataaa	1140
gatagccgcg	ctatttacgc	ccgtattgcc	tatgaaatgt	tcttccgctg	tgaccctcgg	1200
tggaagaatg	ttgatgagga	tgatttcttc	atggagattc	tcggccatga	cgatgaaaac	1260
acccaactgc	actataagca	gtttaaattg	gctaactctc	ccagaacatg	gcgaccaaat	1320
gtcggcgagg	agaatgcccg	cctagcggcg	ctgcaaaagc	tggatagcat	gatgccagat	1380
tttgccaggg	gcgacgccgg	ggttoggatt	catgagaccg	tgaagcagct	ggtggagcag	1440
gaccatcga	taaaaatcac	aaacagcacc	ctgcgaccgt	ttaacttcag	taccaggctg	1500
attcctcgct	acctggagtt	tgccgccgat	gcattgggcc	agttcgtcgg	tgaaaatggg	1560
caatggcaac	tgaaggatga	ggcgccctgca	atagtcctgc	ctgatgagga	aattcttgag	1620
cctatggacg	acgtcgatct	cgatgacgaa	aacctgatg	atgaaacgct	ggatgacgat	1680
gagatcgaag	tggacgaaag	cgaaggagag	gaactggagg	aagcgggcca	cgctgaagag	1740
gccgaggtgg	ctgaacagga	agagaagcac	cctggcaagc	caaactttaa	agcgcgaggg	1800
gataatggcg	atggtaccta	catggtggaa	tttgaattcg	gtggccgtca	ttacgcctgg	1860
tccggtgccg	ccggtaatcg	ggtagaggca	atgcaatctg	cctggagtg	ctacttcaag	1920
tga						1923

Secuencia de aminoácidos de protelomerasa de fago phiKO2 de *Klebsiella* (SEQ ID NO: 11)

MRKVKIGELI	NSLVSEVEAI	DASDRPQGDK	TKKIKAAALK	YKNALFNDKR	KFRGKGLEKR	60
ISANTFNSYM	SRARKRFDDR	LHHNFEKNVI	KLSEKYPLYS	EELSSWLSMP	AASIRQHMSR	120
LQAKLKEIMP	LAEDLSNIKI	GTKNSEAKIN	KLANKYPEWQ	FAISDLNSED	WKDKRDYLYK	180
LFQQGSSLLE	DLNNLKVNHE	VLYHLQLSSA	ERTSIQQRWA	NVLSEKKNRV	VVIDYPRYMQ	240
AIYDIINKPI	VSFDLTTRRG	MAPLAFALAA	LSGRMIEIM	LQGEFSVAGK	YTVTFLGQAK	300
KRSEDKGISR	KIYTLCDATL	FVSLVNELRS	CPAAADFDEV	IKGYGENDTR	SENGRINAIL	360
ATAFNPWVKT	FLGDDRRVYK	DSRAIYARIA	YEMFFRVDP	WKNVDEDEVF	MEILGHDDEN	420
TQLHYKQFKL	ANFSRTWRPN	VGEENARLAA	LQKLDSEMPD	FARGDAGVRI	HETVKQLVEQ	480
DPSIKITNST	LRPFNFSTR	IPRYLEFAAD	ALGQFVGENG	QWQLKDEAPA	IVLPDEEILE	540
PMDDVDLDE	NHDETLDDD	EIEVDESEGE	ELEEAGDAEE	AEVAEQEEKH	PGKPNFKAPR	600
DNGDGYMVE	FEFGGRHYAW	SGAAGNRVEA	MQSAWSAYFK			640

ES 2 749 629 T3

Tabla G

Secuencia de ácido nucleico de protelomerasa de fago VP882 de *Vibrio* (SEQ ID NO: 12)

atgagcggcg	aaagtagaca	aaaggtaaac	ctcgaggagt	taataaatga	gctcgtcgag	60
gaggtgaaaa	ccatcgatga	caatgaggcg	attactcggg	ctgaaaaaac	caagttgatc	120
accagggcgg	cgactaaatt	caagaccaag	ctgcacgacg	ataagcgccg	gaaggatgcg	180
accagaatcg	ctctgagcac	ctatcgtaag	tacatgacaa	tggccagggc	agcagttact	240
gagcagaact	ggaaacacca	cagtctcgag	cagcagatag	agcggctggc	caaaaagcac	300
ccgcaatacg	ctgagcagct	ggtggccatc	ggggccatgg	ataacatcac	cgagttgctc	360
ctggcgcctc	gcgacctcct	gaagagcatc	aaggacaacg	atgaagcctt	cgaggatata	420
cgcagcatga	agttagacca	cgaggtaatg	cgccatctga	cgctaccagg	tgcgcaaaag	480
gcgagactgg	cagaggaaag	cgccgaggcg	ttgaccgaga	agaaaaccgc	cacggctcgac	540
atcaactatc	acgagctgat	ggccggcgtg	gtggagctgt	tgaccaagaa	gaccaagacg	600
gtcggcagcg	acagcaccta	cagcttcagc	cgctggcgcg	ttggtattgg	cctggctacc	660
ggtcgtcgtt	ctatcgagat	actgaagcag	ggcagtttca	aaaaggtgga	tgagcagcgg	720
ctcgagttct	ctggccaagc	gaaaaagcgc	ggcggtgccg	actattcaga	gacctatacc	780
atttacacc	tggtcgactc	cgacctggta	ctgatggcgc	tgaagaacct	gcgagagttg	840
ccagaagttc	gcgactgga	tgagtacgac	caactgggcg	agattaagcg	gaacgacgcc	900
atcaataaac	gctgtgcaaa	aacgctcaac	caaaccgcca	agcagttctt	tggcagcgac	960
gagcgcgtgt	tcaaagatag	tcgtgccatc	tgggcgcgtc	tggcttatga	gttgtttttt	1020
caacgtgatc	cgcgctggaa	aaagaaagac	gaggacgttt	tctggcagga	gatgctgggc	1080
cacgaggaca	tcgagactca	gaaagcctat	aagcaattca	aggtcgacta	cagcgaacct	1140
gagcagccgg	tgacaaagcc	tggcaaatth	aagagcagag	ctgaagccct	cgcggcgctc	1200
gactcaaatg	aggacattac	cacccgctca	tccatggcca	agatccacga	ctgggtgaaa	1260
gagcgtattg	cggaagaccc	cgaggcgaac	atcacacagt	cactcatcac	ccgggaactg	1320
ggctcaggcc	gtaaggtgat	caaggactac	ctcgacctgg	ctgacgatgc	ccttgetgtg	1380
gtgaatactc	ctgtcgatga	cgcagtcgct	gaggttccag	ctgatgtgcc	ggcagcagaa	1440
aaacagccga	agaaagcgca	gaagcccaga	ctcgtggctc	accaggttga	tgatgagcac	1500
tgggaagcct	ggcgctggt	ggaaggcgag	gaggtggcca	gggtgaaaat	caagggcacc	1560
cgcgttgagg	caatgacagc	cgcatgggag	gccagccaaa	aggcactcga	tgactaa	1617

Secuencia de aminoácidos de protelomerasa de fago VP882 de *Vibrio* (SEQ ID NO: 13)

MSGESRQKVN	LEELINELVE	EVKTIDDNEA	ITRSEKTKLI	TRAATKFKTK	LHDDKRRKDA	60
TRIALSTYRK	YMTMARAATV	EQNWKHSLE	QQIERLAKKH	PQYAEQLVAI	GAMDNITELR	120
LAHRDLLKSI	KDNDEAFEDI	RSMKLDHEVM	RHLTLPSAQK	ARLAEAAEA	LTEKKTATVD	180
INYHELMAGV	VELLTKKTKT	VGSDSTYSFS	RLALGIGLAT	GRRSIEILKQ	GEFKKVDEQR	240
LEFSGQAKKR	GGADYSETYT	IYTLVDSLV	LMALKNLREL	PEVRALDEYD	QLGEIKRNDA	300
INKRCAKTLN	QTAKQFFGSD	ERVFKDSRAI	WARLAYELFF	QRDPRWKKKD	EDVFWQEMLG	360
HEDIETQKAY	KQFKVDYSEP	EQPVHKPGKF	KSRAEALAL	DSNEDITTRS	SMAKIHDWVK	420
ERIAEDPEAN	ITQSLITREL	GSGRQVIKDY	LDLADDALAV	VNTPVDDAVV	EVPADVPAAE	480
KQPKKAQKPR	LVAHQVDDEH	WEAWALVEGE	EVARVKIKGT	RVEAMTAAWE	ASQKALDD	538

ES 2 749 629 T3

Tabla H

Secuencia de ácido nucleico de represor de inmunidad secundario (cA) y telomerasa de bacteriófago N15 (telN) de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 14)

catatgcact	atatcatatc	tcaattacgg	aacatatacag	cacacaattg	cccattatac	60
gcgcgataaa	tggactattg	tgtgctgata	aggagaacat	aagcgcagaa	caatatgtat	120
ctattccggg	gttgtgttcc	tttgttattc	tgctattatg	ttctcttata	gtgtgacgaa	180
agcagcataa	ttaatcgtoa	cttgttcttt	gattgtgtta	cgatatccag	agacttagaa	240
acgggggaac	cgggatgagc	aaggtaaaaa	tcgggtgagtt	gatcaacacg	cttgtgaatg	300
aggtagaggc	aattgatgcc	tcagaccgcc	cacaaggcga	caaaacgaag	agaattaaag	360
ccgcagccgc	acggtataag	aacgcgttat	ttaatgataa	aagaaagtcc	cgtgggaaag	420
gattgcagaa	aagaataaacc	gcgaataactt	ttaacgccta	tatgagcagg	gcaagaaagc	480
ggtttgatga	taaattacat	catagctttg	ataaaaaatat	taataaatta	tcggaaaagt	540
atcctcttta	cagcgaagaa	ttatcttcat	ggctttctat	gcctacggct	aatattcgcc	600
agcacatgtc	atcgttacaa	tctaaattga	aagaataaat	gccgcttgcc	gaagagttaa	660
caaatgtaag	aataggctct	aaaggcagtg	atgcaaaaaat	agcaagacta	ataaaaaaat	720
atccagattg	gagttttgct	cttagtgatt	taaacagtga	tgattggaag	gagcgcctgt	780
actatcttta	taagttattc	caacaaggct	ctgcgttggt	agaagaacta	caccagctca	840
aggccaacca	tgaggttctg	taccatctgc	agctaagccc	tcgagagcgt	acatctatac	900
agcaacgatg	ggccgatggt	ctgcgcgaga	agaagcgtaa	tgttgtgggt	attgactacc	960
caacatacat	gcagtctatc	tatgatattt	tgaataatcc	tcgcacttta	tttagtttaa	1020
acactcgttc	tgaatggca	cctttggcct	ttgctctggc	tcggtatca	gggcaagaa	1080
tgattgagat	aatgtttcag	ggtgaatttg	ccgtttcagg	aaagtatacg	gttaatttct	1140
cagggcaagc	taaaaaacgc	tctgaagata	aaagcgtaac	cagaacgatt	tatactttat	1200
gcgaagcaaa	attattcggt	gaattattaa	cagaattgct	ttcttgctct	gctgcatctg	1260
atctcgatga	ggttggttaa	ggatatggaa	aggatgatac	aaggtctgag	aacggcagga	1320
taaagtctat	tttagcaaaa	gcatttaacc	cttgggttaa	atcatttttc	ggcgatgacc	1380
gtcgtgttta	taaagatagc	cgcgctattt	acgctcgcac	cgcttatgag	atgttcttcc	1440
gcgctgatcc	acggtggaaa	aacgctcgacg	aggatgtggt	cttcatggag	attctcggac	1500
acgacgatga	gaacacccag	ctgcactata	agcagttcaa	gctggccaac	ttctccagaa	1560
cctggcgacc	tgaagttggg	gatgaaaaca	ccaggctggg	ggctctgcag	aaactggagc	1620
atgaaatgcc	aggctttgcc	agaggtgacg	ctggcgtccg	tctccatgaa	accgttaagc	1680
agctggtgga	gcaggaccca	tcagcaaaaa	taaccaacag	cactctccgg	gcctttaaat	1740
ttagcccagc	gatgattagc	cggtagcttg	agtttgccgc	tgatgcattg	gggcagttcg	1800
ttggcgagaa	cgggcagtg	cagctgaaga	tagagacacc	tgcaatcgtc	ctgcctgatg	1860
aagaatccgt	tgagaccatc	gacgaaccgg	atgatgagtc	ccaagacgac	gagctggatg	1920
aagatgaaat	tgagctcgac	gagggtggcg	gcgatgaacc	aaccgaagag	gaagggccag	1980
aagaacatca	gccaactgct	ctaaaaccgg	tcttcaagcc	tgcaaaaaat	aacggggacg	2040
gaacgtacaa	gatagagttt	gaatacgatg	gaaagcatta	tgcttggctc	ggccccggcg	2100
atagccctat	ggccgcaatg	cgatccgcat	gggaaacgta	ctacagctaa	aagaaaagcc	2160
accggtgtta	atcgggtggct	tttttattga	ggcctgtccc	taccatccc	ctgcaagggg	2220
cgggaaggatt	aggcggaaac	tcagctgca	actacggaca	tcgccgtccc	gactgcaggg	2280
acttccccgc	gtaaagcggg	gcttaaatc	gggctggcca	accctatttt	tctgcaatcg	2340
ctggcgatgt	tagtttctgt	gatagcgttt	ccagcttttc	aatggccagc	tcaaaatgtg	2400
ctggcagcac	cttctccagt	tccgatcaa	tatcgggtgat	cggcagctct	ccacaagaca	2460
tactccggcg	accgccacga	actacatcgc	gcagcagctc	ccgttcgtag	acacgcatgt	2520
tgcccagagc	cgtttctgca	gccgttaata	tcgggcgcac	gtcggcgatg	attgcccggg	2580
gatcatccac	ggttattggg	ttcggtgatg	ggttcctgca	ggcgcggcgg	agagccatcc	2640
agacgccgct	aaccatgctg	ttacggtaact	gaaaactttg	tgctatgtcg	tttatcaggg	2700
ccgaagttct	tctttctgcc	gccagtcag	tggttcaccg	gcgttcttag	gctcaggtc	2760
gacaaaagca	tactcgcgct	ttttccggat	agctggcaga	acctcgttcg	tcaccactt	2820
gcggaaccgc	caggctgtcg	tcccctgttt	caccgcgtcg	cggcagcggg	ggattatggt	2880
gtagagacca	gattccgata	ccacatttac	ttccctggcc	atccgatcaa	gtttttgtgc	2940
ctcgggttaa	ccgagggtea	atttttcatc	atgatccagc	ttacgcaatg	catcagaagg	3000
gttggtctata	ttcaatgcag	cacagatatac	cagcgcacaa	aaccacgggt	caccaccgac	3060
aagaaccacc	cgtatagggg	ggctttcctg	aaatgaaaag	acggagagag	ccttcattgc	3120
gcctccccgg	atttcagctg	ctcagaaaag	gacagggagc	agccgcgagc	ttcctcgtg	3180

ES 2 749 629 T3

(continuación)

agttcgcg	cgacctgcag	aagttccgca	gcttcctgca	aatacagcgt	ggcctcataa	3240
ctggagatag	tgcggtgagc	agagcccaca	agcgccttcaa	cctgcagcag	gcgttcctca	3300
atcgtctcca	gcaggccctg	ggcgtttaac	tgaatctggt	tcatgcgatc	acctcgctga	3360
ccgggatacg	ggctgacaga	acgaggacaa	aacggctggc	gaactggcga	cgagcttctc	3420
gctcggatga	tgcaatggtg	gaaaggcgg	ggatatggga	ttttttgtcc	gtgcggacga	3480
cagctgcaaa	tttgaatttg	aacatggtat	gcattcctat	cttgtatagg	gtgctaccac	3540
cagagttgag	aatctctata	gggggtgtag	cccagacagg	gttctcaaca	ccggtacaag	3600
aagaaaccgg	ccaaccgaa	gttggcccca	tctgagccac	cataattcag	gtatgcgag	3660
atttaacaca	caaaaaaaca	cgctggcgcg	tgttgtgcg	ttcttgcac	tcggggttga	3720
gaggcccggc	tcgagatatt	gctgcagcgg	ggtaactcta	ccgcaaagc	agaacgcag	3780
tcaataattt	aggtggatat	tttaccctg	gaccagtcac	gtgcacaggt	gtttttatag	3840
tttgctttac	tgactgatca	gaacctgatc	agttattgga	gtccggtaat	cttattgatg	3900
accgcagcca	ccttagatgt	tgtctcaaac	cccatacggc	cacgaatgag	ccactggaac	3960
ggaatagtca	gcaggtacag	cggaacgaac	cacaaacgg	tcagacgctg	ccagaacgctc	4020
gcatcacgac	gttccatcca	ttcggattg	tcgac			4055

Secuencia de aminoácidos de telomerasa de bacteriófago N15 de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 15)

MSKVKIGELI	NTLVNEVEAI	DASDRPQGDK	TKRIKAAAAR	YKNALFNDR	KFRGKGLQKR	60
ITANTFNAYM	SRARKRFDDK	LHHSFDKNIN	KLSEKYPLYS	EELSSWLSMP	TANIRQHMSS	120
LQSKLKEIMP	LAEELSNVRI	GSKGSDAKIA	RLIKKYPDWS	FALSDLNSDD	WKERRDYLYK	180
LFQQGSALLE	ELHQLKVNHE	VLYHLQLSPA	ERTSIQQRWA	DVLREKRRNV	VVIDYPTYMQ	240
SIYDILNPA	TLFSLNTRSG	MAPLAFALAA	VSGRRMIEIM	FQGEFAVSGK	YTVNFGQAK	300
KRSEDKSVTR	TIYTLCEAKL	FVELLTELRS	CSAASDFDEV	VKGYGKDDTR	SENGRINAIL	360
AKAFNPWVKS	FFGDDRRVYK	DSRAIYARIA	YEMFFRVDPR	WKNVDEDVFF	MEILGHDDEN	420
TQLHYKQFKL	ANFSRTWRPE	VGDNTRLVA	LQKLDDEMPG	FARGDAGVRL	HETVKQLVEQ	480
DPSAKITNST	LRAFKFSPTM	ISRYLEFAAD	ALGQFVGENG	QWQLKIETPA	IVLPDEESVE	540
TIDEPDDESQ	DDELDEDEIE	LDEGGGDEPT	EEEGPEEHQP	TALKPVFKPA	KNNGDGTYKI	600
EFEYDGHKHYA	WSGPADSPMA	AMRSAWETYY	S			631

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la producción sin células *in vitro* de ADN lineal cerrado que comprende:
- 5       - amplificar ADN a partir de un molde de ADN que comprende más de una secuencia diana de protelomerasa, y  
      - poner en contacto dicho ADN amplificado con al menos una protelomerasa en condiciones que promuevan la  
      producción de ADN lineal cerrado.
- 10       2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha amplificación del molde de ADN y dicha  
      producción de ADN lineal cerrado se llevan a cabo simultáneamente o conjuntamente.
3. ADN concatémérico *in vitro*, sin células, que comprende múltiples repeticiones de una secuencia de ADN, en el  
      que dichas secuencias de ADN repetidas se separan mediante una secuencia diana de protelomerasa.
- 15       4. El ADN concatémérico *in vitro*, sin células, de la reivindicación 3 en el que dicha secuencia de ADN comprende  
      uno o más casetes de expresión.
5. El ADN concatémérico *in vitro*, sin células, de la reivindicación 4 en el que dicho casete de expresión comprende  
      un promotor eucariota unido operativamente con una secuencia que codifica un ARNm o proteína.
- 20       6. El ADN concatémérico *in vitro*, sin células, de la reivindicación 4 o reivindicación 5, en el que dicho casete de  
      expresión comprende además una secuencia de terminación de la transcripción eucariota.
7. El ADN concatémérico *in vitro*, sin células, de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el casete de  
      expresión carece de una o más secuencias bacterianas o de vector seleccionadas del grupo que consiste en:
- 25               (i) orígenes bacterianos de replicación;  
              (ii) marcadores de selección bacterianos; y  
              (iii) motivos de CpG desmetilados.
- 30       8. El ADN concatémérico *in vitro*, sin células, de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que el  
      concatémico comprende 10 o más repeticiones de dicha secuencia de ADN.
9. El ADN concatémérico *in vitro*, sin células, de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que el  
      concatémico es de al menos 5 kb de tamaño.
- 35

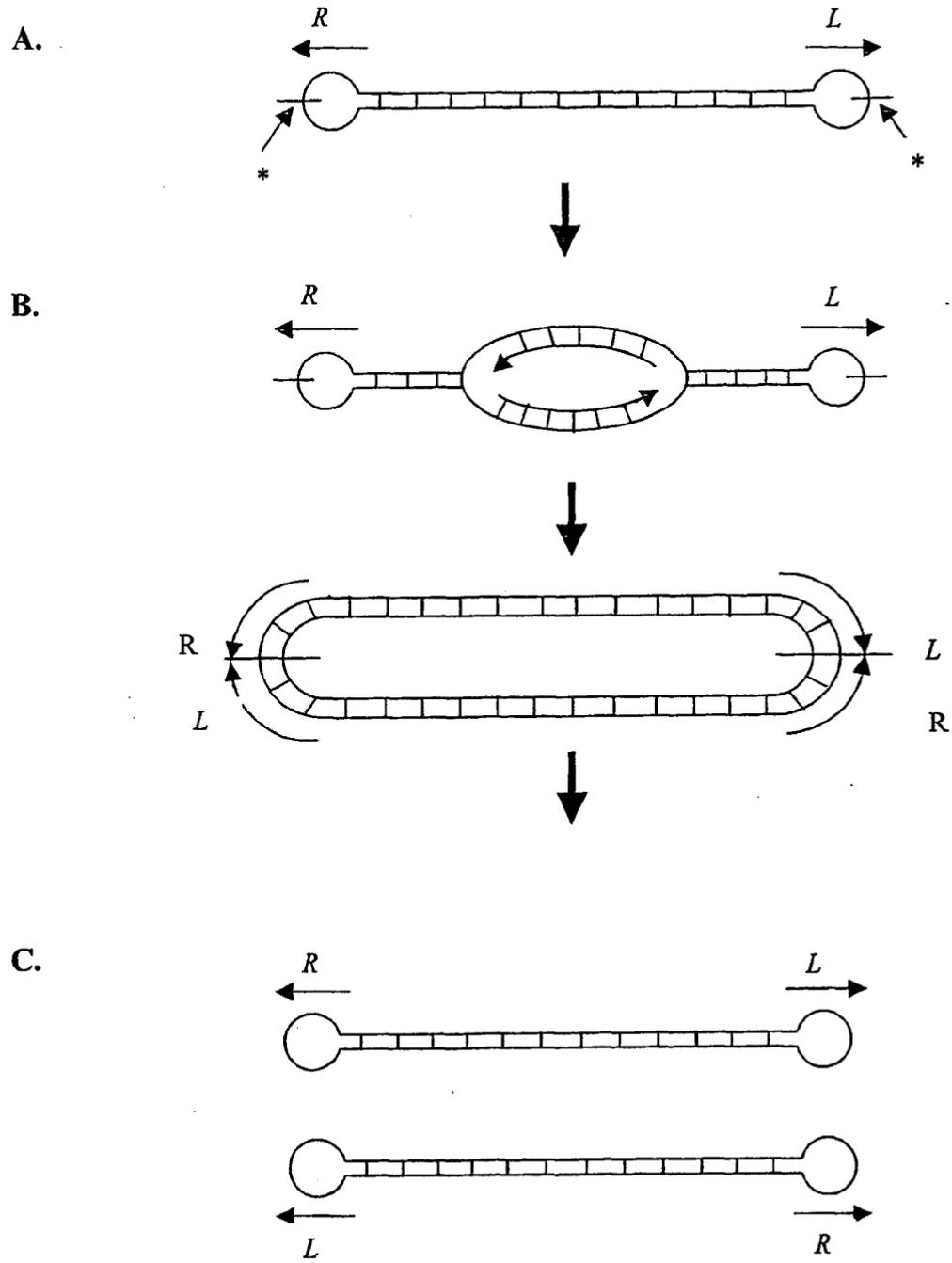


Figura 1

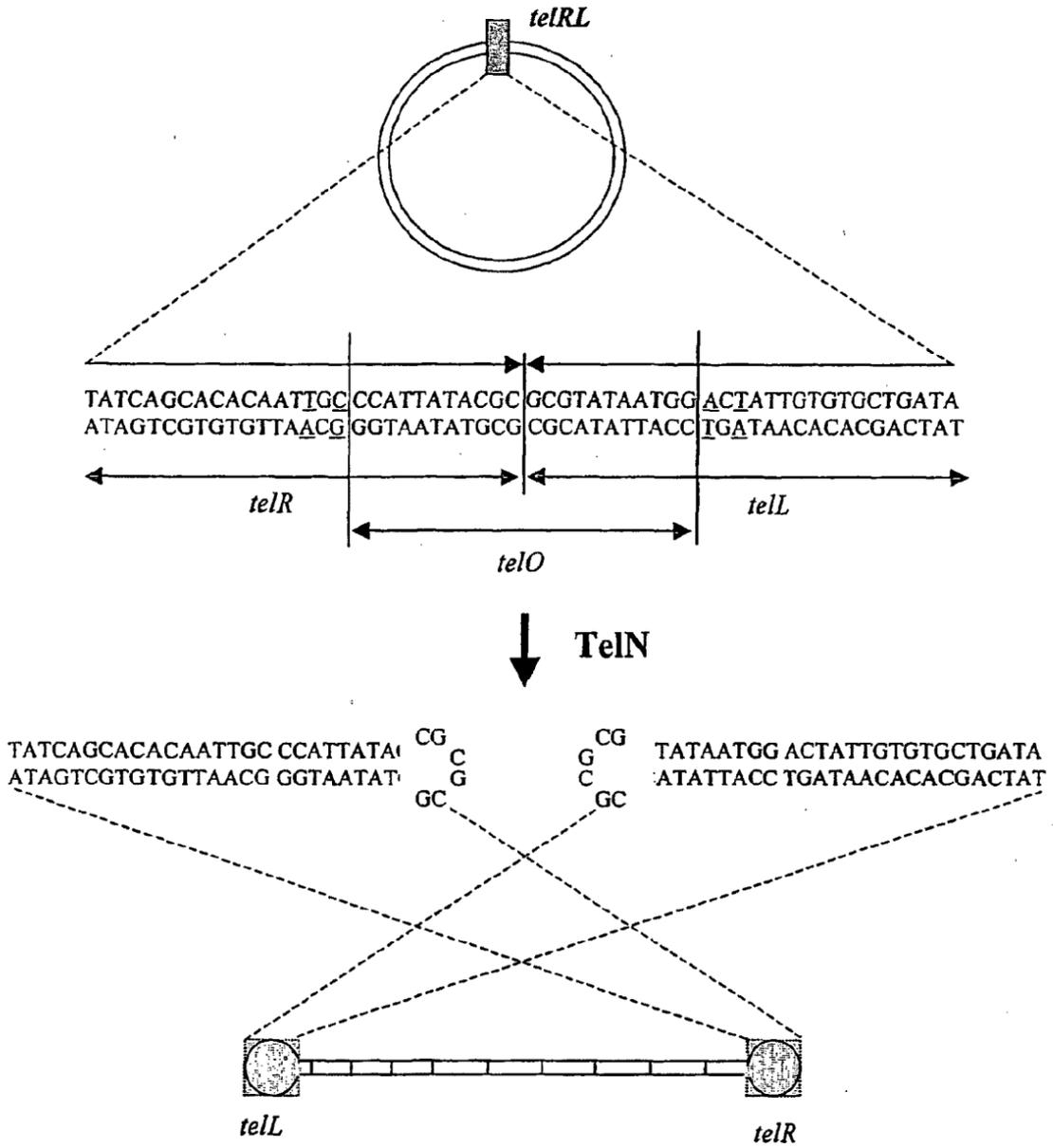


Figura 2



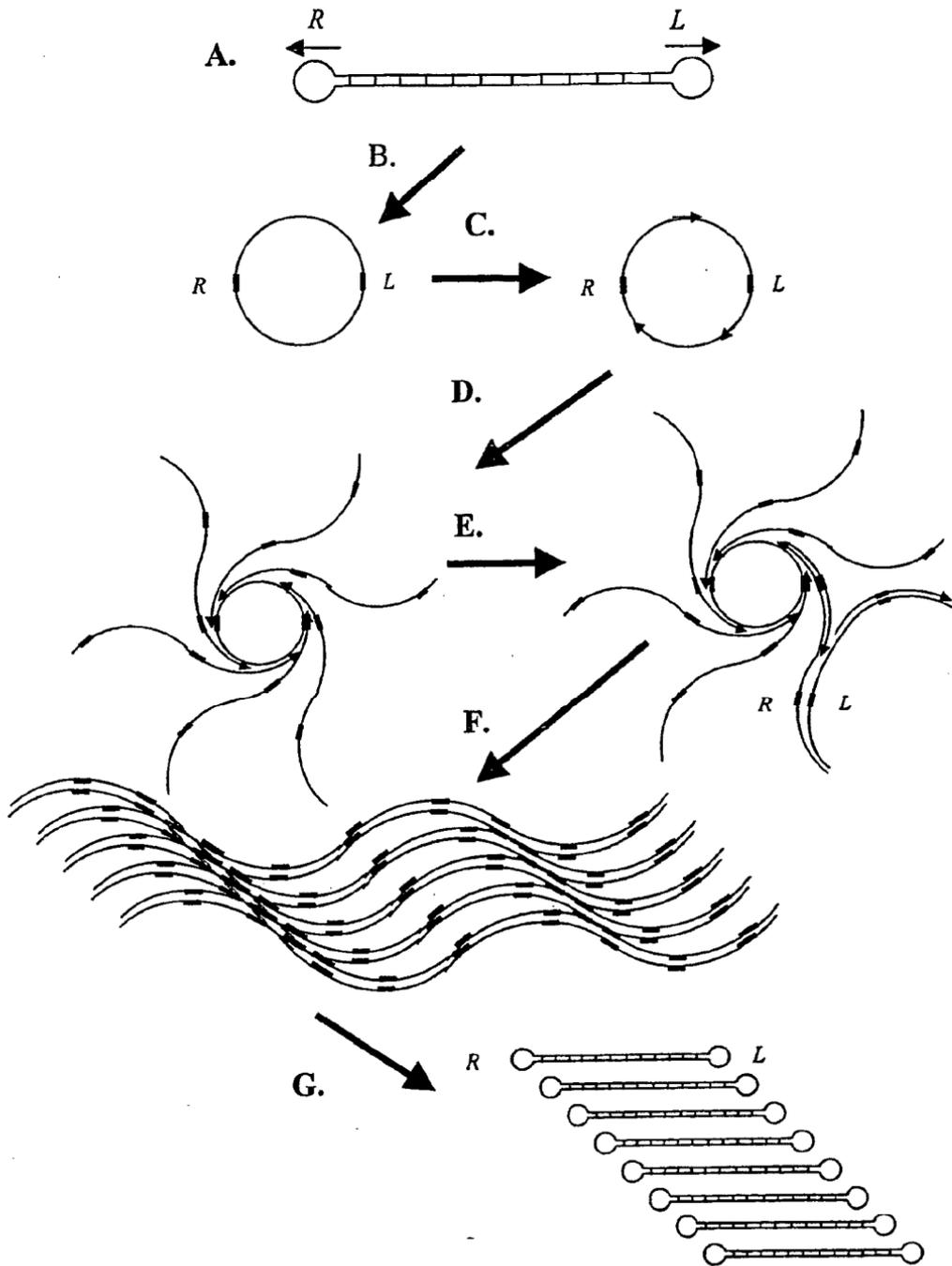


Figura 4

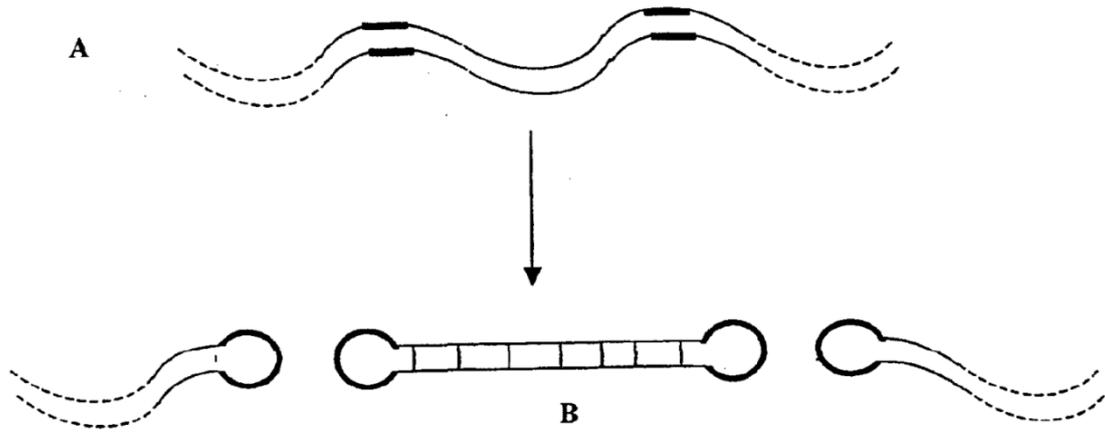
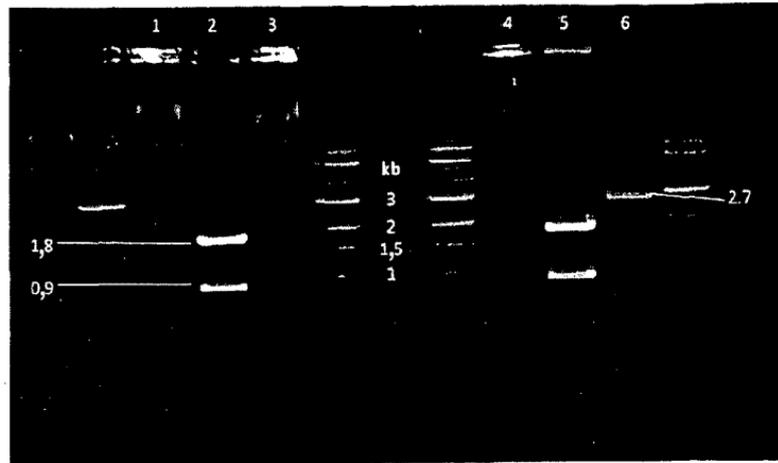
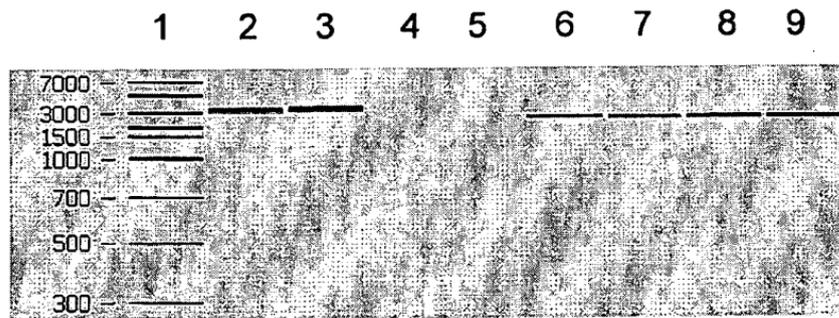


Figura 5

A.



B.



C.

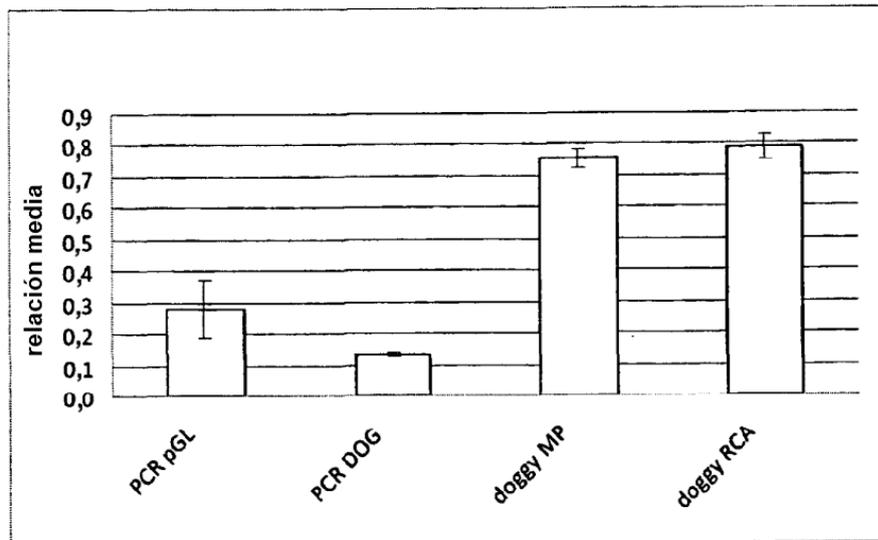


Figura 6