



**IPI**  
INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº PI 1005683-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 1005683-1

**(22) Data do Depósito:** 01/02/2010

**(43) Data da Publicação Nacional:** 02/04/2019

**(51) Classificação Internacional:** C12Q 1/68.

**(30) Prioridade Unionista:** GB 0901593.4 de 30/01/2009.

**(54) Título:** PROCESSO IN VITRO, LIVRE DE CÉLULAS, PARA A PRODUÇÃO DE UM ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) LINEAR FECHADO

**(73) Titular:** TOUCHLIGHT GENETICS LIMITED, Empresa Britânica. Endereço: 40 QUEEN ANNE STREET, LONDON, REINO UNIDO(GB), W1G9EL

**(72) Inventor:** VANESSA HILL.

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/086626 de 05/08/2010

**Código de Controle:** F05A2C333EBBEC4D 892D7CD71F6219B2

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 01/02/2010, observadas as condições legais

**Expedida em:** 12/11/2019

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**“PROCESSO *IN VITRO*, LIVRE DE CÉLULAS, PARA A PRODUÇÃO DE UM  
ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) LINEAR FECHADO”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção está relacionada a um processo *in vitro*, livre de células para a produção de ácido desoxirribonucleico (DNA) linear fechado.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] Os processos tradicionais com base em células de amplificação de DNA em grandes quantidades são caros. O uso de bactérias, por exemplo, necessita do seu crescimento em grandes volumes em fermentadores caros que precisam ser mantidos em estado estéril, a fim de evitar a contaminação da cultura. As bactérias também necessitam ser lisadas para liberar o DNA amplificado e o DNA necessita ser limpo e purificado de outros componentes bacterianos. Particularmente, ao produzirem-se vacinas de DNA ou outros agentes de DNA terapêuticos, é necessária alta pureza para eliminar a presença de endotoxinas que são tóxicas para mamíferos.

[003] Além das questões de custo, o uso de bactérias pode apresentar, em muitos casos, dificuldades para a fidelidade do processo de amplificação. No ambiente bioquímico complexo da célula bacteriana, é difícil controlar a qualidade e os rendimentos do produto de DNA desejado. A bactéria pode ocasionalmente alterar o gene necessário clonado no DNA amplificado e torná-lo inútil para o propósito necessário. Eventos de recombinação podem também gerar problemas na produção fiel de um DNA de interesse. Processos enzimáticos livres de células de amplificação de DNA evitam a necessidade de uso de uma célula hospedeira e, portanto, são vantajosos.

[004] A fabricação de cassetes de DNA medicinais, por exemplo, depende quase exclusivamente da sua inserção em plasmídeos bacterianos e

sua amplificação em processos de fermentação bacteriana.

[005] Este processo do estado da técnica atual limita as oportunidades de aprimoramento da fabricação desses remédios de DNA em uma série de formas. Além disso, o produto de plasmídeo é essencialmente uma molécula de DNA bruta pelo fato de que contém sequências de nucleotídeos não necessárias para a sua função medicinal. Consequentemente, no campo de elaboração de produtos de DNA, tais como remédios de DNA, existe a necessidade de fornecimento de métodos aprimorados de amplificação de DNA em grandes quantidades. Particularmente, existe a necessidade de fornecer métodos aprimorados de amplificação de formas específicas de DNA, tais como DNAs lineares fechados. Moléculas de DNA linear fechadas apresentam utilidade específica para aplicações terapêuticas, pois elas possuem estabilidade e segurança aprimoradas em comparação com outras formas de DNA.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[006] A presente invenção está relacionada a um processo para a produção *in vitro*, livre de células, de DNA linear covalentemente fechado (DNA linear fechado). O processo permite o aumento da produção de DNA linear covalentemente fechado em comparação com metodologias atuais que envolvem processos celulares e amplificação no interior de plasmídeos. Isso aumenta significativamente a produtividade do processo, reduzindo ao mesmo tempo o custo de purificação do produto.

[007] Segundo a presente invenção, a produção de DNA covalentemente fechado linear a partir de um molde de DNA é conduzida enzimaticamente na ausência de uma célula hospedeira. O DNA molde compreende pelo menos uma sequência alvo de protelomerase. O DNA molde é colocado em contato com pelo menos uma DNA polimerase na presença de um ou mais iniciadores sob condições que promovam a amplificação do molde.

DNA amplificado do molde é colocado em contato com pelo menos uma protelomerase sob condições que promovam a produção de DNA linear fechado.

[008] Consequentemente, a presente invenção fornece um processo *in vitro*, livre de células, para a produção de um ácido desoxirribonucleico (DNA) linear fechado, que compreende:

(a) colocar um molde de DNA que compreende pelo menos uma sequência alvo de protelomerase em contato com pelo menos uma DNA polimerase na presença de um ou mais iniciadores sob condições que promovem a amplificação de mencionado molde; e,

(b) colocar o DNA amplificado produzido na etapa (a) em contato com pelo menos uma protelomerase sob condições que promovem a produção de DNA linear fechado.

[009] A presente invenção refere-se ainda a um kit que fornece componentes necessários no processo de acordo com a presente invenção. Desta forma, a presente invenção fornece um kit que compreende pelo menos uma DNA polimerase e pelo menos uma protelomerase, e instruções para uso em um processo de acordo com a presente invenção.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[010] Figura 1: replicação de DNA covalentemente fechado linear em bacteriófagos e o papel de protelomerase. A. Ilustração de DNA covalentemente fechado linear de bacteriófago extracromossômico. \* = Centro de sequência palindrômica de telômero. A sequência R é uma repetição palindrômica invertida da sequência L. B. Replicação de DNA de bacteriófago em hospedeiro: bolha indica replicação da fita de DNA. Síntese de fita complementar em R e L gera sequências RL de fita dupla idênticas. C. Produtos formados por meio da ação de protelomerase. Protelomerase liga-se à sequência RL, corta e liga as fitas opostas no ponto central da sequência

palindrômica para reformar os telômeros e completar a replicação do DNA covalentemente fechado linear original.

[011] Figura 2: ação do fago N15 protelomerase (TelN) de *Escherichia coli* sobre DNA de fita dupla circular que contém o seu local alvo, telRL. TelRL é um palíndromo invertido com braços direito (telR) e esquerdo (telL) com 28 pb indicados pelas setas. As sequências sublinhadas indicam imperfeições no palíndromo telRL. Um palíndromo invertido perfeito TelO com 22 pb central é necessário para a ligação da enzima, TelN. TelN cliva essa sequência de 22 pb no seu ponto intermediário e liga as extremidades das fitas complementares para formar extremidades covalentemente fechadas.

[012] Figura 3: comparação de sequências alvo de protelomerase encontradas em diversos organismos. As sequências em caixas exibem a extensão da sequência palindrômica perfeita ou imperfeita. O sublinhado exhibe imperfeições no palíndromo. As sequências de pares de bases destacadas são comuns para todas as sequências alvo de protelomerase, o que indica a sua importância para a ligação e ação de protelomerase. A. Fago N15 de *Escherichia coli*. B. Fago Phi KO2 de *Klebsiella*. C. Fago Py54 de *Yersinia*. D. Fago Phi HAP de *Halomonas*. E. Fago VP882 de *Vibrio*. F. Plasmídeo lpB31.16 de *Borrelia burgdorferi*. As sequências em caixas exibem a extensão da sequência palindrômica perfeita ou imperfeita para cada bacteriófago. G. É exibida a sequência palindrômica inversa de consenso para ligação e ação de protelomerase de bacteriófagos. Esta é uma sequência de repetição invertida perfeita com 22 pares de bases (onze pares de bases em qualquer um dos lados do local cortado). A sequência de consenso é derivada dos resíduos destacados conservados exibidos para A-E. São indicados os pares de bases conservados e suas posições no palíndromo. Travessões indicam flexibilidade na composição da sequência, ou seja, em que as bases podem ser N (A, T, C ou G).

[013] Figura 4: processos específicos de amplificação *in vitro* de um DNA covalentemente fechado de fita dupla linear utilizando uma DNA polimerase de deslocamento de fita de RCA em combinação com TelN protelomerase. A. Molde de DNA linear fechado. R e L representam as sequências de DNA dos braços direito e esquerdo da sequência de ligação de TelN protelomerase. B. Desnaturação de molde inicial para formar DNA de fita simples circular. C. Ligação de iniciadores. D-E. Amplificação de círculo de rolamento a partir do molde de DNA de fita única por uma DNA polimerase de deslocamento de fitas de RCA. F. Formação de DNA de fita dupla concatemérico longo que compreende unidades isoladas de molde amplificado separadas por sequências de ligação de protelomerase (RL). G. Contato com TelN protelomerase específica de sequência de RL. Protelomerase cliva DNA concatamérico no local RL e liga fitas complementares para produzir cópias amplificadas do molde de DNA covalentemente fechado linear original.

[014] Figura 5: extirpação do cassete de DNA que expressa gene de interesse de uma molécula de DNA com fita dupla longa para criar um cassete de DNA linear fechado. A. Molécula de DNA de fita dupla linear que contém um cassete de DNA que contém um gene de interesse flanqueado por sequências alvo de protelomerase. B. Extirpação do cassete de DNA na forma de molécula de DNA covalentemente fechada linear.

[015] Figura 6: amplificação da expressão de gene relator e DNA linear fechado para cassete de expressão de “doggybone”.

[016] A. Confirmação da divisão de TelN de concatâmeros amplificados por RCA para formar DNA linear fechado por meio de eletroforese de gel de agarose. As linhas 1 a 3 exibem pUC18 amplificado por RCA. Linha 1: 3 microlitros de pUC18 amplificado por RCA não digerido. Linha 2: 2 microlitros de pUC18 amplificado por RCA digerido com Pvu1. Linha 3: 2 microlitros de pUC18 amplificado por RCA tratado com TelN (controle

negativo). As linhas 4 a 6 exibem pUC18 telRL amplificado por RCA. Linha 4: 3 microlitros de pUC18 telRL amplificado por RCA não digerido. Linha 5: 1 microlitro de pUC18 telRL amplificado por RCA digerido com Pvu1. Linha 6: 4 microlitros de pUC18 telRL amplificado por RCA tratado com TelN. É indicado o DNA linear fechado com 2,7 kb gerado mediante tratamento com TelN. As linhas laterais são marcadores do tamanho de DNA.

[017] B. Análise Lab-On-A-Chip (LOC) que demonstra a resistência de DNA linear à desnaturação térmica. Linha 1: marcador do tamanho de DNA. Linhas 2 e 3: 100 ng de PCR DOG. Linhas 4 e 5: 100 ng de PCR DOG desnaturado. Linhas 6 e 7: DNA de “doggybone” – 100 ng de pGL DOG tratado com TelN. Linhas 6 e 7: “DNA doggybone” – 100 ng de pGL DOG tratado com TelN e desnaturado.

[018] C. Validação da expressão de DNA linear fechado em células por meio de transfecção. Eixo y: indica a razão vaga-lume/Renilla; eixo x: construções de DNA linear utilizadas na transfecção. PCR pGL: fragmento de PCR linear aberto de pGL4.13 ao longo do gene luc. PCR DOG: fragmento de PCR linear aberto amplificado a partir de pGL DOG utilizando iniciadores laterais aos locais telRL. “MP doggy”: DNA linear fechado de pGL DOG isolado de DNA mini-prep digerido com PvuI (para remover DNA de vetor contaminante) e clivado com TelN. “RCA doggy”: DNA linear fechado de pGL DOG amplificado por RCA digerido com PvuI e clivado com TelN.

#### **DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIAS**

[019] SEQ ID N° 1 é a sequência de ácido nucleico de uma DNA polimerase de bacteriófago phi29 de *Bacillus*.

[020] SEQ ID N° 2 é a sequência de aminoácidos de uma DNA polimerase de bacteriófago phi29 de *Bacillus* codificada por SEQ ID N° 1.

[021] SEQ ID N° 3 é a sequência de aminoácidos de uma DNA polimerase Deep Vent de *Pyrococcus* sp.

[022] SEQ ID N° 4 é a sequência de ácido nucleico de DNA polimerase I de *Bacillus stearothermophilus*.

[023] SEQ ID N° 5 é a sequência de aminoácidos de uma DNA polimerase I de *Bacillus stearothermophilus* codificada por SEQ ID N° 4.

[024] SEQ ID N° 6 é a sequência de ácido nucleico de uma sequência de ácido nucleico de protelomerase de fago phiHAP-1 de *Halomonas*.

[025] SEQ ID N° 7 é a sequência de aminoácidos de uma sequência de protelomerase de fago phiHAP-1 de *Halomonas* codificada por SEQ ID N° 6.

[026] SEQ ID N° 8 é a sequência de ácido nucleico de uma protelomerase de fago PY54 de *Yersinia*.

[027] SEQ ID N° 9 é a sequência de aminoácidos de uma protelomerase de fago PY54 de *Yersinia* codificada por SEQ ID N° 8.

[028] SEQ ID N° 10 é a sequência de ácido nucleico de uma protelomerase de fago phiKO2 de *Klebsiella*.

[029] SEQ ID N° 11 é a sequência de aminoácidos de uma protelomerase de fago phiKO2 de *Klebsiella* codificada por SEQ ID N° 10.

[030] SEQ ID N° 12 é a sequência de ácido nucleico de uma protelomerase de fago VP882 de *Vibrio*.

[031] SEQ ID N° 13 é a sequência de aminoácidos de uma protelomerase de fago VP882 de *Vibrio* codificada por SEQ ID N° 12.

[032] SEQ ID N° 14 é a sequência de ácido nucleico de uma N15 protelomerase (telN) de bacteriófago de *Escherichia coli* e sequência de ácido nucleico repressora da imunidade secundária (cA).

[033] SEQ ID N° 15 é a sequência de aminoácidos de uma protelomerase (telN) de bacteriófago N15 de *Escherichia coli* codificada por SEQ ID N° 14.



[034] SEQ ID N° 16 é uma sequência de ácido nucleico de consenso para uma repetição invertida perfeita presente em sequências alvo de protelomerase de bacteriófago.

[035] SEQ ID N° 17 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 22 bases de fago N15 de *E. coli* e fago phiKO2 de *Klebsiella*.

[036] SEQ ID N° 18 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 22 bases de fago PY54 de *Yersinia*.

[037] SEQ ID N° 19 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 22 bases de fago phiHAP-1 de *Halomonas*.

[038] SEQ ID N° 20 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 22 bases de fago VP882 de *Vibrio*.

[039] SEQ ID N° 21 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 14 bases de plasmídeo lpB31.16 de *Borrelia burgdorferi*.

[040] SEQ ID N° 22 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 24 bases de fago VP882 de *Vibrio*.

[041] SEQ ID N° 23 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 42 bases de fago PY54 de *Yersinia*.

[042] SEQ ID N° 24 é uma sequência de ácido nucleico de repetição invertida perfeita com 90 bases de fago phiHAP-1 de *Halomonas*.

[043] SEQ ID N° 25 é uma sequência de ácido nucleico de fago N15 de *E. coli* que compreende uma sequência alvo de protelomerase.

[044] SEQ ID N° 26 é uma sequência de ácido nucleico de fago phiKO2 de *Klebsiella* que compreende uma sequência alvo de protelomerase.

[045] SEQ ID N° 27 é uma sequência de ácido nucleico de fago PY54 de *Yersinia* que compreende uma sequência alvo de protelomerase.

[046] SEQ ID N° 28 é uma sequência de ácido nucleico de fago

VP882 de *Vibrio* que compreende uma sequência alvo de protelomerase.

[047] SEQ ID N° 29 é uma sequência de ácido nucleico de plasmídeo lpB31.16 de *Borrelia burgdoferi* que compreende uma sequência alvo de protelomerase.

[048] SEQ ID N° 30 é um iniciador de oligonucleotídeo modificado utilizado na amplificação de TelN.

[049] SEQ ID N° 31 é um iniciador de oligonucleotídeo modificado utilizado na amplificação de TelN.

[050] SEQ ID N° 32 é um oligonucleotídeo sintético que contém o local de reconhecimento de TelN telRL.

[051] SEQ ID N° 33 é um oligonucleotídeo sintético que contém o local de reconhecimento de TelN telRL.

[052] SEQ ID N° 34 é uma sequência de iniciador utilizada na amplificação de PCR DOG.

[053] SEQ ID N° 35 é uma sequência de iniciador utilizada na amplificação de PCR DOG.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[054] A presente invenção está relacionada a processos de produção de DNA covalentemente fechado de fita dupla linear, ou seja, moléculas de DNA linear fechado. Moléculas de DNA linear fechado compreendem tipicamente extremidades covalentemente fechadas também descritas como circuitos de grampo de cabelo, em que o emparelhamento de bases entre fitas de DNA complementares não está presente. Os circuitos de grampo de cabelo ligam as extremidades de fitas de DNA complementares. Estruturas desse tipo formam-se tipicamente nas extremidades teloméricas de cromossomos, a fim de proteger contra a perda ou lesão de DNA cromossômico, por meio de sequestro dos nucleotídeos terminais em uma estrutura fechada. Em exemplos de moléculas de DNA linear fechado descritos

no presente, circuitos de grampo de cabelo ladeiam fitas de DNA emparelhadas com bases complementares, que formam uma estrutura em forma de "doggybone" (conforme exibido na Figura 1).

[055] Os processos de acordo com a presente invenção fornecem produção de alto rendimento de moléculas de DNA linear fechado por meio da incorporação de uma única etapa de processamento que converte DNA amplificado em DNA linear fechado. Além disso, os processos de acordo com a presente invenção são conduzidos em um ambiente *in vitro*, livre de células e, como tal, não são limitados ao uso de moldes de DNA que contêm sequências exógenas necessárias para a propagação bacteriana. Conforme indicado abaixo, o processo de acordo com a presente invenção pode ser utilizado, portanto, na produção de moléculas de DNA linear fechado que não contenham sequências de vetor problemáticas e sejam particularmente apropriadas para usos terapêuticos.

[056] Moléculas de DNA fechado possuem utilidade específica como agentes terapêuticos, ou seja, remédios de DNA que podem ser utilizados para expressar um produto genético *in vivo*. Isso ocorre porque a sua estrutura covalentemente fechada evita o ataque de enzimas tais como exonucleases, o que gera maior estabilidade e longevidade de expressão genética em comparação com moléculas de DNA "abertas" com extremidades de DNA expostas. Demonstrou-se que cassetes com extremidades abertas e fita dupla lineares são ineficientes com relação à expressão genética quando introduzidos em tecido hospedeiro. Isso foi atribuído à instabilidade de cassetes, devido à ação de exonucleases no espaço extracelular.

[057] O sequestro de extremidades de DNA no interior de estruturas covalentemente fechadas também possui outras vantagens. Evita-se a integração das extremidades de DNA com DNA genômico e as moléculas de DNA linear fechadas desta forma possuem segurança aprimorada. Além disso,

a estrutura linear fechada evita a concatamerização de moléculas de DNA no interior de células hospedeiras e, desta forma, os níveis de expressão do produto genético podem ser regulados de forma mais sensível. A presente invenção fornece um processo *in vitro*, livre de células para a produção de moléculas de DNA linear fechado que compreende a amplificação de DNA dirigida a molde e o processamento específico de DNA amplificado por meio de protelomerase.

[058] Tipicamente, o processo de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para a produção de DNA para expressão *in vitro* em uma célula hospedeira, particularmente em vacinas de DNA. Vacinas de DNA tipicamente codificam uma forma modificada de DNA de um organismo infeccioso. Vacinas de DNA são administradas a pacientes que expressam em seguida a proteína selecionada do organismo infeccioso, o que inicia uma reação imunológica contra aquela proteína que é tipicamente protetora. Vacinas de DNA podem também codificar um antígeno de tumor em uma abordagem de imunoterapia do câncer.

[059] Uma vacina de DNA pode compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica um antígeno para o tratamento ou prevenção de uma série de condições, que incluem, mas sem limitações, câncer, alergias, toxicidade e infecções por um patógeno tal como, mas sem limitações, fungos, vírus que incluem Vírus de Papiloma Humano (HPV), HIV, HSV2/HSV1, vírus da Influenza (tipos A, B e C), vírus da Pólio, vírus RSV, rinovírus, rotavírus, vírus da hepatite A, grupo de vírus de Norwalk, enterovírus, astrovírus, vírus do sarampo, vírus da parainfluenza, vírus da caxumba, vírus da varicela zóster, Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, Adenovírus, vírus da rubéola, vírus de linfoma de células T humanas tipo I (HTLV-I), vírus da Hepatite B (HBV), vírus da Hepatite C (HCV), vírus da Hepatite D, vírus da varíola, Marburg e Ebola; bactérias, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, *Neisseria*

*gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Franciscella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A e B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Haemophilus influenza* (tipo B), *Toxoplasma gondii*, *Campylobacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis* e *Actinomycosis*; patógenos fúngicos, incluindo candidíase e aspergilose; patógenos parasíticos, incluindo tênia, fascíolas, nematelmintos, amebíase, *Giardiasis*, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, *Trichomoniasis* e *Trichinosis*.

[060] Vacinas de DNA podem compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica um antígeno de um membro dos adenovirídeos (incluindo, por exemplo, um adenovírus humano), virídeos da herpes (incluindo, por exemplo, HSV-1, HSV-2, EBV, CMV e VZV), papovavirídeos (incluindo, por exemplo, HPV), virídeos da varíola (incluindo, por exemplo, varicela e vacina), parvovirídeos (incluindo, por exemplo, parvovírus B19), reovirídeos (incluindo, por exemplo, um rotavírus), coronavirídeos (incluindo, por exemplo, SARS), flavivirídeos (incluindo, por exemplo, febre amarela, vírus do oeste do Nilo, dengue, hepatite C e encefalite de carrapatos), picornavirídeos (incluindo pólio, rinovírus e hepatite A), togavirídeos (incluindo, por exemplo, vírus da rubéola), filovirídeos (incluindo, por exemplo, Marburg e Ebola), paramixovirídeos (incluindo, por exemplo, um vírus da parainfluenza, vírus sincitial respiratório, caxumba e sarampo), rabdovirídeos (incluindo, por exemplo, vírus da raiva), buniavirídeos (incluindo, por exemplo, vírus Hantaan), ortomixovirídeos (incluindo, por exemplo, vírus da influenza A, B e C), retrovirídeos (incluindo, por exemplo, HIV e HTLV) e hepadnavirídeos (incluindo, por exemplo, hepatite B).

[061] O antígeno pode ser de um patógeno responsável por uma doença veterinária e, particularmente, pode ser de um patógeno viral, incluindo,

por exemplo, um retrovírus (tal como doença de cavalos africanos ou vírus da língua azul) e vírus da herpes (incluindo herpes de equinos). O antígeno pode ser do vírus da doença dos pés e da boca, vírus da encefalite de carrapatos, vírus da dengue, SARS, vírus do oeste do Nilo e vírus Hantaan. O antígeno pode ser de um vírus da imunodeficiência humana e pode ser, por exemplo, de SIV ou um vírus da imunodeficiência felina.

[062] As vacinas de DNA produzidas por meio do processo de acordo com a presente invenção podem também compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica antígenos de tumores. Exemplos de antígenos associados a tumores incluem, mas sem limitações, antígenos de testes de câncer tais como membros da família MAGE (MAGE 1, 2, 3 etc.), NY-ESO-1 e SSX-2, antígenos de diferenciação tais como tirosinase, gp100, PSA, Her-2 e CEA, autoantígenos que sofreram mutação e antígenos de tumores virais tais como E6 e/ou E7 de tipos de HPV oncogênico. Exemplos adicionais de antígenos de tumores específicos incluem MART-1, Melan-A, p97, beta-HCG, GaINAc, 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 com alto peso molecular, K19, Tyr1, Tyr2, membros da família genética de pMel 17, c-Met, PSM (antígeno de mucina da próstata), PSMA (antígeno de membrana específico da próstata), proteína de secreção da próstata, alfafetoproteína, antígeno CA125, CA19.9, TAG-72, BRCA-1 e BRCA-2.

[063] Além disso, o processo de acordo com a presente invenção pode produzir outros tipos de moléculas de DNA terapêuticas, tais como as utilizadas em terapia genética. Essas moléculas de DNA podem ser utilizadas, por exemplo, para expressar um gene funcional em que um paciente possui um distúrbio genético causado por uma versão disfuncional daquele gene. Exemplos dessas doenças incluem distrofia muscular de Duchenne,

fibrose cística, mal de Gaucher e uma deficiência de adenosina desaminase (ADA). Outras doenças nas quais a terapia genética pode ser útil incluem doenças inflamatórias, doenças autoimunes, crônicas e infecciosas, incluindo doenças tais como AIDS, câncer, doenças neurológicas, doenças cardiovasculares, hipercolesterolêmia, vários distúrbios do sangue, incluindo anemias, talassemia e hemofilia, e enfisema. Para o tratamento de tumores sólidos, podem ser expressos genes que codificam peptídeos tóxicos (ou seja, agentes quimioterapêuticos tais como rícino, toxina de difteria e fator de veneno de cobra), genes supressores de tumores tais como p53, genes que codificam sequências de mRNA que possuem sentido contrário de oncogenes de transformação, peptídeos antineoplásicos tais como fator de necrose de tumores (TNF) e outras citocinas, ou mutantes negativos transdominantes de oncogenes de transformação.

[064] Também são contemplados outros tipos de moléculas de DNA terapêutico para produção por meio do processo de acordo com a presente invenção. Moléculas de DNA que são transcritas em uma forma de RNA ativo, tais como um RNA interferente pequeno (siRNA), por exemplo, podem ser produzidas segundo o processo de acordo com a presente invenção.

[065] Em realizações dirigidas à produção de moléculas de DNA que possuem utilidade terapêutica, o molde de DNA compreenderá tipicamente um cassete de expressão que compreende um ou mais elementos promotores ou amplificadores e um gene ou outra sequência de codificação que codifica um mRNA ou proteína de interesse. Em realizações preferidas dirigidas à geração de moléculas de vacina de DNA ou moléculas de DNA para terapia genética, o molde de DNA compreende um cassete de expressão que consiste de um promotor eucariótico ligado operativamente a uma sequência que codifica uma proteína de interesse e, opcionalmente, uma sequência

eucariótica e/ou aprimorada de terminação de transcrição. Tipicamente, o molde de DNA pode apresentar-se na forma de um vetor comumente utilizado para abrigar um gene, tal como um elemento genético extracromossômico como um plasmídeo.

[066] “Promotor” é uma sequência de nucleotídeos que inicia e regula a transcrição de um polinucleotídeo. Os promotores podem incluir promotores indutíveis (nos quais a expressão de uma sequência de polinucleotídeos ligada operativamente ao promotor é induzida por um analisado, cofator, proteína reguladora etc.), promotores reprimíveis (em que a expressão de uma sequência de polinucleotídeos ligada operativamente ao promotor é reprimida por um analisado, cofator, proteína reguladora etc.) e promotores constitutivos. Pretende-se que a expressão “promotor” ou “elemento de controle” inclua regiões promotoras de comprimento total e segmentos funcionais (tais como que controlam a transcrição ou a tradução) dessas regiões.

[067] “Ligado operativamente” designa uma disposição de elementos em que os componentes assim descritos são configurados de forma a desempenhar a sua função habitual. Desta forma, um dado promotor ligado operativamente a uma sequência de ácido nucleico é capaz de afetar a expressão daquela sequência quando as enzimas apropriadas estiverem presentes. O promotor não necessita ser contíguo com a sequência, desde que sirva para dirigir a sua expressão. Desta forma, por exemplo, a sequências transcritas, mas não traduzidas intervenientes podem estar presentes entre a sequência promotora e a sequência de ácido nucleico e a sequência promotora pode ainda ser considerada “ligada operativamente” à sequência de codificação. Desta forma, a expressão “ligado operativamente” destina-se a englobar qualquer espaçamento ou orientação do elemento promotor e da sequência de DNA de interesse que permita o início da transcrição da



sequência de DNA de interesse mediante reconhecimento do elemento promotor por um complexo de transcrição.

[068] Segundo a presente invenção, moléculas de DNA linear fechado são geradas pela ação de protelomerase sobre DNA amplificado de um molde de DNA que compreende pelo menos uma sequência alvo de protelomerase. Uma sequência alvo de protelomerase é qualquer sequência de DNA cuja presença em um molde de DNA permite a sua conversão em um DNA linear fechado pela atividade enzimática de protelomerase. Em outras palavras, a sequência alvo de protelomerase é necessária para a divisão e religação de DNA de fita dupla por protelomerase, para formar DNA linear covalentemente fechado.

[069] Tipicamente, uma sequência alvo de protelomerase compreende qualquer sequência palindrômica perfeita, ou seja, qualquer sequência de DNA de fita dupla que possui simetria rotacional dobrada, também descrita no presente como repetição invertida perfeita. Conforme exibido na Figura 3, as sequências alvo de protelomerase de diversos bacteriófagos mesofílicos e um plasmídeo bacteriano compartilham a característica comum de compreenderem uma repetição invertida perfeita. O comprimento da repetição invertida perfeita difere dependendo do organismo específico. Em *Borrelia burgdorferi*, a repetição invertida perfeita possui quatorze pares de bases de comprimento. Em diversos bacteriófagos mesofílicos, a repetição invertida perfeita possui 22 pares de bases de comprimento ou mais. Também em alguns casos, tais como *E. coli* N15, o palíndromo invertido perfeito central é flanqueado por sequências de repetição invertidas, ou seja, que fazem parte de um palíndromo invertido imperfeito maior (vide as Figuras 2 e 3; as bases sublinhadas indicam onde é interrompida a simetria das repetições invertidas).

[070] Uma sequência alvo de protelomerase utilizada na

presente invenção compreende preferencialmente uma sequência palindrômica de fita dupla (repetição invertida perfeita) com pelo menos quatorze pares de bases de comprimento. Sequências de repetição invertidas perfeitas preferidas incluem as sequências de SEQ ID N° 16 a 21 e suas variantes. SEQ ID N° 16 (NCATNNTANNCGNNTANNATGN) é uma sequência de consenso com 22 bases para uma repetição invertida perfeita de bacteriófagos mesofílicos. Conforme exibido na Figura 3, pares de bases da repetição invertida perfeita são conservados em certas posições entre diferentes bacteriófagos, embora a flexibilidade de sequência seja possível em outras posições. Desta forma, SEQ ID N° 16 é uma sequência de consenso mínima de uma sequência de repetição invertida perfeita para uso com uma protelomerase de bacteriófago no processo de acordo com a presente invenção.

[071] Dentro do consenso definido por SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 (CCATTATACGCGCGTATAATGG) é uma sequência de repetição invertida perfeita particularmente preferida para uso com fago N15 de *E. coli* (SEQ ID N° 15) e protelomerases de fago Phi KO2 de *Klebsiella* (SEQ ID N° 11). Também dentro do consenso definido por SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18 a 20:

SEQ ID N° 18 (GCATACTACGCGCGTAGTATGC),

SEQ ID N° 19 (CCATACTATACGTATAGTATGG),

SEQ ID N° 20 (GCATACTATACGTATAGTATGC),

são sequências de repetição invertidas perfeitas particularmente preferidas para uso, respectivamente, com protelomerases de fago PY54 de *Yersinia* (SEQ ID N° 9), fago phiHAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID N° 7) e fago VP882 de *Vibrio* (SEQ ID N° 13). SEQ ID N° 21 (ATTATATATATAAT) é uma sequência de repetição invertida perfeita particularmente preferida para uso com uma protelomerase de *Borrelia burgdorferi*. Esta sequência de repetição invertida perfeita é de um plasmídeo covalentemente fechado linear, lpB31.16, compreendido em *Borrelia burgdorferi*. Essa sequência de quatorze bases é

mais curta que a repetição invertida perfeita de consenso com 22 pb para bacteriófagos (SEQ ID N° 16), o que indica que protelomerasas bacterianas podem diferir de necessidades de sequência alvo específicas para protelomerasas de bacteriófagos. Todas as sequências alvo de protelomerase compartilham, entretanto, o motivo estrutural comum de uma repetição invertida perfeita.

[072] A sequência de repetição invertida perfeita pode conter mais de 22 pb de comprimento, dependendo das necessidades da protelomerase específica utilizada no processo de acordo com a presente invenção. Desta forma, em algumas realizações, a repetição invertida perfeita pode conter pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 60, pelo menos 80 ou pelo menos 100 pares de bases de comprimento. Exemplos dessas sequências de repetição invertidas perfeitas incluem SEQ ID N° 22 a 24 e suas variantes.

SEQ ID N° 22 (GGCATACTATACGTATAGTATGCC)

SEQ ID N° 23

(ACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGT)

SEQ ID N° 24

(CCTATATTGGGCCACCTATGTATGCACAGTTGCCCCATACTATACGTATAGTATGGGCGAACTGTGCATACATAGGTGGCCCAATATAGG)

[073] SEQ ID N° 22 a 24 e suas variantes são particularmente preferidas para uso, respectivamente, com protelomerasas de fago VP882 de *Vibrio* (SEQ ID N° 13), fago PY54 de *Yersinia* (SEQ ID N° 9) e fago phi HAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID N° 7).

[074] A repetição invertida perfeita pode ser flanqueado por sequências de repetição invertida adicionais. As repetições invertidas laterais podem ser repetições perfeitas ou imperfeitas, ou seja, podem ser completamente simétricas ou parcialmente simétricas. As repetições invertidas laterais podem ser contíguas ou não contíguas com o palíndromo central. A

sequência alvo de protelomerase pode compreender uma sequência de repetição invertida imperfeita que compreende uma sequência de repetição invertida perfeita com pelo menos quatorze pares de bases de comprimento. Um exemplo é SEQ ID N° 29. A sequência de repetição invertida imperfeita pode compreender uma sequência de repetição invertida perfeita com pelo menos 22 pares de bases de comprimento. Um exemplo é SEQ ID N° 25.

[075] Sequências alvo de protelomerase particularmente preferidas compreendem as sequências de SEQ ID N° 25 a 29 ou suas variantes.

SEQ ID N° 25

(TATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTA  
TTGTGTGCTGATA)

SEQ ID N° 26

(ATGCGCGCATCCATTATACGCGCGTATAATGGCGATAATACA)

SEQ ID N° 27

(TAGTCACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAAT  
AGGTTACTG)

SEQ ID N° 28

(GGGATCCCGTTCCATACATACATGTATCCATGTGGCATACTAT  
ACGTATAGTATGCCGATGTTACATATGGTATCATTCGGGATCCCGTT)

SEQ ID N° 29

(TACTAAATAAATATTATATATATAATTTTTTATTAGTA)

[076] As sequências de SEQ ID N° 25 a 29 compreendem sequências de repetição invertida perfeita conforme descrito acima e compreendem adicionalmente sequências laterais dos organismos relevantes. Uma sequência alvo de protelomerase que compreende a sequência de SEQ ID N° 25 ou uma de suas variantes é preferida para uso em combinação com N15 TelN protelomerase de *E. coli* de SEQ ID N° 15 e suas variantes. Uma

sequência alvo de protelomerase que compreende a sequência de SEQ ID N° 26 ou uma de suas variantes é preferida para uso em combinação com protelomerase de fago Phi K02 de *Klebsiella* de SEQ ID N° 11 e suas variantes. Uma sequência alvo de protelomerase que compreende a sequência de SEQ ID N° 27 ou uma de suas variantes é preferida para uso em combinação com protelomerase de fago PY54 de *Yersinia* de SEQ ID N° 9 e suas variantes. Uma sequência alvo de protelomerase que compreende a sequência de SEQ ID N° 28 ou uma de suas variantes é preferida para uso em combinação com protelomerase de fago VP882 de *Vibrio* de SEQ ID N° 13 e suas variantes. Uma sequência alvo de protelomerase que compreende a sequência de SEQ ID N° 29 ou uma de suas variantes é preferida para uso em combinação com uma protelomerase de *Borrelia burgdorferi*.

[077] Variantes de quaisquer das sequências alvo palíndromos ou de protelomerase descritas acima incluem seus homólogos ou mutantes. Os mutantes incluem truncagens, substituições ou exclusões com relação à sequência nativa. Uma sequência variante é qualquer sequência cuja presença no molde de DNA permite a sua conversão em um DNA linear fechado pela atividade enzimática de protelomerase. Isso pode ser facilmente determinado pelo uso de um teste apropriado de formação de DNA linear fechado. Pode-se utilizar qualquer teste apropriado descrito na técnica. Um exemplo de teste apropriado é descrito em Deneke et al, *PNAS* (2000) 97, 7721-7726. Preferencialmente, a variante permite ligação e atividade de protelomerase que é comparável com a observada com a sequência nativa. Exemplos de variantes preferidas de sequências de palíndromos descritas no presente incluem sequências de palíndromos truncadas que preservam a estrutura de repetição perfeita e permanecem capazes de permitir a formação de DNA linear fechado. Sequências alvo de protelomerase variantes podem, entretanto, ser modificadas de tal forma que não mais preservem um palíndromo perfeito,

desde que sejam capazes de agir como substratos para a atividade de protelomerase.

[078] Dever-se-á compreender que os técnicos no assunto seriam facilmente capazes de identificar sequências alvo de protelomerase apropriadas para uso na presente invenção com base nos princípios estruturais descritos acima. Possíveis sequências alvo de protelomerase podem ser selecionadas pela sua capacidade de promover a formação de DNA linear fechado utilizando os testes descritos acima.

[079] O molde de DNA pode compreender mais de uma sequência alvo de protelomerase, tal como duas, três, quatro, cinco, dez ou mais sequências alvo de protelomerase. O uso de diversas sequências alvo de protelomerase pode permitir a extirpação de DNAs lineares fechados curtos que compreendem sequências de interesse de uma molécula de DNA maior. Particularmente, uma ou mais sequências de interesse no molde de DNA podem ser flanqueadas em qualquer dos lados (ou seja, 5' e 3') por uma sequência alvo de protelomerase. As duas sequências de protelomerase laterais podem mediar em seguida a extirpação de cada sequência curta de interesse do DNA amplificado na forma de DNA linear fechado, sujeito à ação de protelomerase (conforme exibido na Figura 5). O molde de DNA pode compreender uma ou mais sequências de interesse (preferencialmente cassetes de expressão) flanqueadas sobre qualquer dos lados por sequências alvo de protelomerase. O molde de DNA pode compreender duas, três, quatro, cinco ou mais sequências de interesse flanqueadas por sequências alvo de protelomerase conforme descrito acima.

[080] Em uma realização preferida, o processo de acordo com a presente invenção utiliza um molde de DNA que compreende um cassete de expressão flanqueado sobre qualquer dos lados por uma sequência alvo de protelomerase. O cassete de expressão compreende preferencialmente um

promotor eucariótico ligado operativamente a uma sequência de codificação de interesse e, opcionalmente, uma sequência eucariótica de terminação de transcrição. Nesta realização, após a amplificação do DNA molde e contato com protelomerase de acordo com a presente invenção, o cassete de expressão é liberado do molde amplificado na forma de DNA linear fechado. Sequências desnecessárias no DNA molde são simultaneamente excluídas como resultado do produto.

[081] Essas sequências exógenas ou desnecessárias (também descritas como sequências de vetor ou bacterianas) podem incluir origens de replicação bacterianas, marcadores de seleção bacterianos (tais como genes de resistência a antibióticos e dinucleotídeos de CpG não metilados). A exclusão dessas sequências cria um cassete de expressão “mínimo” que não contém material genético exógeno. Além disso, sequências bacterianas do tipo descrito acima podem ser problemáticas em algumas abordagens terapêuticas. Dentro de uma célula de mamífero, por exemplo, DNA de plasmídeo/bacteriano pode causar o desligamento do gene clonado, de tal forma que não possa ser atingida a expressão sustentada da proteína de interesse. Além disso, genes de resistência a antibióticos utilizados em propagação bacteriana podem causar risco à saúde humana. Adicionalmente, DNA de vetor/plasmídeo bacteriano pode acionar uma reação imunológica não específica indesejada. Uma característica específica de sequências de DNA bacteriano, a presença de dinucleotídeos de citosina-guanina não metilada, tipicamente conhecidos como motivos CpG, pode também gerar reações imunológicas indesejadas.

[082] Em algumas realizações, particularmente em que o produto de DNA linear fechado é uma vacina de DNA, os motivos CpG podem ser retidos na sequência do produto. É por isso que eles podem possuir um efeito adjuvante benéfico sobre a reação imunológica à proteína codificada.

[083] Desta forma, a presente invenção fornece um processo *in*

*vitro* para a produção de um DNA de cassete de expressão linear fechado. Este processo compreende (a) contato de um molde de DNA que compreende pelo menos um cassete de expressão flanqueado sobre qualquer lado por uma sequência alvo de protelomerase com pelo menos uma DNA polimerase na presença de um ou mais iniciadores sob condições que promovam a amplificação do mencionado molde; e (b) contato de DNA amplificado produzido em (a) com pelo menos uma protelomerase sob condições que promovam a formação de um DNA de cassete de expressão linear fechado. O produto de DNA de cassete de expressão linear fechado pode compreender, consistir ou consistir essencialmente de um promotor eucariótico ligado operativamente a uma sequência de codificação de interesse e, opcionalmente, uma sequência eucariótica de terminação de transcrição. O produto de DNA de cassete de expressão linear fechado pode ainda não conter uma ou mais sequências de vetor ou bacterianas, tipicamente selecionadas a partir do grupo que consiste de: (i) origens de replicação bacterianas; (ii) marcadores de seleção bacterianos (tipicamente genes de resistência a antibióticos) e (iii) motivos CpG não metilados.

[084] Conforme descrito acima, qualquer molde de DNA que compreenda pelo menos uma sequência alvo de protelomerase pode ser amplificado segundo o processo de acordo com a presente invenção. Desta forma, embora seja preferida a produção de vacinas de DNA e outras moléculas de DNA terapêuticas, o processo de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para produzir qualquer tipo de DNA linear fechado. O molde de DNA pode ser um DNA de fita dupla (ds) ou de fita simples (ss). Um molde de DNA de fita dupla pode ser um DNA de fita dupla circular aberto, um DNA de fita dupla circular fechado, um DNA de fita dupla linear aberto ou um DNA de fita dupla linear fechado. Preferencialmente, o molde é um DNA de fita dupla circular fechado. Moldes de dsDNA circulares fechados são



particularmente preferidos para uso com RCA DNA polimerases. Um molde de dsDNA circular pode apresentar-se na forma de plasmídeo ou outro vetor tipicamente utilizado para abrigar um gene para propagação bacteriana. Desta forma, o processo de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para amplificar qualquer plasmídeo disponível comercialmente ou outro vetor, tal como um remédio de DNA disponível comercialmente, e converter em seguida o DNA de vetor amplificado em DNA linear fechado.

[085] Pode-se utilizar um dsDNA circular aberto como molde em que a DNA polimerase é uma polimerase de deslocamento de fitas que pode iniciar a amplificação a partir de uma fita de DNA incrustada. Nesta realização, o molde pode ser previamente incubado com uma ou mais enzimas que incrustam uma fita de DNA no molde em um ou mais locais. Pode-se também utilizar um dsDNA linear fechado como molde. O molde de dsDNA linear fechado (material de partida) pode ser idêntico ao produto de DNA linear fechado. Quando for utilizado um DNA linear fechado como molde, ele pode ser incubado sob condições de desnaturação para formar um DNA circular com fita simples antes ou durante condições que promovam a amplificação do DNA molde.

[086] Conforme descrito acima, o molde de DNA compreende tipicamente um cassete de expressão conforme descrito acima, ou seja, que compreende, consiste ou consiste essencialmente de um promotor eucariótico ligado operativamente a uma sequência que codifica uma proteína de interesse e, opcionalmente, uma sequência eucariótica de terminação de transcrição. Opcionalmente, o cassete de expressão pode ser um cassete de expressão mínima conforme definido acima, ou seja, que não contém uma ou mais sequências de vetor ou bacterianas, tipicamente selecionadas a partir do grupo que consiste de: (i) origens de replicação bacterianas; (ii) marcadores de seleção bacterianos (tipicamente genes de resistência a antibióticos) e (iii)

motivos CpG não metilados.

[087] O molde de DNA pode ser fornecido em quantidade suficiente para uso no processo por meio de qualquer método conhecido na técnica. O molde de DNA pode ser produzido, por exemplo, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR). Quando o molde de DNA for um dsDNA, ele pode ser fornecido para a etapa de amplificação na forma de fitas simples desnaturadas por meio de incubação anterior sob temperatura de pelo menos 94 °C. Desta forma, o processo de acordo com a presente invenção compreende preferencialmente uma etapa de desnaturação de um molde de dsDNA para fornecer DNA de fita única. Alternativamente, o molde de dsDNA pode ser fornecido em forma de fita dupla. O molde de DNA, no todo ou em uma parte selecionada, pode ser amplificado na reação.

[088] O molde de DNA é colocado em contato com pelo menos uma DNA polimerase sob condições que promovam a amplificação do mencionado molde. Pode ser utilizada qualquer DNA polimerase. Qualquer DNA polimerase disponível comercialmente é apropriada para uso no processo de acordo com a presente invenção. Podem ser utilizadas duas, três, quatro, cinco ou mais DNA polimerases diferentes, tais como uma que forneça uma função de conferência e uma ou mais outras que não o fazem. Podem ser utilizadas DNA polimerases que possuem diferentes mecanismos, tais como polimerases do tipo deslocamento de fita e DNA polimerases que replicam DNA por meio de outros métodos. Um exemplo apropriado de uma DNA polimerase que não possui atividade de deslocamento de fitas é T4 DNA polimerase.

[089] Prefere-se que uma DNA polimerase seja altamente estável, de tal forma que a sua atividade não seja substancialmente reduzida por incubação prolongada sob condições de processo. A enzima possui preferencialmente, portanto, meia-vida longa sob uma série de condições de

processo, que incluem, mas sem limitações, temperatura e pH. Também se prefere que uma DNA polimerase possua um ou mais características apropriadas para um processo de fabricação. A DNA polimerase possui preferencialmente alta fidelidade, por exemplo, apresentando atividade de conferência. Além disso, prefere-se que uma DNA polimerase exiba alta capacidade de processamento, alta atividade de deslocamento de fitas e baixo Km para dNTPs e DNA. Uma DNA polimerase pode ser capaz de utilizar DNA circular e/ou linear como molde. A DNA polimerase pode ser capaz de utilizar ddsDNA ou ssDNA como molde. Prefere-se que uma DNA polimerase não exiba atividade de exonuclease não específica.

[090] Os técnicos no assunto podem determinar se uma dada DNA polimerase exibe características conforme definido acima por meio de comparação com as propriedades exibidas por DNA polimerases disponíveis comercialmente, tais como phi29, DeepVent® e DNA polimerase I de *Bacillus stearothermophilus* (Bst), SEQ ID N° 2, 3 e 5, respectivamente. DNA polimerase I de Bst é disponível comercialmente por meio da New England Biolabs Inc. Referência à alta capacidade de processamento indica tipicamente o número médio de nucleotídeos adicionado por uma enzima DNA polimerase por associação/dissociação com o molde, ou seja, o comprimento de extensão de iniciadores, obtido a partir de um único evento de associação.

[091] São preferidas polimerases do tipo deslocamento de fita. As polimerases do tipo deslocamento de fita preferidas são Phi 29 (SEQ ID N° 2), Deep Vent® (SEQ ID N° 3) e DNA polimerase I de Bst (SEQ ID N° 5) ou quaisquer de suas variantes. Variantes de SEQ ID N° 2, 3 e 5 podem ser definidas abaixo com relação a enzimas de protelomerase. A expressão "deslocamento de fita" é utilizada no presente para descrever a capacidade de uma DNA polimerase de deslocar fitas complementares ao encontrar uma região de DNA de fita dupla durante a síntese de DNA. Dever-se-á

compreender que os métodos de amplificação do deslocamento de fitas diferem de métodos com base em PCR pelo fato de que os ciclos de desnaturação não são essenciais para amplificação de DNA eficiente, pois DNA de fita dupla não é um obstáculo para a síntese contínua de novas fitas de DNA. Por outro lado, métodos de PCR necessitam de ciclos de desnaturação (ou seja, temperatura em elevação até 94 °C ou mais) durante o processo de amplificação para fundir DNA de fita dupla e fornecer novos moldes de fita simples.

[092] Uma DNA polimerase de deslocamento de fita utilizada no método de acordo com a presente invenção possui preferencialmente capacidade de processamento (comprimento de extensão de iniciador) de pelo menos 20 kb, de maior preferência pelo menos 30 kb, pelo menos 50 kb, pelo menos 70 kb ou mais. Em realizações particularmente preferidas, a DNA polimerase de deslocamento de fita possui capacidade de processamento que é comparável a DNA polimerase de phi29 ou maior.

[093] Um processo de replicação por deslocamento de fita preferido é a amplificação por círculos rolantes (RCA). O termo RCA descreve a capacidade de DNA polimerases do tipo RCA (também denominadas no presente RCA polimerases) de progredir continuamente em volta de uma fita de molde de DNA circular enquanto estende um iniciador hibridizado. Isso gera a formação de produtos com fita simples linear e diversas repetições de DNA amplificado. Esses produtos com fita simples lineares servem de base para hibridização múltipla, eventos de deslocamento de fitas e extensão de iniciadores, o que resulta na formação de produtos de DNA com fita dupla concataméricos, que novamente compreendem diversas repetições de DNA amplificado. Existem, portanto, diversas cópias de cada DNA de “unidade simples” amplificado nos produtos de DNA com fita dupla concataméricos.

[094] RCA polimerases são particularmente preferidas para uso

no processo de acordo com a presente invenção. Os produtos dos processos de replicação por deslocamento de fita do tipo RCA necessitam convencionalmente de processamento complexo para liberar DNAs unitários simples. Beneficamente, de acordo com a presente invenção, o uso de função catalítica de protelomerase permite a condução desse processamento em uma única etapa. O uso de protelomerase também gera diretamente a estrutura de DNA linear fechada desejada, sem a necessidade de etapa(s) de processamento adicional(is) para formar moléculas que possuem essa estrutura.

[095] A fim de permitir a amplificação de acordo com a presente invenção, prefere-se que o molde de DNA também seja colocado em contato com um ou mais iniciadores. Os iniciadores podem ser não específicos (ou seja, com sequência aleatória) ou podem ser específicos para uma ou mais sequências compreendidas no molde de DNA. Prefere-se que os iniciadores possuam sequência aleatória, de forma a permitir o início não específico em qualquer local sobre o molde de DNA. Isso permite alta eficiência de amplificação ao longo de diversas reações de início de cada fita molde. Exemplos de iniciadores aleatórios são hexâmeros, heptâmeros, octâmeros, nonâmeros, decâmeros ou sequências com maior comprimento, tais como com 12, 15, 18, 20 ou 30 nucleotídeos de comprimento. Um iniciador aleatório pode possuir 6 a 30, 8 a 30 ou 12 a 30 nucleotídeos de comprimento. Os iniciadores aleatórios são tipicamente fornecidos na forma de mistura de oligonucleotídeos que são representativos de todas as potenciais combinações de, por exemplo, hexâmeros, heptâmeros, octâmeros ou nonâmeros no molde de DNA.

[096] Em outras realizações, os iniciadores são específicos. Isso significa que eles possuem uma sequência que é complementar a uma sequência no molde de DNA da qual se deseja o início de amplificação. Nesta realização, pode-se utilizar um par de iniciadores para amplificar

especificamente uma parte do molde de DNA que é interna para os dois locais de ligação de iniciadores. Os iniciadores podem ser não marcados ou podem compreender uma ou mais marcas, tais como radionucleotídeos ou tinturas fluorescentes. Os iniciadores podem também compreender nucleotídeos quimicamente modificados. Sequências e comprimentos de iniciadores podem ser tipicamente selecionados com base em considerações de temperatura, ou seja, como sendo capazes de ligar o molde à temperatura utilizada na etapa de amplificação.

[097] O contato do molde de DNA com a DNA polimerase e um ou mais iniciadores tem lugar sob condições que promovem a combinação de iniciadores com o molde de DNA. As condições incluem a presença de DNA de fita simples que permite a hibridização dos iniciadores. As condições também incluem uma temperatura e buffer que permitem a combinação do iniciador ao molde. Podem ser selecionadas condições de combinação e hibridização apropriadas, dependendo da natureza do iniciador. Um exemplo de condições de combinação preferidas utilizadas na presente invenção inclui um tampão com 30 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM de KCl e 8 mM de MgCl<sub>2</sub>. A combinação pode ser conduzida após desnaturação por meio de resfriamento gradual à temperatura de reação desejada.

[098] Após o contato do molde de DNA com a DNA polimerase e um ou mais iniciadores, existe em seguida uma etapa de incubação sob condições que promovam a amplificação do mencionado molde. Preferencialmente, as condições promovem a amplificação do mencionado molde por meio de deslocamento de fitas replicadas por meio de replicação por deslocamento de fita de outra fita. As condições compreendem o uso de qualquer temperatura que permita a amplificação de DNA, comumente na faixa de 20 a 90 °C. Uma faixa de temperatura preferida pode ser de cerca de 20 a cerca de 40 ou cerca de 25 a cerca de 35 °C.

[099] Tipicamente, é selecionada uma temperatura apropriada com base na temperatura na qual uma DNA polimerase específica possui atividade ideal. Esta informação é comumente disponível e faz parte do conhecimento geral dos técnicos no assunto. Ao utilizarem-se DNA polimerase de phi29, por exemplo, uma faixa de temperatura apropriada seria de cerca de 25 a cerca de 35 °C, preferencialmente cerca de 30 °C. Os técnicos no assunto seriam rotineiramente capazes de identificar uma temperatura apropriada para amplificação eficiente segundo o processo de acordo com a presente invenção. O processo poderá ser conduzido, por exemplo, em uma série de temperaturas e os rendimentos de DNA amplificado poderão ser monitorados para identificar uma faixa de temperatura ideal para uma dada DNA polimerase.

[0100] Outras condições que promovem a amplificação do molde de DNA compreendem a presença de uma DNA polimerase e um ou mais iniciadores. As condições também incluem a presença de todos os quatro dNTPs, ATP, TTP, CTP e GTP, agentes tampão apropriados/pH e outros fatores que são necessários para desempenho ou estabilidade das enzimas. Condições apropriadas incluem quaisquer condições utilizadas para fornecer atividade das enzimas DNA polimerase conhecidas na técnica.

[0101] O pH pode estar, por exemplo, dentro da faixa de 3 a 10, preferencialmente 5 a 8 ou cerca de 7, tal como cerca de 7,5. O pH pode ser mantido nessa faixa utilizando um ou mais agentes tampão. Esses tampões incluem, mas sem restrições, 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-hidrogênio fosfato de sódio, ácido cítrico-citrato de sódio, acetato de sódio-ácido acético, imidazol e carbonato de sódio-bicarbonato de sódio. A reação pode também compreender sais de metais divalentes tais como, mas

sem limitações, sais de magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e manganês ( $Mn^{2+}$ ), incluindo cloretos, acetatos e sulfatos. Podem também ser incluídos sais de metais monovalentes, tais como sais de sódio e sais de potássio, como cloreto de potássio. Outros sais que podem ser incluídos são sais de amônio, particularmente sulfato de amônio.

[0102] Podem também ser incluídos detergentes. Exemplos de detergentes apropriados incluem Triton X-100, Tween 20 e derivados de qualquer um deles. Podem também ser incluídos agentes estabilizantes na reação. Qualquer agente estabilizante apropriado pode ser utilizado, particularmente albumina de soro bovino (BSA) e outras proteínas estabilizantes. As condições de reação podem também ser aprimoradas por meio da adição de agentes que relaxam DNA e tornam mais fácil a desnaturação de moldes. Esses agentes incluem, por exemplo, sulfóxido de dimetila (DMSO), formamida, glicerol e betaína.

[0103] Dever-se-á compreender que os técnicos no assunto são capazes de modificar e otimizar as condições de amplificação e incubação do processo de acordo com a presente invenção com base no seu conhecimento geral. De forma similar, podem ser selecionadas concentrações específicas de agentes particulares, com base em exemplos anteriores do estado da técnica e adicionalmente otimizados com base em conhecimento geral. Como exemplo, um tampão de reação apropriado utilizado em métodos com base em RCA no estado da técnica é 50 mM de Tris HCl, pH 7,5, 10 mM de  $MgCl_2$ , 20 mM de  $(NH_4)_2SO_4$ , 5% de glicerol, 0,2 mM de BSA e 1 mM de dNTPs. Um tampão de reação preferido utilizado na amplificação de RCA de acordo com a presente invenção é 35 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 14 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de  $(NH_4)_2SO_4$ , 4 mM de DTT e 1 mM de dNTP. Este tampão é particularmente apropriado para uso com RCA polimerase de phi29.

[0104] As condições de reação podem também compreender o



uso de uma ou mais proteínas adicionais. O molde de DNA pode ser amplificado na presença de pelo menos uma pirofosfatase, tal como pirofosfatase inorgânica de levedura. Podem ser utilizadas duas, três, quatro, cinco ou mais pirofosfatases diferentes. Estas enzimas são capazes de degradar pirofosfato gerado pela DNA polimerase a partir de dNTPs durante a replicação de fitas. O acúmulo de pirofosfato na reação pode causar a inibição de DNA polimerases e reduzir a velocidade e a eficiência da amplificação de DNA. Pirofosfatases podem decompor pirofosfato em fosfato não inibidor. Um exemplo de pirofosfatase apropriada para uso no processo de acordo com a presente invenção é pirofosfatase de *Saccharomyces cerevisiae*, disponível comercialmente por meio da New England Biolabs, Inc.

[0105] Qualquer proteína de ligação de fita simples (SSBP) pode ser utilizada no processo de acordo com a presente invenção, para estabilizar DNA de fita simples. SSBPs são componentes essenciais de células vivas e participam de todos os processos que envolvam ssDNA, tais como replicação, reparo e recombinação de DNA. Nestes processos, SSBPs ligam-se a ssDNA formado de maneira transitória e podem ajudar a estabilizar a estrutura de ssDNA. Um exemplo de SSBP apropriado para uso no processo de acordo com a presente invenção é a proteína 32 do gene T4, disponível comercialmente por meio da New England Biolabs, Inc.

[0106] Além da etapa de amplificação, o processo de acordo com a presente invenção também compreende uma etapa de processamento para produção de DNA linear fechado. DNA amplificado é colocado em contato com pelo menos uma protelomerase sob condições que promovam a produção de DNA linear fechado. Esta etapa de processamento simples com base em protelomerase é vantajosa com relação a outros métodos utilizados de produção de moléculas de DNA linear fechado. As etapas de amplificação e de processamento podem ser conduzidas simultaneamente. Preferencialmente,

entretanto, as etapas de amplificação e de processamento são conduzidas sequencialmente, com a etapa de processamento sendo conduzida em seguida à etapa de amplificação (ou seja, sobre DNA amplificado).

[0107] Uma protelomerase utilizada na presente invenção é qualquer polipeptídeo capaz de clivar e religar um molde que compreende um local alvo de protelomerase, a fim de produzir uma molécula de DNA linear covalentemente fechada. Desta forma, a protelomerase possui funções de ligação e de divisão de DNA. Enzimas que possuem atividade do tipo protelomerase também foram descritas como resolvases de telômero (tal como em *Borrelia burgdorferi*). Um substrato típico para protelomerase é DNA de fita dupla circular. Caso esse DNA contenha um local alvo de protelomerase, a enzima pode cortar o DNA nesse local e ligar as extremidades para criar uma molécula de DNA fechada covalentemente de fita dupla linear. As necessidades de locais alvo de protelomerase são discutidas acima. Conforme também indicado acima, a capacidade de um dado polipeptídeo de catalisar a produção de DNA linear fechado a partir de um molde que compreende um local alvo de protelomerase pode ser determinada utilizando qualquer teste apropriado descrito na técnica.

[0108] Enzimas de protelomerase foram descritas em bacteriófagos. Em algumas bactérias lisogênicas, bacteriófagos existem na forma de DNA extracromossômico que compreende fitas duplas lineares com extremidades covalentemente fechadas. A replicação desse DNA e a manutenção das extremidades covalentemente fechadas (ou extremidades teloméricas) dependem da atividade da enzima protelomerase. O papel de protelomerase na replicação do DNA viral é ilustrado na Figura 1. Um exemplo dessa atividade catalítica é fornecido pela enzima TeIN do bacteriófago N15 que infecta *Escherichia coli*. TeIN reconhece uma sequência de nucleotídeos específica no DNA de fita dupla circular. Esta sequência é uma estrutura

palindrômica invertida levemente imperfeita denominada telRL que compreende duas metades, telR e telL, e ladeia uma repetição perfeita invertida com 22 pares de bases (telO) (vide a Figura 2). Dois locais telRL são formados no DNA de fita dupla circular pela atividade inicial de DNA polimerase específica que age sobre o DNA de pró-fagos linear. TelN converte esse DNA circular em duas moléculas de DNA de pró-fago linear idênticas que completam o ciclo de replicação. telR e telL compreendem as extremidades fechadas do DNA de pró-fago linear que permite a replicação adicional do DNA da mesma forma.

[0109] O processo de acordo com a presente invenção requer o uso de pelo menos uma protelomerase. O processo de acordo com a presente invenção pode compreender o uso de mais de uma protelomerase, tal como duas, três, quatro, cinco ou mais protelomerases diferentes. Exemplos de protelomerases apropriadas incluem as de bacteriófagos tais como phiHAP-1 de *Halomonas aquamarina* (SEQ ID N° 7), PY54 de *Yersinia enterocolitica* (SEQ ID N° 9), phiKO2 de *Klebsiella oxytoca* (SEQ ID N° 11) e VP882 de *Vibrio sp* (SEQ ID N° 13) e N15 de *Escherichia coli* (SEQ ID N° 15) ou quaisquer de suas variantes. É particularmente preferido o uso de N15 protelomerase de bacteriófago (SEQ ID N° 15) ou uma de suas variantes.

[0110] Variantes de SEQ ID N° 7, 9, 11, 13 e 15 incluem seus homólogos ou mutantes. Os mutantes incluem truncagens, substituições ou exclusões com relação à sequência nativa. Uma variante deve produzir DNA linear fechado a partir de um molde que compreende um local alvo de protelomerase conforme descrito acima.

[0111] Quaisquer homólogos mencionados no presente são tipicamente um homólogo funcional e são tipicamente pelo menos 40% homólogos à região relevante da proteína nativa. A homologia pode ser medida utilizando métodos conhecidos. O pacote UWGCG, por exemplo, fornece o

programa BESTFIT que pode ser utilizado para calcular a homologia (utilizada, por exemplo, nas suas configurações padrão) (Devereux et al (1984), *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Os algoritmos PILEUP e BLAST podem ser utilizados para calcular sequências de alinhamento ou homologia (tipicamente sobre suas configurações padrão), tal como conforme descrito em Altschul, S. F. (1993), *J. Mol. Evol.* 36: 290-300; Altschul, S. F. et al (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403-10. O software para realização de análises BLAST é disponível ao público por meio do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

[0112] O algoritmo BLAST fornece uma análise estatística da similaridade entre duas sequências; vide, por exemplo, Karlin e Altschul (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 5873-5787. Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma ( $P(N)$ ), que fornece uma indicação da probabilidade na qual ocorreria ao acaso uma coincidência entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos. Uma sequência é considerada similar à outra sequência, por exemplo, se a menor probabilidade de soma em comparação com a primeira sequência e a segunda sequência for de menos de cerca de 1, preferencialmente menos de cerca de 0,1, de maior preferência menos de cerca de 0,01 e, de preferência superior, menos de cerca de 0,001.

[0113] Uma variante de polipeptídeo compreende (ou consiste de) sequência que possui identidade de pelo menos 40% com a proteína nativa. Em realizações preferidas, uma sequência variante pode ser pelo menos 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e, de maior preferência, pelo menos 95%, 97% ou 99% homóloga a uma região específica da proteína nativa ao longo de pelo menos 20, preferencialmente pelo menos 30, por exemplo pelo menos 40, 60, 100, 200, 300, 400 ou mais aminoácidos contíguos, ou mesmo ao longo de toda a sequência da variante. Alternativamente, a sequência variante pode ser

pelo menos 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e, de maior preferência, pelo menos 95%, 97% ou 99% homóloga à proteína nativa de comprimento total. Tipicamente, a sequência variante difere da região relevante da proteína nativa em pelo menos ou menos de 2, 5, 10, 20, 40, 50 ou 60 mutações (cada uma das quais pode ser uma substituição, inserção ou exclusão). Uma sequência variante de acordo com a presente invenção pode possuir percentual de identidade com uma região específica da proteína nativa com comprimento total que é idêntica a qualquer um dos valores de homologia percentual específicos (ou seja, pode possuir pelo menos 40%, 55%, 80% ou 90% e, de maior preferência, pelo menos 95%, 97% ou 99% de identidade) ao longo de qualquer um dos comprimentos de sequência mencionados acima.

[0114] Variantes da proteína nativa também incluem truncagens. Qualquer truncagem pode ser utilizada, desde que a variante ainda seja capaz de produzir DNA linear fechado conforme descrito acima. As truncagens serão tipicamente realizadas para remover sequências que não são essenciais para a atividade catalítica e/ou não afetam a conformação da proteína dobrada, particularmente a dobra do local ativo. As truncagens podem também ser selecionadas para aumentar a solubilidade do polipeptídeo de protelomerase. Truncagens apropriadas podem ser rotineiramente identificadas por meio de truncagem sistemática de sequências com comprimento variável a partir do terminal N ou C.

[0115] Variantes da proteína nativa incluem adicionalmente mutantes que contêm uma ou mais, tal como 2, 3, 4, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 40 ou mais inserções, substituições ou exclusões de aminoácidos, com relação a uma região específica da proteína nativa. Exclusões e inserções são preferencialmente realizadas fora do domínio catalítico. As inserções são tipicamente elaboradas nas extremidades N ou C terminais de uma sequência derivada da proteína nativa, tal como para os propósitos de expressão

recombinante. Também são tipicamente realizadas substituições em regiões que são não essenciais para a atividade catalítica e/ou não afetam a conformação da proteína dobrada. Essas substituições podem ser elaboradas para aumentar a solubilidade ou outras características da enzima. Embora não sejam geralmente preferidas, podem também ser realizadas substituições no local ativo ou na segunda esfera, ou seja, resíduos que afetam ou entram em contato com a posição ou orientação de um ou mais dos aminoácidos no local ativo. Estas substituições podem ser elaboradas para aprimorar as propriedades catalíticas.

[0116] As substituições preferencialmente introduzem uma ou mais mudanças conservadoras, que substituem aminoácidos por outros aminoácidos com estrutura química similar, propriedades químicas similares ou volume de cadeia lateral similar. Os aminoácidos introduzidos podem possuir polaridade, hidrofiliicidade, hidrofobicidade, basicidade, acidez, neutralidade ou carga similar aos aminoácidos que substituem. Alternativamente, a alteração conservadora pode introduzir um outro aminoácido que seja aromático ou alifático no lugar de um aminoácido aromático ou alifático pré-existente. As alterações de aminoácidos conservadoras são bem conhecidas na técnica e podem ser selecionadas de acordo com as propriedades dos vinte aminoácidos principais, conforme definido na Tabela A.

**TABELA A**

**PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS AMINOÁCIDOS**

Ala	Alifático, hidrofóbico, neutro	Met	Hidrofóbico, neutro
Cys	Polar, hidrofóbico, neutro	Asn	Polar, hidrofílico, neutro
Asp	Polar, hidrofílico, carregado (-)	Pro	Hidrofóbico, neutro
Glu	Polar, hidrofílico, carregado (-)	Gln	Polar, hidrofílico, neutro
Phe	Aromático, hidrofóbico, neutro	Arg	Polar, hidrofílico, carregado (+)
Gly	Alifático, neutro	Ser	Polar, hidrofílico, neutro
His	Aromático, polar, hidrofílico, carregado (+)	Thr	Polar, hidrofílico, neutro
Ile	Alifático, hidrofóbico, neutro	Val	Alifático, hidrofóbico, neutro

Ala	Alifático, hidrofóbico, neutro	Met	Hidrofóbico, neutro
Lys	Polar, hidrofílico, carregado (+)	Trp	Aromático, hidrofóbico, neutro
Leu	Alifático, hidrofóbico, neutro	Tyr	Aromático, polar, hidrofóbico

[0117] Prefere-se particularmente que a variante seja capaz de produzir DNA linear fechado conforme descrito acima com uma eficiência que é comparável ou idêntica à proteína nativa.

[0118] Conforme indicado acima, prefere-se que a amplificação de DNA segundo o processo de acordo com a presente invenção é conduzida por uma DNA polimerase de deslocamento de fitas, de maior preferência uma RCA DNA polimerase. A combinação de uma RCA DNA polimerase e uma protelomerase em um processo *in vitro*, livre de células permite eficiência e simplicidade surpreendentes na produção de DNA linear fechado.

[0119] Conforme discutido acima, moléculas de DNA de fita simples linear longas são inicialmente formadas em reações de deslocamento de fitas que servem em seguida de novos moldes, de maneira a formar moléculas de fita dupla (Figura 4). As moléculas de fita dupla compreendem uma série contínua de unidades em tandem do DNA amplificado formadas por meio da ação de processo de polimerases de deslocamento de fitas (um concatâmero). Esses produtos de DNA concataméricos compreendem diversas repetições do molde de DNA amplificado. Um concatâmero gerado no processo de acordo com a presente invenção compreende, portanto, diversas unidades de sequência amplificada a partir do molde de DNA. O concatâmero pode compreender 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ou mais unidades de sequência amplificada, dependendo do comprimento da unidade isolada que deve ser amplificada. O concatâmero pode ter tamanho de pelo menos 5 kb, pelo menos 10 kb, pelo menos 20 kb, de maior preferência pelo menos 30 kb, pelo menos 50 kb, pelo menos 70 kb ou mais.

[0120] Em muitas realizações, tal como na produção de remédios

de DNA, o DNA amplificado será necessário para uso como unidade isolada. Esses concatâmeros necessitam, portanto, de processamento para liberar unidades isoladas do DNA amplificado. A fim de converter esse DNA concatemérico em unidades isoladas de DNA amplificado, ele necessita ser cortado com precisão e as extremidades das fitas emparelhadas necessitam de religação. Convencionalmente, isso poderá ser realizado por meio de incorporação de locais de endonuclease de restrição ao molde de DNA. Desta forma, endonucleases de restrição poderão ser incubadas com concatâmeros para divisão nos seus locais de reconhecimento e liberação de unidades isoladas. O DNA de fita dupla linear aberto formado por meio da ação de endonucleases de restrição poderá ser incubado em seguida com uma enzima ligase de DNA para fechar covalentemente os DNAs de unidade isolada.

[0121] Segundo a presente invenção, o processamento de DNA concatamérico em DNAs de unidade isolada lineares fechados é atingido utilizando uma única enzima, protelomerase. Isso representa uma simplicidade vantajosa e economia em um processo de geração de moléculas de DNA linear fechado. Em primeiro lugar, a divisão e religação de unidades isoladas é atingida por meio de incubação com uma enzima isolada. Em segundo lugar, também são liberadas unidades isoladas que possuem a estrutura linear fechada desejada e, portanto, não são necessárias etapas de processamento adicionais para gerar essa estrutura (ou seja, de um DNA de unidade isolada circular covalentemente fechado).

[0122] O DNA amplificado do molde de DNA é incubado com pelo menos uma protelomerase sob condições que promovam a produção de DNA linear fechado. Em outras palavras, as condições promovem a divisão e a religação de um DNA de fita dupla que compreende uma sequência alvo de protelomerase para formar um DNA linear covalentemente fechado com extremidades de grampos de cabelo. As condições que promovem a produção de DNA linear fechado compreendem o uso de qualquer temperatura que



permita a produção de DNA linear fechado, comumente na faixa de 20 a 90 °C. A temperatura pode estar preferencialmente em uma faixa de cerca de 25 a 40 °C, tal como cerca de 25 a cerca de 35 °C ou cerca de 30 °C. Temperaturas apropriadas para uma protelomerase específica podem ser selecionadas de acordo com os princípios descritos acima com relação a condições de temperatura para DNA polimerases. Uma temperatura apropriada para uso com TelN protelomerase de bacteriófago de *E. coli* de SEQ ID N° 15 é de cerca de 25 a cerca de 35 °C, tal como cerca de 30 °C.

[0123] Condições que promovem a produção de DNA linear fechado também compreendem a presença de uma protelomerase e agentes tampão/pH apropriados e outros fatores que são necessários para o desempenho ou estabilidade da enzima. Condições apropriadas incluem quaisquer condições utilizadas para fornecer atividade das enzimas protelomerase conhecidas na técnica. Ao utilizar-se TelN protelomerase de bacteriófago de *E. coli*, por exemplo, um tampão apropriado pode ser de 20 mM de Tris HCl, pH 7,6; 5 mM de CaCl<sub>2</sub>; 50 mM de glutamato de potássio; 0,1 mM de EDTA; e 1 mM de ditioneitol (DTT). Agentes e condições para manter a atividade e estabilidade ideal podem também ser selecionados a partir dos relacionados para DNA polimerases.

[0124] Em algumas realizações, pode ser possível utilizar as mesmas condições para a atividade de protelomerase utilizadas para amplificação de DNA. Particularmente, é descrito o uso das mesmas condições em que a amplificação e o processamento de DNA por protelomerase são conduzidos simultaneamente. Em outras realizações, pode ser necessário alterar as condições de reação, em que as condições utilizadas para fornecer atividade de DNA polimerase ideal geram atividade de protelomerase abaixo da ideal. A remoção de agentes específicos e a alteração das condições de reação podem ser atingidas por meio de filtragem, diálise e outros métodos

conhecidos na técnica. Os técnicos no assunto seriam facilmente capazes de identificar condições que permitam a atividade de DNA polimerase e/ou atividade de protelomerase ideal.

[0125] Em uma realização particularmente preferida, para uso em amplificação de DNA por uma RCA DNA polimerase, preferencialmente phi29, a amplificação de DNA é conduzida sob condições de tampão substancialmente idênticas ou que consistem essencialmente de 35 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 14 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de DTT, 1 mM de dNTP sob temperatura de 25 a 35 °C, tal como cerca de 30 °C. A etapa de processamento com protelomerase pode ser preferencialmente conduzida em seguida com TelN e/ou preferencialmente sob condições de tampão substancialmente idênticas ou que consistem essencialmente de 20 mM de Tris HCl, pH 7,6; 5 mM de CaCl<sub>2</sub>; 50 mM de glutamato de potássio; 0,1 mM de EDTA; 1 mM de ditioneitol (DTT) sob temperatura de 25 a 35 °C, tal como cerca de 30 °C.

[0126] Todas as enzimas e proteínas para uso no processo de acordo com a presente invenção podem ser produzidas de forma recombinante, tal como em bactérias. Pode ser utilizado qualquer meio conhecido dos técnicos no assunto que permita expressão recombinante. Um plasmídeo ou outra forma de vetor de expressão que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína de interesse pode ser introduzido em bactérias, de tal forma que expressem a proteína codificada. Para expressão, por exemplo, de SEQ ID N° 2, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15, o vetor pode compreender a sequência de SEQ ID N° 1, 4, 6, 8, 10, 12 ou 14, respectivamente. A proteína expressa será tipicamente purificada em seguida, tal como por meio do uso de uma marca de afinidade, em quantidade suficiente e fornecida de forma apropriada para uso no processo de acordo com a presente invenção. Essa metodologia de produção de proteínas recombinantes

é rotineiramente disponível para os técnicos no assunto com base no seu conhecimento geral. A discussão acima se aplica ao fornecimento de qualquer proteína discutida no presente.

[0127] DNA amplificado obtido por meio do contato do molde de DNA com uma DNA polimerase pode ser purificado antes do contato com uma protelomerase. Desta forma, o processo de acordo com a presente invenção pode compreender adicionalmente uma etapa de purificação de DNA amplificado a partir do molde de DNA. Em uma realização preferida, entretanto, o processo é conduzido sem purificação de DNA amplificado antes do contato com protelomerase. Isso significa que as etapas de amplificação e processamento podem ser conduzidas consecutivamente, tipicamente no mesmo recipiente ou solução. Em algumas dessas realizações, o processo envolve a adição de um tampão que fornece atividade de protelomerase, ou seja, para fornecer condições que promovam a formação de DNA linear fechado.

[0128] Após a produção de DNA linear fechado por meio da ação de protelomerase, o processo de acordo com a presente invenção pode compreender adicionalmente uma etapa de purificação do produto de DNA covalentemente fechado linear. A purificação indicada acima será tipicamente realizada para remover quaisquer produtos indesejados. A purificação pode ser conduzida por qualquer meio apropriado conhecido na técnica. O processamento de DNA amplificado ou DNA covalentemente fechado linear pode compreender, por exemplo, purificação de ácido nucleico de fenol/clorofórmio ou o uso de uma coluna que liga seletivamente ácido nucleico, tal como os disponíveis comercialmente por meio da Qiagen. Os técnicos no assunto podem identificar rotineiramente métodos de purificação apropriados para uso no isolamento de DNA amplificado.

[0129] Após a geração e purificação de DNA covalentemente

fechado linear em quantidade suficiente, o processo pode compreender adicionalmente a sua formulação na forma de composição de DNA, tal como uma composição de DNA terapêutica. Uma composição de DNA terapêutica compreenderá uma molécula de DNA terapêutico do tipo indicado acima. Essa composição compreenderá uma quantidade terapeuticamente eficaz do DNA em forma apropriada para administração por uma via desejada, tal como aerossol, uma composição injetável ou formulação apropriada para administração oral, via mucosa ou tópica.

[0130] Formulação de DNA na forma de preparação farmacêutica convencional pode ser realizada utilizando metodologias e químicas de formulação farmacêutica padrão, que são disponíveis para os técnicos no assunto. Pode ser utilizado qualquer veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes, substâncias tampão de pH e similares, podem estar presentes no excipiente ou veículo. Esses excipientes, veículos e substâncias auxiliares são geralmente agentes farmacêuticos que podem ser administrados sem toxicidade indevida e que, no caso de composições de vacina, não induzirão uma reação imunológica no indivíduo que recebe a composição. Um veículo apropriado pode ser um lipossomo.

[0131] Excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas sem limitações, líquidos tais como água, solução salina, polietileno glicol, ácido hialurônico, glicerol e etanol. Podem também ser incluídos sais farmacêuticamente aceitáveis, tais como sais de ácidos minerais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e similares; e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e similares. Também se prefere, embora não seja necessário, que a preparação contenha um excipiente farmacêuticamente aceitável que serve de estabilizador, particularmente para peptídeo, proteína ou outras moléculas similares caso

devam ser incluídas na composição. Exemplos de veículos apropriados que também agem como estabilizantes para peptídeos incluem, sem limitações, graus farmacêuticos de dextrose, sacarose, lactose, tre-halose, manitol, sorbitol, inositol, dextran e similares. Outros veículos apropriados incluem, novamente sem limitação, amido, celulose, fosfatos de sódio ou cálcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietileno glicóis (PEGs) com alto peso molecular e suas combinações. Uma discussão completa de excipientes, veículos e substâncias auxiliares farmaceuticamente aceitáveis é disponível em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., N. J. 1991), incorporado ao presente como referência.

[0132] O processo de acordo com a presente invenção é conduzido em um ambiente *in vitro*, livre de células. Desta forma, o processo é conduzido na ausência de uma célula hospedeira e compreende tipicamente o uso de componentes enzimáticos purificados. Consequentemente, a amplificação de um DNA molde e o processamento por protelomerase são tipicamente conduzidos por meio de contato dos componentes de reação em solução em um recipiente apropriado. Opcionalmente, podem ser fornecidos componentes específicos em forma imobilizada, tal como fixados a um suporte sólido.

[0133] Dever-se-á compreender que o processo de acordo com a presente invenção pode ser conduzido em qualquer escala. Prefere-se, entretanto, que o processo seja conduzido para amplificar DNA em escala comercial ou industrial, ou seja, gerando DNA amplificado em miligramas ou quantidades maiores. Prefere-se que o processo gere pelo menos um miligrama, pelo menos dez miligramas, pelo menos vinte miligramas, pelo menos cinquenta miligramas ou pelo menos cem miligramas de DNA amplificado. O produto de DNA linear fechado final derivado do DNA amplificado pode também ser preferencialmente gerado em miligramas ou

quantidades maiores. Prefere-se que o processo gere pelo menos um miligrama, pelo menos dois miligramas, pelo menos cinco miligramas, pelo menos dez miligramas, pelo menos vinte miligramas, pelo menos cinquenta miligramas ou pelo menos cem miligramas de DNA linear fechado.

[0134] A presente invenção fornece ainda um kit que compreende componentes necessários para a condução do processo de acordo com a presente invenção. Este kit compreende pelo menos uma DNA polimerase, pelo menos uma protelomerase e, opcionalmente, instruções para uso em um processo conforme descrito no presente. O kit pode compreender duas, três, quatro, cinco ou mais DNA polimerases diferentes. Preferencialmente, o kit compreende pelo menos uma DNA polimerase do tipo deslocamento de fita, de preferência ainda maior uma RCA DNA polimerase. Prefere-se particularmente que o kit compreenda DNA polimerase de phi29 (SEQ ID N° 2) e DNA polimerase Deep Vent® (SEQ ID N° 3) ou DNA polimerase de Bst 1 (SEQ ID N° 5) ou quaisquer de suas variantes. Em algumas realizações, podem também ser incluídas DNA polimerases que replicam DNA por meio de outros métodos. O kit compreende pelo menos uma protelomerase. O kit pode compreender duas, três, quatro ou mais protelomerases diferentes. As protelomerases podem ser selecionadas a partir de qualquer um dentre SEQ ID N° 5, 7, 9, 11, 13, 15 ou quaisquer de suas variantes. Prefere-se particularmente que o kit compreenda *E. coli* N15 TelN (SEQ ID N° 15) ou quaisquer de suas variantes.

[0135] O kit pode também compreender pelo menos uma proteína de ligação de fita única (SSBP). Uma SSBP preferida é proteína 32 de gene T4 disponível comercialmente por meio da New England Biolabs, Inc. Duas, três, quatro ou mais SSBPs diferentes podem ser incluídas no kit. O kit pode compreender adicionalmente uma pirofosfatase. Uma pirofosfatase preferida é pirofosfatase de *S. cerevisiae*, disponível comercialmente por meio da New England Biolabs, Inc. Em algumas realizações, podem ser incluídas

duas, três, quatro, cinco ou mais pirofosfatases diferentes. O kit pode compreender qualquer DNA polimerase, protelomerase, SSBP ou pirofosfatase descrita no presente. O kit pode também compreender dNTPs, tampões apropriados e outros fatores que são necessários para a estabilidade ou o desempenho da enzima DNA polimerase e/ou protelomerase conforme descrito acima.

### **EXEMPLOS**

#### **EXEMPLO 1**

[0136] Expressão de TelN e geração de construções de vetores que compreendem sequências alvo de protelomerase

[0137] TelN foi amplificado por PCR a partir do vetor de clonagem disponível comercialmente pJAZZ (Lucigen) utilizando iniciadores de oligonucleotídeos modificados:

PT1F 5' ATGAGCAAGGTAAAAATCGGTG 3' (SEQ ID N° 30)

PT1R 5' TTAGCTGTAGTACGTTTCCCAT 3' (SEQ ID N° 31)

para clonagem em quadro direcional no vetor pQE-30 disponível comercialmente (Qiagen). Este sistema permite a expressão indutível de proteínas marcadas com His N-terminais 6X de um promotor *lac*, ao mesmo tempo em que fornece forte repressão em trans do plasmídeo que expressa *lacI* pREP4. Diversos supostos clones recombinantes foram identificados em *E. coli* M15 e validados por meio de sequenciamento para exibir inserção de quadros de TelN. Seis clones foram adicionalmente caracterizados em experimentos de indução em pequena escala. Todos os clones expressaram uma proteína de 74,5 kDa correspondente em peso molecular a TelN protelomerase recombinante.

[0138] TelN foi expresso a partir de M15 pREP4 de *E. coli* por meio de indução da expressão de proteína de pQE-30 com IPTG e células induzidas foram sonicadas (seis impulsos de trinta segundos a 100%) e

centrifugadas (30 min a 25000 g) para gerar frações solúveis e insolúveis do lisato celular. Análise de gel exibiu a presença de TelN na fração solúvel. A purificação de TelN foi conduzida sobre uma coluna HisTrap utilizando um sistema Akta Prime (GE Healthcare) com eluição utilizando um gradiente de 0 a 100% (0,5 M) de imidazol. TelN purificado sofreu diálise para remover imidazol e foi armazenado em um tampão de 10 mM de Tris HCl, pH 7,4, 75 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 0,1 mM de EDTA e 50% de glicerol.

[0139] Foram criadas construções de vetores que permitem a validação da atividade de TelN por meio de clonagem direcional de oligonucleotídeos sintéticos que contêm o local de reconhecimento de TelN telRL:

#### RL1

5'AGCTTTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTATT  
GTGTGCTGATAG 3' (SEQ ID N° 32)

#### RL2

5'GATCCTATCAGCACACAATAGTCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATT  
GTGTGCTGATAA 3' (SEQ ID N° 33)

nos locais BamHI e HindIII de plasmídeos pUC18 e pBR329. pUC19 possui o número de acesso Genbank L09136 e pode ser obtido comercialmente por meio de Fermentas, número de catálogo SD0051; pBR329 possui o número de acesso Genbank J01753 e pode ser obtido comercialmente por meio de DSMZ, número de catálogo 5590.

[0140] Além disso, para estudos de transfecção, duas cópias do local de reconhecimento de telRL foram clonadas no plasmídeo de expressão de luciferase pGL4.13 (Promega) nos locais de restrição SacI e BamHI exclusivos laterais ao cassete de expressão para o gene luciferase de vagalume. O primeiro local telRL foi clonado no local SacI exclusivo acima no fluxo do promotor SV40 após a recombinação de oligonucleotídeos sintéticos telRL



com sobreposições de SacI. O segundo local telRL foi clonado abaixo no fluxo do sinal de poliadenilação SV40 no local BamH1 exclusivo utilizando oligonucleotídeos sintéticos telRL com sobreposições de BamHI. A construção resultante foi indicada como pGL DOG, pois permite a formação de um DNA linear fechado covalentemente (*doggybone*) que codifica luciferase a ser expressa em células de mamíferos.

### **EXEMPLO 2**

[0141] Validação da divisão de TelN

[0142] A divisão de construções de vetores pGL DOG e pUC18 telRL circulares superbobinadas por TelN foi validada. 100 ng de cada substrato foram incubados com 4,5 pmol de TelN por uma hora e quarenta minutos a 30 °C. A reação foi realizada em tampão TelN (10 mM de Tris HCl, pH 7,6, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 50 mM de glutamato de potássio, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT).

[0143] Os produtos de divisão foram visualizados por meio de eletroforese de gel de agarose nativa. Incubação de pUC18 telRL circular superbobinado com TelN liberou um fragmento linear de 2,7 kb que indica divisão. Incubação de pGL DOG circular superbobinado com TelN liberou dois fragmentos de 2,4 kb que indicam divisão nos dois locais telRL.

[0144] Além disso, pUC18 telRL e pGL DOG foram linearizados por meio de digestão de restrição e incubados em seguida com TelN para validar adicionalmente a divisão específica em telRL. 100 ng de pUC18 telRL foram linearizados com XmnI e incubados em seguida com TelN. Isso liberou fragmentos esperados de 1,9 kb e 0,8 kb. 100 ng de pGL DOG foram linearizados com PvuI e incubados em seguida com TelN. Isso liberou fragmentos esperados de 2,4 kb, 1,6 kb e 0,7 kb. De forma similar, pGL DOG linearizado com PstI e incubado em seguida com TelN liberou fragmentos esperados de 2,4 kb, 1,1 kb e outro 1,1 kb. Isso demonstrou a atividade de

endonuclease de TelN sobre substratos de DNA linear e circular que compreende uma sequência alvo de protelomerase.

[0145] Em uma determinação preliminar da atividade de divisão, concluiu-se que um excesso de TelN a 3,4 pmol cortou pelo menos 200 ng de pUC18 telRL em uma hora. Em um experimento ao longo do tempo, a mesma quantidade de DNA foi cortada em até cerca de dez minutos.

### **EXEMPLO 3**

[0146] Validação de atividade de religação de TelN e formação de DNA linear fechado

[0147] A validação da estrutura de DNA linear fechado dos produtos de divisão de TelN foi conduzida utilizando eletroforese de gel de desnaturação. pGL DOG foi incubado com TelN como no Exemplo 3. Foi utilizado como controle um produto de PCR sintético (PCR DOG) correspondente à região contida no interior da estrutura *doggybone*, mas que possui extremidades de DNA abertas. O fragmento linear de PCR DOG foi amplificado a partir de pGL DOG utilizando iniciadores laterais aos locais telRL:

Sac pGL 5' GTGCAAGTGCAGGTGCCAGAAC 3' (SEQ ID N° 34);

Bam pGL 5' GATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGC 3' (SEQ ID N° 35).

[0148] Sobre um gel de agarose nativo (0,8% de agarose em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA)), o produto de divisão de 2,4 kb obtido por meio da incubação de 100 ng de pGL DOG com TelN migrou para um tamanho similar como PCR DOG (2,7 kb), pois os dois produtos permanecem com fita dupla.

[0149] Quando conduzido sobre gel de agarose de desnaturação (1% agarose em H<sub>2</sub>O conduzido em 50 mM de NaOH, 0,1 mM de EDTA e neutralizado após a condução em 1 M de Tris HCl, pH 7,6, 1,5 M de NaCl), que permite a desnaturação e a separação de DNA de fita dupla em DNA de fita

simples, o fragmento de “*doggybone*” TelN migrou em peso molecular mais alto (cerca de 5 kb) que o PCR controle com extremidades abertas ou pUC18 telRL linearizado com XmnI (ambos, 2,7 kb).

[0150] Esta diferença de migração indicou a formação de uma estrutura de “*doggybone*” linear fechado por TelN. A desnaturação de uma estrutura de “*doggybone*” produziria círculos abertos de fita simples que migram mais lentamente através do gel que as fitas simples lineares liberadas mediante desnaturação de um produto de PCR linear com extremidades abertas.

[0151] A validação da estrutura linear fechada de produtos formados por TelN também foi exibida mediante análise de desnaturação térmica por meio de eletroforese capilar Lab-On-a-Chip (LOC). Análise de LOC representa uma plataforma de eletroforese capilar para a rápida separação de moléculas biológicas. O Bioanalizador Agilent com 7500 chips de DNA (Agilent, Reino Unido) pode ser utilizado para separação e dimensionamento aproximado de fragmentos de DNA com até 7000 pb.

[0152] Esse sistema de chipos não detecta DNA de fita simples. Desnaturação de aquecimento (95 °C por cinco minutos) e resfriamento rápido (< 1 °C/s) a 1 °C/s de DNA de fita dupla convencional sob condições de baixo teor de sal, tal como em H<sub>2</sub>O, resulta em DNA de fita simples que não pode ser visualizado sobre o sistema LOC. Extremidades de DNA que são ligadas covalentemente em DNA de “*doggybone*” (resultantes da divisão por TelN), entretanto, não podem ser separadas após a desnaturação e, portanto, recombinam-se para reformar DNA de fita dupla que permanece visível. A comparação de DNA desnaturado a quente que foi resfriado rapidamente permite, portanto, a discriminação entre DNA de estrutura *doggybone* linear covalentemente fechado (ccl) e DNA de fita dupla linear aberto convencional (ol).

[0153] Amostras de DNA (100 ng) em H<sub>2</sub>O foram desnaturadas (95 °C por cinco minutos), rapidamente resfriadas (< 1 °C/s) até 4 °C em tubos de PCR com paredes finas em um ciclizador térmico (ciclizador Biorad I, Biorad, Reino Unido). Para comparação com divisão de TelN, as amostras foram incubadas em primeiro lugar em 1 X tampão Tel N com um microlitro de enzima protelomerase purificada a 30 °C por dez minutos. Amostras controle foram tratadas de forma idêntica, mas sem enzima. Amostras (um microlitro) foram analisadas utilizando um Bioanalisador Agilent com chips de DNA 7500 de acordo com as instruções do fabricante.

[0154] Os resultados são exibidos na Figura 6B. Estes demonstram que DNA de “*doggybone*” linear fechado obtido por meio da incubação de pGL DOG com TelN é resistente à desnaturação térmica em comparação com DNA linear aberto convencional equivalente (PCR DOG). Também foi obtida resistência equivalente contra a desnaturação a quente utilizando DNA de estrutura *doggybone* amplificado por RCA resultante da amplificação de RCA e divisão de TelN.

[0155] Em outros experimentos, a divisão de TelN foi conduzida sobre o PCR DOG com extremidades abertas. Isso resultou na formação do produto de divisão termoestável DNA de “*doggybone*” de 2,8 kb e extremidades de “*doggybone*” termoestáveis com 0,09 e 0,14 kb.

[0156] Os tamanhos estimados de “*doggybone*” e PCR DOG em análise LOC variaram de 2,8 kb a 3,0 kb e 3,1 a 3,5 kb, respectivamente, em comparação com dados de sequência que previram tamanhos aproximados de 2,4 kb e 2,7 kb. Isso reflete diferenças de migração com base em conformação que ocorrem em análise de LOC não desnaturante.

#### **EXEMPLO 4**

[0157] Formação de DNA linear fechado de DNA concatamérico formado por meio de RCA (amplificação por círculo rolante)

[0158] Foi conduzido um processo *in vitro*, livre de células para amplificar um molde de DNA e conversão do DNA amplificado em DNAs de “doggybone” lineares fechados. Utilizou-se RCA empregando enzima phi29 de fago phi29 de *Bacillus subtilis* e hexâmeros aleatórios como iniciadores sob diversas condições para amplificar moldes de plasmídeos covalentemente fechados com e sem o local telRL. Isso gerou a amplificação de DNA concatamérico por meio da atividade de deslocamento de fita de processo de phi29. O trabalho inicial foi realizado utilizando um kit TempliPhi (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante. Este foi posteriormente substituído, entretanto, por um processo interno (utilizando phi29 fornecido pela NEB), o que resulta em rendimentos de produto mais altos com maior pureza.

[0159] Conduziu-se desnaturação de 40 pg a 200 ng de molde circular fechado e combinação de iniciadores em dez microlitros de tampão de combinação/desnaturação, 30 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 micromolar de hexâmeros aleatórios. Conduziu-se desnaturação e combinação por meio de aquecimento a 95 °C por um minuto, seguido por resfriamento à temperatura ambiente por trinta minutos.

[0160] Dez microlitros de tampão de reação (35 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 14 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de DTT, 10 U de phi29, 0,002 U de PPI (pirofosfatase inorgânica de levedura), 1 mM de dNTP) foram adicionados em seguida a dez microlitros de reação de DNA e iniciador combinados.

[0161] As reações de vinte microlitros foram incubadas a 30 °C por dezoito horas. Foi conduzida uma amostra sobre gel para verificar a formação de concatâmeros e, em seguida, a mistura de reação foi digerida com enzima de restrição ou TelN para verificar os produtos.

[0162] DNA concatamérico amplificado por RCA foi incubado em

seguida com TelN. Tipicamente, o substrato de DNA amplificado por RCA foi diluído em água e 10x tampão TelN até um volume final de vinte microlitros. Os resultados para pUC18 telRL são exibidos na Figura 6A.

[0163] Como se pode observar a partir do gel na linha 1, o DNA amplificado concatamérico não digerido forma uma tela que não entra no gel. TelN foi capaz, entretanto, de clivar o material de RCA, resultando na liberação de um fragmento de *doggybone* de 2,7 kb (linha 6). Atingiu-se confirmação de que o DNA amplificado por RCA foi o molde de partida utilizado na reação por meio de digestão de restrição com Pvu1 (linhas 2 e 5). pUC18 (sem telRL) serviu de controle negativo para atividade de telN (linha 3).

[0164] De forma similar, em outros experimentos, concatâmeros gerados por RCA de pGL DOC também foram clivados por TelN. Consequentemente, demonstrou-se que o processo de acordo com a presente invenção é eficaz na amplificação de DNA linear fechado a partir de um molde inicial. Além disso, foi possível amplificar DNA linear fechado de forma simples, utilizando RCA polimerase e protelomerase em etapas sequenciais, sem a necessidade de purificação interveniente de DNA amplificado.

#### **EXEMPLO 5**

[0165] Expressão de DNA linear fechado amplificado

[0166] Experimentos de transfecção utilizando células HeLa foram realizados para investigar a expressão de um gene relator de luciferase de DNA de "*doggybone*" linear fechado produzido de acordo com a presente invenção. DNA circular fechado covalentemente e o controle PCR DOG linear foram utilizados como controles.

[0167] A transfecção foi conduzida em confluência de 60% em cavidades com 20 mm de diâmetro em RPMI e utilizou Transfectam® (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Cada transfecção utilizou 400 ng de DNA de construção. Frequência de transfecção foi normalizada

dentro e entre os experimentos por meio da inclusão de um controle interno utilizando 40 ng do plasmídeo que expressa luciferase Renilla pGL4.73 (contendo o gene *hRluc* de *Rennilla reniformis*) em cada transfecção. A atividade de luciferase de vaga-lume (luminescência de *Photinus pyralis*) e luciferase de Renilla foi medida sequencialmente utilizando o Sistema de Teste do Relator de Luciferase® Dupla (DLR®) (Promega). Unidades leves relativas foram medidas utilizando um Multiluminômetro GloMax (Promega) e os resultados foram expressos na forma de razão de luciferase de Renilla/luciferase de vaga-lume. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

[0168] As construções testadas na transfecção foram as seguintes:

DNA controle pGL4.13 luc

pGL4.73 hRluc

PCR DOG

PCR controle (fragmento de pGL4.13 ao longo do gene luc)

pGL DOG (pGL4.13 contendo dois locais telRL)

MP “*doggybone*” (pGL DOG isolado de DNA miniprep digerido com PvuI (para remover o DNA de vetor contaminante) seguido pela divisão de TelN)

RCA “*doggybone*” (pGL DOG amplificado por RCA digerido com Pvu e clivado em seguida com TelN)

RCA pGL DOG – DNA concatamérico produzido na amplificação de RCA inicial de pGL DOG.

[0169] Os resultados são exibidos na Figura 6C. Demonstrou-se que DNA linear fechado, incluindo o amplificado por RCA, expressa luciferase em níveis mais altos que as construções de PCR linear aberto. Isso demonstra que DNA linear fechado produzido de acordo com a presente invenção pode

ser utilizado para expressar com sucesso luciferase quando introduzido em células de mamíferos.

### **SEQUÊNCIAS DA PRESENTE INVENÇÃO**

#### **TABELA A**

Sequência de ácido nucleico de DNA polimerase de bacteriófago phi29 de *Bacillus* (SEQ ID N° 1)

```

atgaagcata tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa 60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata 120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatattc 180
cataacctca aatttgacgg agcttttatc attaactggt tggaacgtaa tggttttaag 240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg 300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatac agtgatatat 360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact 420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc 480
gaagaatacg cctatatataa aaacgatatt cagattattg cggaacgtct gttaattcag 540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat 600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag 660
gaagtgagat acgcctatag aggtgggtttt acatgggttaa atgatagggt caaagaaaaa 720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagc 780
cgtctccttc catatggtga acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat 840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc 900
actatacaga taaaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc 960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaaat gtagacctag aattaatgaa agaactac
1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt
1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa
1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca

```



1200  
 gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa  
 1260  
 acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg  
 1320  
 acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata  
 1380  
 catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgaccc taagaaattg  
 1440  
 ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagttaa atctgagaca gaagacctat  
 1500  
 atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat  
 1560  
 tacactgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag  
 1620  
 gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa  
 1680  
 gtgccggggc ggggtggttct gggtgatgac acattcacaa tcaaataa 1728

### Sequência de aminoácidos de DNA polimerase de bacteriófago phi29 de Bacillus (SEQ ID N° 2)

MKHMPRKMYS CDFETTTKVE DCRVWAYGYM NIEDHSEYKI GNSLDEFMAW VLKVQADLYF 60  
 HNLKFDGAFI INWLERNQFK WSADGLPNTY NTIISRMGQW YMIDICLGYK GKRKIHTVIY 120  
 DSLKKLPFPV KKIADFKLT VLKGDIDYHK ERPVGYKITP EEYAYIKNDI QIIAERLLIQ 180  
 FKQGLDRMTA GSDSLKGFKD IITTKKFKKV FPTLSLGLDK EVRYAYRGGF TWLNDRFKEK 240  
 EIGEGMVFDV NSLYPAQMYR RLLPYGEPV FEGKYVWDED YPLHIQHIRC EFELKEGYIP 300  
 TIQIKRSRFY KGNEYLKSSG GEIADLWLSN VDLELMKEHY DLYNVEYISG LKFKATTGLF 360  
 KDFIDKWTYI KTTSEGAIKQ LAKLMLNSLY GKFNPNPDVT GKVPYLNKENG ALGFRLGEEE 420  
 TKDPVYTPMG VFITAWARYT TITAAQACYD RIIYCDTDSI HLTGTEIPDV IKDIVDPKKL 480

GYWAHESTFK RVKYLRQKTY IQDIYMKEVD GKLVEGSPDD YTDIKFSVKC AGMTDKIKKE 540  
 VTFENFKVGF SRKMKPKPVQ VPGGVVLVDD TFTIK 575

### **TABELA B**

#### **Sequência de aminoácidos uma DNA polimerase Deep Vent de Pyrococcus SP (SEQ ID N° 3)**

MILDADYITE DGKPIIRIFK KENGEFKVEY DRNFRPYIYA LLKDDSQIDE VRKITAERHG 60  
 KIVRIIDAEK VRKKFLGRPI EVWRLYFEHP QDVPAIRDKI REHSAVIDIF EYDIPFAKRY 120  
 LIDKGLIPME GDEELKLLAF DIETLYHEGE EFAKGPIIMI SYADEEEAKV ITWKIDLPY 180  
 VEVVSSEREM IKRFLKVIRE KDPDVIITYN GDSFDLPYLV KRAEKLGIKL PLGRDGSEPK 240  
 MQR LGDMTAV EIKGRIHFDL YHVIRRTINL PTYTL EAVYE AIFGKPKEKV YAHEIAE AWE 300  
 TGKGLERVAK YSMEDAKVTY ELGREFFPME AQLSRLVGQP LWDVSRSTG NLVEWYLLRK 360  
 AYERNELAPN KPDEREYERR LRESYAGGYV KEPEKGLWEG LVSLDFRSLY PSIIITHNVS 420  
 PDTLNREGCR EYDVAPEVGH KFCKDFPGFI PSLKRLLE RQEIKRKMKA SKDPIEKML 480  
 DYRQRAIKIL ANSYGYGYG AKARWYCKEC AESVTAWGRE YIEFVRKELE EKFGFKVLYI 540  
 DTDGLYATIP GAKPEEIKKK ALEFVDYINA KLPGLLELEY EGFYVRGFFV TKKKYALIDE 600  
 EGKIITRGLE IVRRDWSEIA KETQAKVLEA ILKHGNVEEA VKIVKEVTEK LSKYEIPPEK 660  
 LVIYEQITRP LHEYKAIGPH VAVAKRLAAR GVKVRPGMVI GYIVLRGDGP ISKRAILAE 720  
 FDLRKHKYDA EYYIENQVLP AVLRILEAFG YRKEDLRWQK TKQTGLTAWL NIKKK 775

### **TABELA C**

#### **Sequência de ácidos nucleicos de DNA polimerase I (polA) de Bacillus stearothermophilus (SEQ ID N° 4)**

atgaagaaga agctagtact aattgatggc aacagtgtgg cataccgcgc cttttttgcc 60  
 ttgccacttt tgcataacga caaaggcatt catacgaatg cggtttacgg gtttacgatg 120  
 atgttgaaca aaattttggc ggaagaacaa ccgaccatt tacttgtagc gtttgacgcc 180  
 ggaaaaacga cgttccggca tgaaacgttt caagagtata aaggcggacg gcaacaaact 240  
 cccccggaac tgtccgagca gtttccgctg ttgcgcgagc tattaaaagc gtaccgcatt 300  
 cccgcttatg aacttgatca ttacgaagcg gacgatatta tcgggacgct cgctgcccgc 360  
 gctgagcaag aagggtttga agtgaaaatc atttccggcg accgcgattt aaccagctc 420  
 gcctcccgtc atgtgacggt cgatattacg aaaaaaggga ttaccgacat tgagccgtat 480  
 acgccagaga ccgttcgcga aaaatacggc ctgactccgg agcaaatagt ggatttaaaa 540

ggattgatgg gcgataaatc cgacaacatc ccgggctgtc ccggcatcgg ggaaaaaacg 600  
 gcggtcaagc tgctgaagca atttggtacg gtggaaaatg tgctcgcatc gattgatgag 660  
 gtgaaagggg aaaaactgaa agaaaacttg cgccaacacc gggatttagc tctcttgagc 720  
 aaacagctgg cgtccatttg ccgcgacgcc ccggttgagc tgtcgttaga tgacattgtc 780  
 tacgaaggac aagaccgga aaaagtcacg gcgttattta aagaactcgg gtttcagtcg 840  
 ttcttgaaaa aaatggccgc gccggcagcc gaaggggaga aaccgcttga ggagatggag 900  
 ttgccatcg ttgacgtcat taccgaagag atgcttgccg acaaggcagc gcttgctggt 960  
 gaggtgatgg aagaaaacta ccacgatgcc ccgattgtcg gaatcgcaact agtgaacgag 1020  
 catgggcgat tttttatgcg cccggagacc gcgctggctg attcgcaatt tttagcatgg 1080  
 cttgccgatg aaacgaagaa aaaaagcatg ttgacgcca agcgggcagt cgttgcccta 1140  
 aagtggaaag gaattgagct tcgcggcgtc gcctttgatt tattgctcgc tgcctatttg 1200  
 ctcaatccgg ctcaagatgc cggcgatcgc gctgcggtgg cgaaaatgaa acaatatgaa 1260  
 gcggtgcggt cggatgaagc ggtctatggc aaaggcgtca agcggtcgct gccggacgaa 1320  
 cagacgcttg ctgagcatct cgttcgcaa gcggcagcca tttgggcgct tgagcagccg 1380  
 tttatggacg atttgcggaa caacgaacaa gatcaattat taacgaagct tgagcagccg 1440  
 ctggcggcga ttttggtga aatggaattc actggggtga acgtggatac aaagcggctt 1500  
 gaacagatgg gttcggagct cgccgaacaa ctgcgtgcca tcgagcagcg catttacgag 1560  
 ctagccggcc aagagttcaa cattaactca caaaacagc tcggagtcatt tttatttgaa 1620  
 aagctgcagc taccggtgct gaagaagacg aaaacaggct attcgacttc ggctgatgtg 1680  
 cttgagaagc ttgcgccga tcatgaaatc gtcgaaaaca ttttgatta ccgccagctt 1740  
 ggcaaactgc aatcaacgta tattgaagga ttgttgaaag ttgtgcgccc tgataccggc 1800  
 aaagtgcata cgatgttcaa ccaagcgtg acgcaaatg ggcggctcag ctcggccgag 1860  
 ccgaacttgc aaaacattcc gattcggctc gaagaggggc ggaaaatccg ccaagcgttc 1920  
 gtcccgtcag agccggactg gctcattttc gccgccgatt actcacaat tgaattgcgc 1980  
 gtcctcgccc atatcgccga tgacgacaat ctaattgaag cgttccaacg cgatttgat 2040  
 attcacacaa aaacggcgat ggacattttc catgtgagcg aagaggaagt cacggccaac 2100  
 atgcgccgcc aggcaaaggc cgttaacttc ggtatcgttt acggaattag cgattacgga 2160  
 ttggcgcaaa acttgaacat tacgcgcaaa gaagctgccg aatttatcga acgttacttc 2220  
 gccagctttc cgggcgtaaa gcagtatatg gaaaacattg tgcaagaagc gaaacagaaa 2280  
 ggatatgtga caacgctggt gcatcgccgc cgctatttgc ctgatattac aagccgcaat 2340

ttcaacgtcc gcagttttgc agagcggacg gccatgaaca cgccaattca aggaagcgcc 2400  
gctgacatta ttaaaaaagc gatgattgat ttagcggcac ggctgaaaga agagcagctt 2460  
caggctcgtc ttttgctgca agtgcacgac gagctcattt tggaagcgcc aaaagaggaa 2520  
attgagcgat tatgtgagct tgttccggaa gtgatggagc aggccgttac gctccgcgtg 2580  
ccgctgaaag tcgactacca ttacggccca acatggtatg atgccaaata a 2631

**Sequência de aminoácidos de DNA polimerase I (polA) de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID N° 5)**

MKKKLVLIDG NSVAYRAFFA LPLLHNDKGI HTNAVYGFMT MLNKILAEQ PTHLLVAFDA 60  
GKTTFRHETF QEYKGGQQQT PPELSEQFPL LRELLKAYRI PAYELDHYE DDIIGTLAAR 120  
AEQEGFEVKI ISGDRDLTQL ASRHVTVDIT KKGITDIEPY TPETVREKYG LTPEQIVDLK 180  
GLMGDKSDNI PGVPGIGECT AVKLLKQFGT VENVLASIDE VKGEKLKENL RQHRDLALLS 240  
KQLASICRDA PVELSLDDIV YEGQDREKVI ALFKELGFQS FLEKMAAPAA EGKPLEEME 300  
FAIVDVITEE MLADKAALVV EVMEENYHDA PIVGIALVNE HGRFFMRPET ALADSQFLAW 360  
LADETKKKSM FDAKRAVVAL KWKGIELRGV AFDLLLAAYL LNPAQDAGDI AAVAKMKQYE 420  
AVRSDEAVYG KGVKRSPLDE QTLAEHLVRK AAIIWALEQP FMDDLNRNEQ DQLLTKEQP 480  
LAAILAEMEF TGVNVDTKRL EQMGSELAEQ LRAIEQRIYE LAGQEFNINS PKQLGVILFE 540  
KLQLPVLKKT KTGYSADV LEKLAPHHEI VENILHYRQL GKLQSTYIEG LLKVVRPDTG 600  
KVHTMFNQAL TQTGRLLSSAE PNLQNIPIRL EEGRKIRQAF VPSEPDWLIF AADYSQIELR 660  
VLAHIADDDN LIEAFQRDL D IHTKTAMDIF HVSEEEVTAN MRRQAKAVNF GIVYGISDYG 720  
LAQNLNITRK EAAEFIERFY ASFPGVKQYM ENIVQEAKQK GYVTTLHRR RYLPDITSRN 780  
FNRSFAERT AMNTPIQGSA ADIIKKAMID LAARLKEEQ L QARLLLQVHD ELILEAPKEE 840  
IERLCELVPE VMEQAVTLRV PLKVDYHYGP TWYDAK 876

**TABELA D**

**Sequência de ácidos nucleicos de protelomerase de fago phiHAP-1 de *Halomonas* (SEQ ID N° 6)**

atgagcgggtg agtcacgtag aaaggtcgat ttagcggaaat tgatagagtg gttgctcagc 60  
gagatcaaag agatcgacgc cgatgatgag atgccacgta aagagaaaac caagcgcatg 120  
gcgcggctgg cacgtagctt caaaacgcgc ctgcatgatg acaagcgccg caaggattct 180  
gagcggatcg cggtcacgac ctttcgccgc tacatgacag aagcgcgcaa ggcggtgact 240  
gcgcagaact ggcgccatca cagcttcgac cagcagatcg agcggctggc cagccgctac 300

```

ccggcttatg ccagcaagct ggaagcgctc ggcaagctga ccgatatcag cgccattcgt 360
atggcccacc gcgagctgct cgaccagatc cgcaacgatg acgacgctta tgaggacatc 420
cgggcatga agctggacca tgaaatcatg cgccacctga cgttgagctc tgcacagaaa 480
agcacgctgg ctgaagaggc cagcgagacg ctggaagagc gcgcggtgaa cacggtcgag 540
atcaactacc actggttgat ggagacggtt tacgagctgc tgagtaaccg ggagagaatg 600
gtcgatgggg agtatcgcgg ctttttcagt tacctagcgc ttgggctggc gctggccacc 660
gggcgtcgct cgatcgaggt gctgaagacc ggacggatca cgaaggtggg cgagtatgag 720
ctggagttca gcggccaggc gaaaaagcgc ggcgcgctcg actatagcga ggcttaccac 780
atttatacc tggtgaaagc tgacctggtg atcgaagcgt gggatgagct tcgctcgctg 840
ccggaagctg ctgagctgca gggcatggac aacagcgatg tgaaccgccg cacggcgaag 900
acgctcaaca cgctcactaa gcggatcttt aacaacgatg agcgcgtttt caaggacagc 960
cgggcatctt gggcgcggtt ggtgtttgag ctgcacttct cgcgcgacaa gcgctggaag 1020
aaagtcaccg aggacgtggt ctggcgtgag atgctggggc atgaggacat ggatacacag 1080
cgcagctacc gcgcctttaa aatcgactac gacgagccgg atcaagccga ccaggaagat 1140
tacgaacacg ctagccgcct cgccgcgctg caggcgctgg acggccatga gcagcttgag 1200
agcagcgacg ccagggcgcg tgtgcatgcc tgggtgaaag cgcagatcga gcaggagcct 1260
gacgcgaaaa ttacgcagtc tctgatcagc cgggagctgg gcgtttatcg ccctgccata 1320
aaagcgtacc tggagctggc gcgagaggcg ctcgacgcgc cgaacgtcga tctggacaag 1380
gtcgcggcgg cagtgccgaa ggaagtagcc gaggcgaagc cccggctgaa cggccacca 1440
caaggggatg gcaggtgggt cggggtggct tcaatcaacg ggggtggaagt tgcacgggtg 1500
ggcaaccagg caggccggat cgaagcgatg aaagcgccct ataaagcggc ggggtgggcgc 1560
tga 1563

```

### Sequência de aminoácidos de protelomerase de fago phiHAP-1 de Halomonas (SEQ ID N° 7)

```

MSGESRRKVD LAELIEWLLS EIKEIDADDE MPRKEKTKRM ARLARSKFTR LHDDKRRKDS 60
ERIAVTTFRR YMTEARKAVT AQNWRHHSFD QQIERLASRY PAYASKLEAL GKLTDISAIR 120
MAHRELLDQI RNDDDAYEDI RAMKLDHEIM RHLTLSSAQK STLAEASET LEERAVNTVE 180
INYHWMETV YELLSNRERM VDGEYRGFFS YLALGLALAT GRRSIEVLKT GRITKVGEYE 240
LEFSGQAKKR GGVDYSEAYH IYTLVKADLV IEAWDELRLS PEAAELQGM NSDVNRRTAK 300
TLNTLTKRIF NNDERVFKDS RAIWARLVFE LHFSRDKRWK KVTEDVFWRE MLGHEDMDTQ 360

```

RSYRAFKIDY DEPDQADQED YEHASRLAAL QALDGHEQLE SSDAQARVHA WVKAQIEQEP 420  
 DAKITQSLIS RELGVYRPAI KAYLELAREA LDAPNVLDK VAAAVPKEVA EAKPRLNAHP 480  
 QGDGRWVGVA SINGVEVARV GNQAGRIEAM KAAYKAAGGR 520

### **TABELA E**

#### **Sequência de ácido nucleico de protelomerase de fago PY54 de Yersinia (SEQ ID N° 8)**

atgaaaatcc attttcgcga tttagttagt ggtttagtta aagagatcga tgaaatagaa 60  
 aaatcagacc gggcgaggg tgacaaaact cggcggtatc agggcgcggc cagaaagttc 120  
 aaaaatgccg tgtttatgga taaacggaaa tatcgcggtta acggtatgaa gaatagaata 180  
 tcgttaacaa catttaataa atatttaagt cgagcacggt ctcggtttga agaaaggctt 240  
 caccatagtt ttcctcaatc tatagcaact atctcaaata aatatcctgc attcagcgaa 300  
 ataataaaag atctggataa tagaccgct catgaagta gaataaaact taaagaatta 360  
 ataactcatc ttgaatccgg tgttaattta ttagaaaaaa taggtagctt agggaaaata 420  
 aaaccatcta cagctaaaaa aatagttagc ttaaaaaaaa tgtaccatc atgggctaata 480  
 gatctagata ctttaattag tactgaagat gctacagaat tacaacaaa gttagagcaa 540  
 gggaccgacc tacttaacgc attacattct ctaaaagtaa accatgaagt tatgtatgca 600  
 ttaacgatgc agccttctga cagagctgca ttaaaagcta ggcgatgacgc tgcccttcac 660  
 tttaaaaagc gtaacatcgt acctatcgat tatcccggct atatgcaacg aatgacggac 720  
 atactacatc ttccagatat agcttttgaa gattcgatgg catcacttgc ccctttagca 780  
 tttgctctag cagctgctag cggtcgcaga caaattgaaa tactaattac tggtagagttt 840  
 gacgccaaaa ataaaagcat cattaaattt tctggacaag caaaaaaag aatggccggtt 900  
 tcaggtggac attatgaaat atacagtcta attgactcag agctattcat tcaacggtta 960  
 gagtttttac gttctcatag ctcaatactt cgattacaaa atttggaaat agcacatgat 1020  
 gaacatcgta ctgaactatc tgttattaac ggtttttag ccaaactttt aatgatgca 1080  
 gcaaaacagt tctttgtcga tgacagaaga gtatttaaag ataccctgac aatttacgct 1140  
 cgcatagcat atgaaaaatg gtttagaaca gatcctcgct gggcgaagtg cgacgaagat 1200  
 gttttcttct ctgaattatt aggccatgac gaccagata ctgagctggc atataacaa 1260  
 ttcaagctgg taaatttcaa tccaaaatgg acacctaata tatcagatga aaaccctcgg 1320  
 ttagctgcac ttcaagagct tgacaatgat atgcccggcc tagcacgtgg cgatgcggca 1380  
 gttcgcatat atgagtgggt taaagagcaa ctggcgagca accctgcggc aaaaataact 1440

gcataccaaa tcaagaaaaa tttaaattgt cgaaatgact tggccagccg atacatggca 1500

**Sequência de aminoácidos de protelomerase de fago PY54 de Yersinia (SEQ ID N° 9)**

MKIHFRDLVS GLVKEIDEIE KSDRAQGDKT RRYQGAARKF KNAVFMDKRK YRGNGMKNRI 60  
SLTTFNKYLS RARSFEERL HHSFPQSIAT ISNKYPAFSE IIKDLNRPA HEVRIKLKEL 120  
ITHLESGVNL LEKIGSLGKI KPSTAKKIVS LKKMYPWAN DLDTLISTED ATELQQKLEQ 180  
GTDLLNALHS LKVNHEVMYA LTMQPSDRAA LKARHDAALH FKKRNIVPID YPGYMQRMTD 240  
ILHLPDIAFE DSMASLAPLA FALAAASGRR QIEILITGEF DAKNKSIKF SGQAKKRMV 300  
SGGHYEIYSL IDSELFQRL EFLRSHSSIL RLQNLEIAHD EHRTELSVIN GFVAKPLNDA 360  
AKQFFVDDRR VFKDTRAIYA RIAYEKWFRT DPRWAKCDED VFFSELLGHD DPDTQLAYKQ 420  
FKLVNFPKW TPNISDENPR LAALQELDND MPGLARGDAA VRIHEWVKEQ LAQNPAKIT 480  
AYQIKKNLNC RNDLASRYMA WCADALGVVI GDDGQARPEE LPPSLVLDIN ADDTDAEED 540  
IEEDFTDEEI DDTEFDVSDN ASDEDKPEDK PRFAAPIRRS EDSWLIKFEF AGKQYSWEGN 600  
AESVIDAMKQ AWTENME 617

**TABELA F****Sequência de ácido nucleico de protelomerase de fago phiKO2 de Klebsiella (SEQ ID N° 10)**

```

atgcgtaagg tgaaaattgg tgagctaatac aattcgcttg tgagcgaggt cgaggcaatc 60
gatgcctctg atcgctccgca aggcgataaa acgaagaaaa ttaaagccgc agcattaaaa 120
tataagaatg cattatttaa tgacaaaaga aagtttcgcg gtaaaggttt agaaaaaaga 180
atctctgcca acacgttcaa ctcgtatatg agtcgggcaa ggaaaagatt tgatgataga 240
ttgcatcata actttgaaaa gaatgtaatt aaactatcag aaaaatatcc tttatatagt 300
gaagaattat cttcgtggct ttctatgcct gcgcatcaa ttagacagca tatgtcaaga 360
ttgcaagcca agctaaaaga gataatgcca ttggcagaag acttatccaa tataaagatt 420
ggtacaaaaa atagcgaagc aaaaataaat aaactcgcta ataaatatcc tgaatggcaa 480
ttcgctatta gtgatttaaa tagcgaagat tggaaggata aaagagatta tctttataaa 540
ctattccaac aagggttcttc gtcctggaa gacttgaata acctgaaagt aaaccatgag 600
gttctctatc atctgcagct tagttctgcc gagcgaacct ctatccagca gcgctgggcc 660
aacgtcctca gcgagaaaaa gcgcaacgtt gtcgtgattg actatccgcg ctatatgcag 720
gccatctacg atataatcaa caagcctata gtttcgttcg atttgactac tcgtcgtggt 780
atggccccgc tggcggttcgc cttgcccgcg ctatctggtc gccgaatgat tgaaatcatg 840
ctccagggtg aattttccgt cgcaggtaaa tatacagtaa cattcctggg gcaagctaaa 900
aaacgctcgg aagataaagg tatatcaagg aaaatatata ctttatgcga cgctacttta 960
tttgtagtt tggtaaatga acttcgctca tgccccgctg ctgcggattt tgatgaagta 1020
ataaaaggat atggcgaaaa tgacactcgc tcagaaaatg ggcgtattaa tgcaattctc 1080
gctacagctt ttaatccgtg ggtaaaaact ttcttaggcg atgaccgccg cgtttataaa 1140
gatagccgcg ctatttacgc ccgtattgcc tatgaaatgt tcttccgcgt tgaccctcgg 1200
tggaagaatg ttgatgagga tgtattcttc atggagattc tcggccatga cgatgaaaac 1260
acccaactgc actataagca gtttaaattg gctaacttct ccagaacatg gcgaccaa 1320
gtcggcgagg agaatgcccg cctagcggcg ctgcaaaaagc tggatagcat gatgccagat 1380
tttgccaggg gcgacgccgg ggttcgtatt catgagaccg tgaagcagct ggtggagcag 1440
gacccatcga taaaaatcac aaacagcacc ctgcgaccgt ttaacttcag taccaggctg 1500
attcctcgct acctggagtt tgccgccgat gcattgggcc agttcgtcgg tgaaaatggg 1560
caatggcaac tgaaggatga ggcgccctgca atagtcctgc ctgatgagga aattcttgag 1620
cctatggacg acgtcgatct cgatgacgaa aaccatgatg atgaaacgct ggatgacgat 1680

```



gagatcgaag tggacgaaag cgaaggagag gaactggagg aagcgggcga cgctgaagag 1740  
gccgaggtgg ctgaacagga agagaagcac cctggcaagc caaactttaa agcgccgagg 1800  
gataatggcg atggtaccta catggtggaa ttgaattcg gtggccgtca ttacgcctgg 1860  
tccggtgccg ccggtaatcg ggtagaggca atgcaatctg cctggagtgc ctacttcaag 1920  
tga 1923

### Sequência de aminoácidos de protelomerase de fago phiKO2 de Klebsiella (SEQ ID N° 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 NVLSEKKRNV VVIDYPRYMQ 240  
AIYDIINKPI VSFDLTTRRG MAPLAFALAA LSGRRMIEIM LQGEFSVAGK YTVTFLGQAK 300  
KRSEDKGISR KIYTLCDATL FVSLVNELRS CPAAADFDEV IKGYGENDTR SENGRIINAIL 360  
ATAFNPWVKT FLGDDRRVYK DSRAIYARIA YEMFFRVDPK WKNVDEDVFF MEILGHDDEN 420  
TQLHYKQFKL ANFSRTWRPN VGEENARLAA LQKLDSMMPD FARGDAGVRI HETVKQLVEQ 480  
DPSIKITNST LRPFNFSTRL IPRYLEFAAD ALGQFVGENG QWQLKDEAPA IVLPDEEILE 540  
PMDDVDLDDE NHDDETLDDD EIEVDESEGE ELEEAGDAEE AEVAEQEEKH PGKPNFKAPR 600  
DNGDGYMVE FEFGRHYAW SGAAGNRVEA MQSAWSAYFK 640

**TABELA G****Sequência de ácido nucleico de protelomerase de fago VP882 de Vibrio  
(SEQ ID N° 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 cgagttgcgc 360
ctggcgcacg gcgacctcct gaagagcatc aaggacaacg atgaagcctt cgaggatatc 420
cgcagcatga agttagacca cgaggtaatg cgccatctga cgctaccag tgcgcaaaag 480
gcgagactgg cagaggaagc cgccgaggcg ttgaccgaga agaaaaccgc cacggtcgac 540
atcaactatc acgagctgat ggccggcgtg gtggagctgt tgaccaagaa gaccaagacg 600
gtcggcagcg acagcaccta cagcttcagc cggttgccgc ttggtattgg cctggctacc 660
ggtcgtcggt ctatcgagat actgaagcag ggcgagttca aaaaggtgga tgagcagcgg 720
ctcgagttct ctggccaagc gaaaaagcgc ggccgtgccg actattcaga gacctatacc 780
atttacaccc tggctgactc cgacctggta ctgatggcgc tgaagaacct gcgagagttg 840
ccagaagttc gcgcactgga tgagtacgac caactgggcg agattaagcg gaacgacgcc 900
atcaataaac gctgtgcaaa aacgctcaac caaacgccca 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 tgcacaagcc tggcaaattt aagagcagag ctgaagccct cgcggcgctc 1200
gactcaaatg aggacattac caccgcgtca tccatggcca agatccacga ctgggtgaaa 1260
gagcgtattg cggaagaccc cgaggcgaac atcacacagt cactcatcac ccgggaactg 1320
ggctcaggcc gtaaggtgat caaggactac ctcgacctgg ctgacgatgc ctttgctgtg 1380
gtgaatactc ctgtcgatga cgcagtcgtc gaggttcag ctgatgtgcc ggcagcagaa 1440

```

aaacagccga agaaagcgca gaagcccaga ctcggtggctc accaggttga tgatgagcac 1500  
 tgggaagcct gggcgctggt ggaaggcgag gaggtggcca gggtgaaaat caagggcacc 1560  
 cgcgttgagg caatgacagc cgcattgggag gccagccaaa aggcactcga tgactaa 1617

**Sequência de aminoácidos de protelomerase de fago VP882 de Vibrio  
 (SEQ ID N° 13)**

MSGESRQKVN LEELINELVE EVKTIDDNEA ITRSEKTKLI TRAATKFKTK LHDDKRRKDA 60  
 TRIALSTYRK YMTMARAAVT EQNWKHHSLE QQIERLAKKH PQYAEQLVAI GAMDNITELR 120  
 LAHRDLLKSI KDNDEAFEDI RSMKLDHEVM RHLTLPSAQK ARLAEAEAEA LTEKKTATVD 180  
 INYHELMAGV VELLTKTKTK VGSDSTYSFS RLALGIGLAT GRSIEILKQ GEFKKVDEQR 240  
 LEFSGQAKKR GGADYSETYT IYTLVDSDLV LMALKNLREL PEVRALDEYD QLGEIKRND 300  
 INKRCAKTLN QTAKQFFGSD ERVFKDSRAI WARLAYELFF QRDPRWKKKD EDVFWQEMLG 360  
 HEDIETQKAY KQFKVDYSEP EQPVHKPGKF KSRAEALAAL DSNEDITTRS SMAKIHDWVK 420  
 ERIAEDPEAN ITQSLITREL GSGRKVIKDY LDLADDALAV VNTPVDDAVV EVPADVPAAE 480  
 KQPKKAQKPR LVAHQVDDEH WEAVALVEGE EVARVKIKGT RVEAMTAWE ASQKALDD 538

**TABELA H**

**Sequência de ácido nucleico de repressor de imunidade secundária (cA)  
 e telomerase (telN) de bacteriófago N15 de Escherichia coli (SEQ ID N°  
 14)**

catatgcact atatcatatc tcaattacgg aacatattcag cacacaattg cccattatac 60  
 gcgcgtataa tggactattg tgtgctgata aggagaacat aagcgcagaa caatatgtat 120  
 ctattccggt gttgtgttcc tttgttattc tgctattatg ttctcttata gtgtgacgaa 180  
 agcagcataa ttaatcgtca cttgttcttt gattgtgtta cgatatccag agacttagaa 240  
 acgggggaac cgggatgagc aaggtaaaaa tcggtgagtt gatcaacacg cttgtgaatg 300  
 aggtagaggc aattgatgcc tcagaccgcc cacaaggcga caaacgaag agaattaaag 360  
 ccgcagccgc acggtataag aacgcgttat ttaatgataa aagaaagttc cgtgggaaag 420  
 gattgcagaa aagaataacc gcgaatactt ttaacgccta tatgagcagg gcaagaaagc 480  
 ggtttgatga taaattacat catagctttg ataaaaatat taataaatta tcggaaaagt 540

```

atcctcttta cagcgaagaa ttatcttcat ggctttctat gcctacggct aatattcgcc 600
agcacatgtc atcgttacaa tctaaattga aagaaataat gccgcttgcc gaagagttat 660
caaatgtaag aataggctct aaaggcagtg atgcaaaaat agcaagacta ataaaaaaat 720
atccagattg gagttttgct cttagtgtt taaacagtga tgattggaag gagcgccgtg 780
actatcttta taagttattc caacaaggct ctgcgttggt agaagaacta caccagctca 840
aggtaacca tgaggttctg taccatctgc agctaagccc tgcggagcgt acatctatac 900
agcaacgatg ggccgatgtt ctgcgcgaga agaagcgtaa tgttggtggt attgactacc 960
caacatacat gcagtctatc tatgatattt tgaataatcc tgcgacttta ttagtthtaa 1020
aactcgttc tggaatggca cttttggcct ttgctctggc tgcggtatca gggcgaagaa 1080
tgattgagat aatgtttcag ggtgaatttg ccgtttcagg aaagtatacg gttattttct 1140
cagggcaagc taaaaaacgc tctgaagata aaagcgtaac cagaacgatt tatactttat 1200
gcgaagcaaa attattcggt gaattattaa cagaattgcg ttcttgctct gctgcatctg 1260
atctcgatga ggttgthtaa ggatatggaa aggatgatac aaggtctgag aacggcagga 1320
taaatgctat ttagcaaaa gcatthtaacc cttgggttaa atcatthttc ggcatgacc 1380
gtcgtgttta taaagatagc cgcgtattht acgctcgcat cgcttatgag atgttcttcc 1440
gcgtcgatcc acggtggaaa aacgtcgacg aggatgtgtt cttcatggag attctcggac 1500
acgacgatga gaacaccag ctgcactata agcagttcaa gctggccaac ttctccagaa 1560
cctggcgacc tgaagttggg gatgaaaaca ccaggctggt ggctctgcag aaactggacg 1620
atgaaatgcc aggtttgccc agaggtgacg ctggcgtccc tctccatgaa accgttaagc 1680
agctggtgga gcaggaccca tcagcaaaaa taaccaacag cactctccgg gcctthaaat 1740
ttagcccgac gatgattagc cgttacctgg agtttgccgc tgatgcattg gggcagttcg 1800
ttggcgagaa cgggcagtg gctgaaga tagagacacc tgcaatcgtc ctgcctgatg 1860
aagaatccgt tgagaccatc gacgaaccgg atgatgagtc ccaagacgac gagctggatg 1920
aagatgaaat tgagctcgac gaggtggcg gcgatgaacc aaccgaagag gaagggccag 1980
aagaacatca gccaaactgct ctaaaacccg tcttcaagcc tgcaaaaaat aacggggacg 2040
gaacgtacaa gatagagttt gaatacgatg gaaagcatta tgctgtgtcc gggccgccc 2100
atagccctat ggccgcaatg cgatccgcat gggaaacgta ctacagctaa aagaaaagcc 2160
accggtgtta atcgtgtggct tttttattga ggcctgtccc taccatccc ctgcaaggga 2220

```

cggaaggatt aggcggaaac tgcagctgca actacggaca tcgccgtccc gactgcaggg 2280  
 acttccccgc gtaaagcggg gcttaaattc gggctggcca accctatattt tctgcaatcg 2340  
 ctggcgatgt tagtttcgtg gatagcgttt ccagcttttc aatggccagc tcaaaatgtg 2400  
 ctggcagcac cttctccagt tccgtatcaa tatcggtgat cggcagctct ccacaagaca 2460  
 tactccggcg accgccacga actacatcgc gcagcagctc ccgttcgtag acacgcatgt 2520  
 tgcccagagc cgtttctgca gccgttaata tccggcgcac gtcggcgatg attgccggga 2580  
 gatcatccac gggtattggg ttcggtgatg ggttcctgca ggcggggcg agagccatcc 2640  
 agacgccgct aacccatgcg ttacgggtact gaaaactttg tgctatgtcg tttatcaggc 2700  
 ccgaagtctt tctttctgcc gccagtccag tggttcaccg gcgttccttag gctcaggctc 2760  
 gacaaaagca tactcgccgt tttccggat agctggcaga acctcgttcg tcacccactt 2820  
 gcggaaccgc caggtgtcg tcccctgttt caccgcgtcg cggcagcgga ggattatggt 2880  
 gtagagacca gattccgata ccacatttac tcccctggcc atccgatcaa gtttttgtgc 2940  
 ctcggttaaa ccgaggggtca atttttcatc atgatccagc ttacgcaatg catcagaagg 3000  
 gttggctata ttcaatgcag cacagatatc cagcgccaca aaccacgggt caccaccgac 3060  
 aagaaccacc cgtatagggg ggctttcctg aaatgaaaag acggagagag ccttcattgc 3120  
 gcctccccgg atttcagctg ctcaaaaagg gacagggagc agccgcgagc ttcctgcgtg 3180  
 agttcgcgcg cgacctgcag aagttccgca gtttcctgca aatacagcgt ggcctcataa 3240  
 ctggagatag tgcggtgagc agagcccaca agcgttcaa cctgcagcag gcgttcctca 3300  
 atcgtctcca gcaggccctg ggcgtttaac tgaatctggt tcatgcgac acctcgctga 3360  
 ccgggatacg ggctgacaga acgaggacaa aacggctggc gaactggcga cgagcttctc 3420  
 gtcggtatga tgcaatggtg gaaaggcggg ggatatggga ttttttgtcc gtgcggacga 3480  
 cagctgcaaa tttgaatttg aacatggtat gcattcctat cttgtatagg gtgctaccac 3540  
 cagagttgag aatctctata ggggtggtag ccagacagg gttctcaaca ccggtacaag 3600  
 aagaaaccgg cccaaccgaa gttggcccca tctgagccac cataattcag gtatgcgcag 3660  
 atttaacaca caaaaaaaca cgctggcgcg tgttggtgcg ttcttgatc tccggggtga 3720  
 gagggccggc tgcagatttt gctgcagcgg ggtaactcta ccgccaaagc agaacgcacg 3780  
 tcaataattt aggtggatat tttacccgt gaccagtcac gtgcacaggt gtttttatag 3840  
 tttgctttac tgactgatca gaacctgatc agttattgga gtccggtaat cttattgatg 3900

accgcagcca ccttagatgt tgtctcaaac cccatacggc cacgaatgag ccactggaac 3960  
 ggaatagtca gcaggtacag cggaacgaac cacaaacggt tcagacgctg ccagaacgtc 4020  
 gcatcacgac gttccatcca ttcggtattg tcgac 4055

### Sequência de aminoácidos de telomerase de bacteriófago N15 de Escherichia coli (SEQ ID N° 15)

MSKVKIGELI NTLVNEVEAI DASDRPQGDK TKRIKAAAAR YKNALFNDKR KFRGKGLQKR 60  
 ITANTFNAYM SRARKRFDDK LHHSFDKNIN KLSEKYPLYS EELSSWLSMP TANIRQHMSS 120  
 LQSKLKEIMP LAEELSNVRI GSKGSDAKIA RLIKKYPDWS FALSDLNSDD WKERRDYLYK 180  
 LFQQGSALLE ELHQLKVNHE VLYHLQLSPA ERTSIQQRWA DVLREKKRNV VVIDYPTYMQ 240  
 SIYDILNNPA TLFSLNTRSG MAPLAFALAA VSGRRMIEIM FQGEFAVSGK YTVNFSGQAK 300  
 KRSEDKSVTR TIYTLCEAKL FVELLTELRs CSAASDFDEV VKGYGKDDTR SENGRIINAIL 360  
 AKAFNPWVKS FFGDDRRVYK DSRAIYARIA YEMFFRVDPR WKNVDEDVFF MEILGHDDEN 420  
 TQLHYKQFKL ANFSRTWRPE VGDENTRLVA LQKLDDDEMPG FARGDAGVRL HETVKQLVEQ 480  
 DPSAKITNST LRAFKFSPTM ISRYLEFAAD ALGQFVGENG QWQLKIETPA IVLPDEESVE 540  
 TIDEPDESQ DDELEDEIE LDEGGGDEPT EEEGPPEHQP TALKPVFKPA KNNGDGTYKI 600  
 EFEYDGKHYA WSGPADSPMA AMRSAWETYY S 631

### **REIVINDICAÇÕES**

1. PROCESSO *IN VITRO*, LIVRE DE CÉLULAS, PARA A PRODUÇÃO DE UM ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) LINEAR FECHADO, caracterizado por compreender:

(a) colocar um molde de DNA, que compreende pelo menos uma sequência alvo de protelomerase, em contato com pelo menos uma DNA polimerase na presença de um ou mais iniciadores sob condições que promovem a amplificação de mencionado molde; e,

(b) colocar o DNA amplificado produzido em (a) em contato com pelo menos uma protelomerase sob condições que promovem a produção de DNA linear fechado.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo mencionado molde de DNA ser incubado sob condições que promovem a amplificação de mencionado molde por meio de deslocamento de fitas replicadas por replicação por deslocamento de fita de outra fita.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela amplificação de mencionado molde ser conduzida por meio de amplificação por círculo rolante (RCA).

4. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelos mencionados iniciadores serem iniciadores aleatórios.

5. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pela mencionada DNA polimerase ser phi29 de SEQ ID N° 2 e/ou mencionada protelomerase ser TeIN de bacteriófago N15 de SEQ ID N° 15.

6. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo DNA amplificado produzido na etapa (a) compreender concatâmeros que compreendem unidades em tandem de

sequência de DNA amplificada a partir de mencionado molde de DNA.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelos mencionados concatâmeros serem resolvidos em unidades isoladas de sequência de DNA amplificada pela mencionada protelomerase.

8. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pela mencionada pelo menos uma sequência alvo de protelomerase compreender uma sequência de DNA de repetição invertida perfeita.

9. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo mencionado molde de DNA ser um DNA circular fechado.

10. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo mencionado molde de DNA ser um DNA linear fechado, preferencialmente em que mencionado molde de DNA é incubado sob condições de desnaturação para formar um DNA circular fechado.

11. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo mencionado molde de DNA compreender um cassete de expressão que compreende um promotor eucariótico ligado operativamente a uma sequência de codificação de interesse e, opcionalmente, uma sequência de terminação de transcrição eucariótica; em que mencionada sequência de codificação de interesse é opcionalmente uma sequência de codificação humana ou uma sequência de codificação de um patógeno que infecta seres humanos.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo mencionado cassete de expressão ser flanqueado em qualquer um dos lados por uma sequência alvo de protelomerase.

13. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 12,



caracterizado por se destinar à produção de um DNA de cassete de expressão linear fechado.

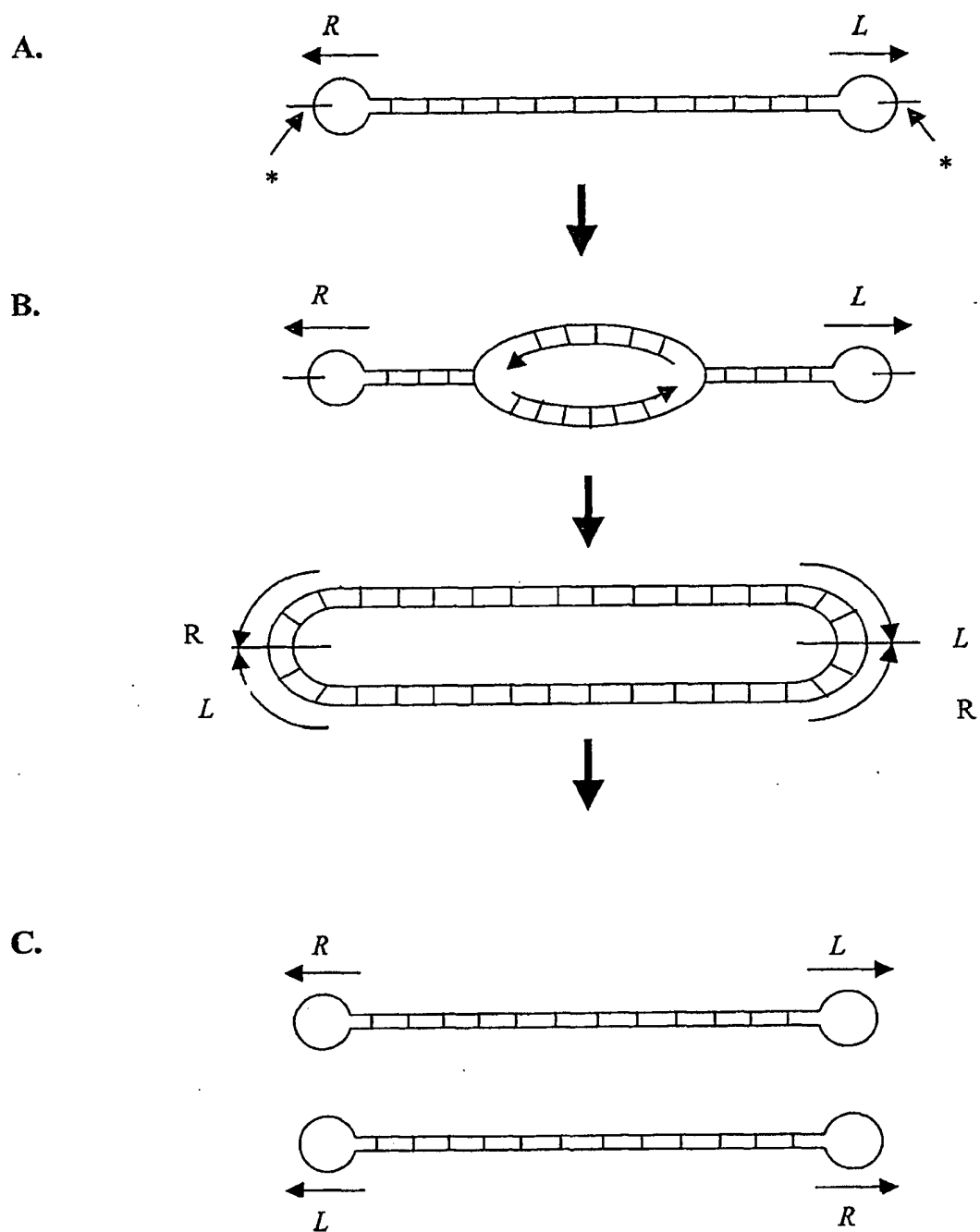
14. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado por compreender adicionalmente a purificação do DNA linear fechado produzido na etapa (b).

15. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado por compreender:

(a) colocar mencionado molde de DNA de fita simples, que possui uma sequência alvo de protelomerase que é clivada e reunida por TeIN de SEQ ID N° 15, em contato com DNA polimerase de phi29 de SEQ ID N° 2, sob uma temperatura entre 25 e 35°C sob condições que promovem a amplificação de mencionado molde pela mencionada DNA polimerase; e

(b) colocar os concatâmeros produzidos na etapa (a) em contato com a mencionada TeIN protelomerase sob uma temperatura entre 25 e 35°C sob condições que promovem a atividade de mencionada protelomerase.

16. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pela mencionada sequência alvo de protelomerase compreender a sequência de SEQ ID N° 25.

**Fig. 1**

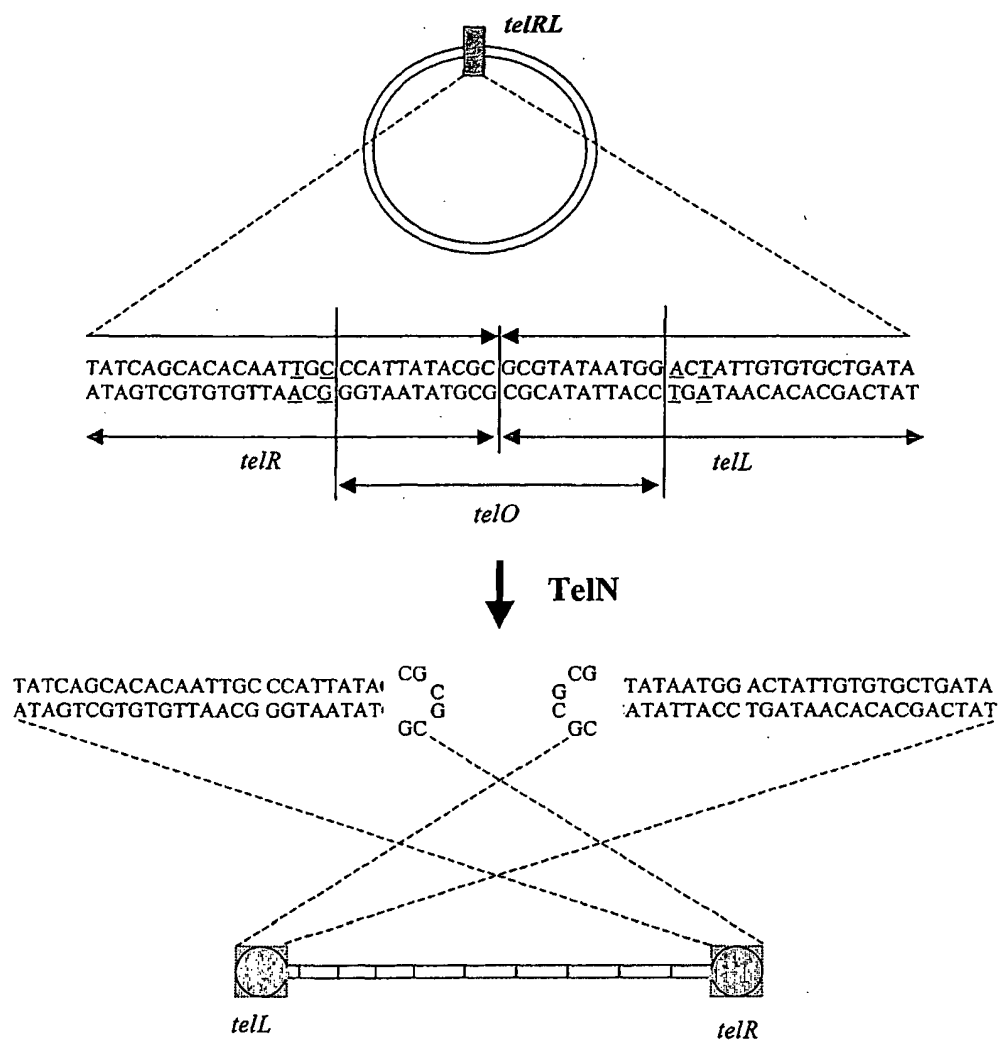
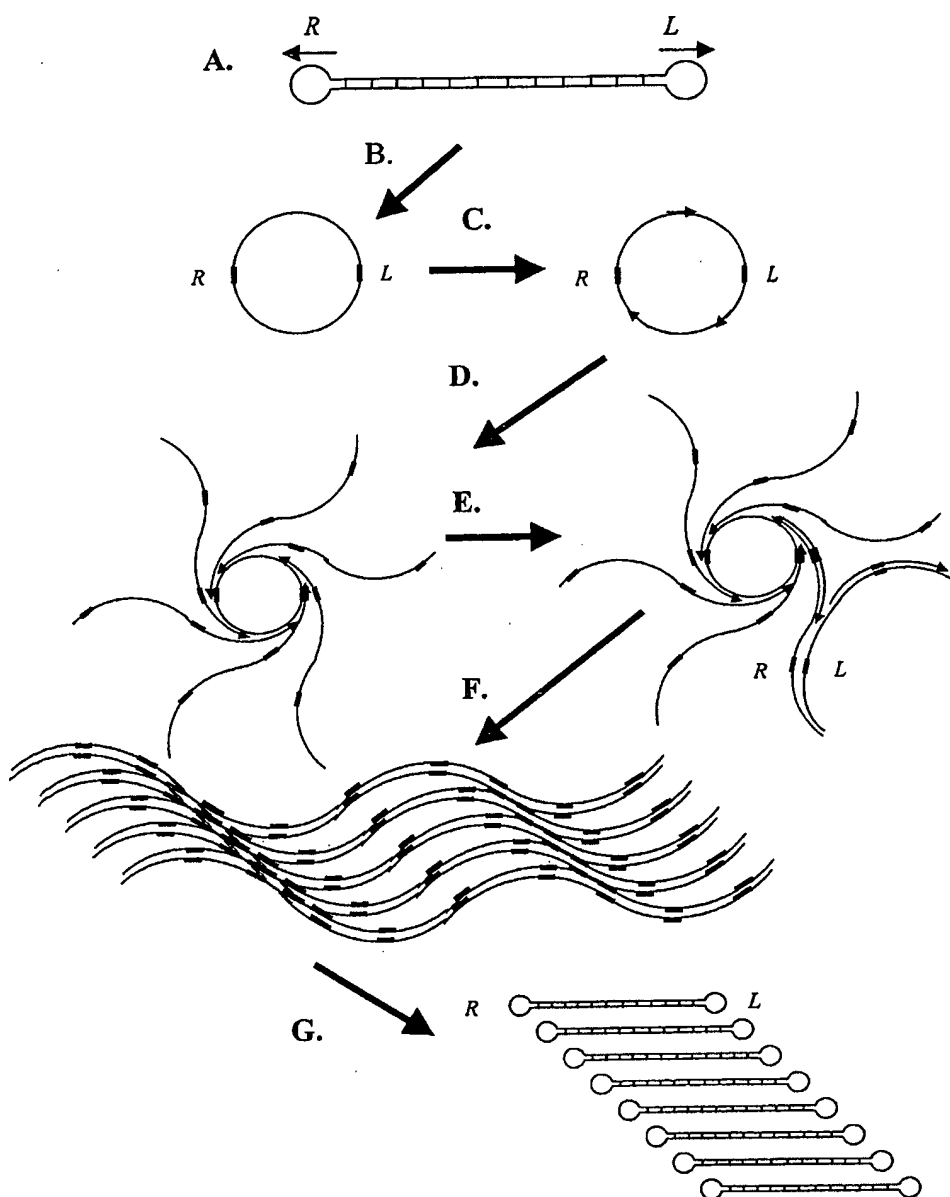
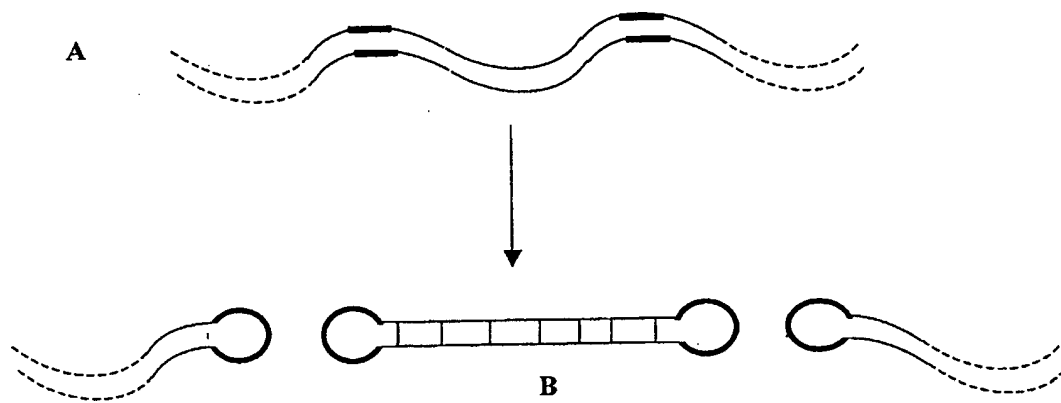


Fig. 2

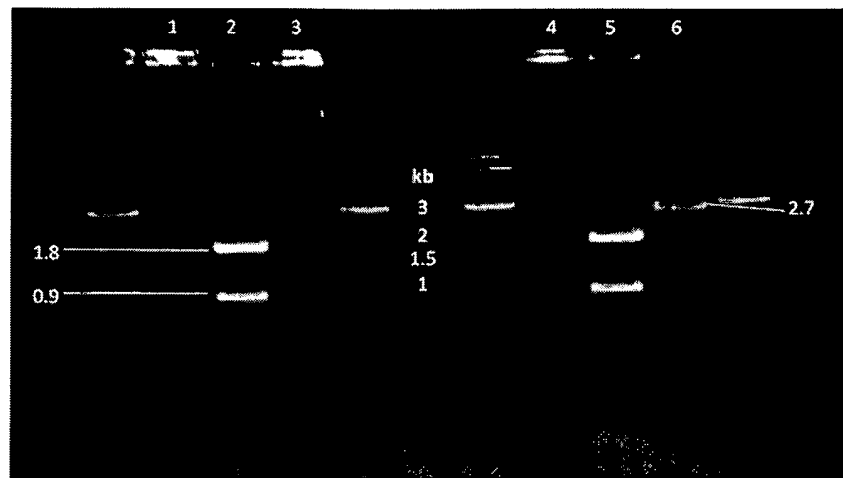


**Fig. 3**

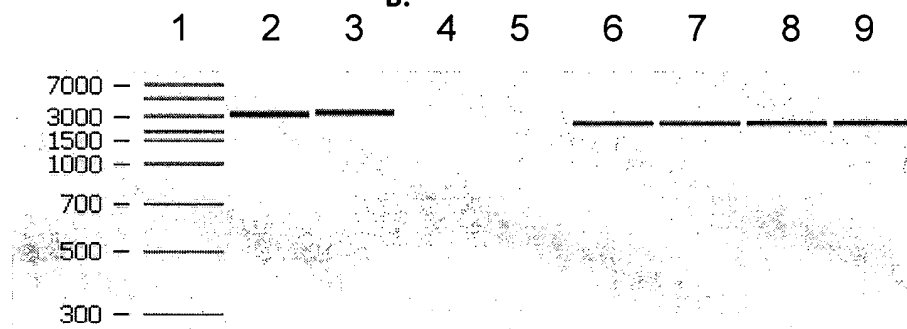
**Fig. 4**

**Fig. 5**

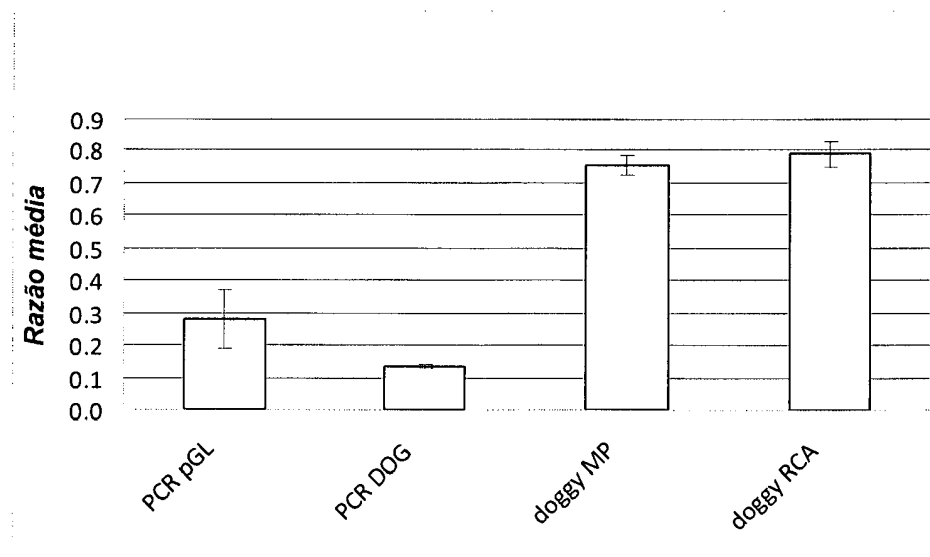
A.



B.



C.

**Fig. 6**