

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 011**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/6844** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2015 PCT/GB2015/052434**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16034849**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2015 E 15756228 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023 EP 3188836**

54 Título: **Síntesis del ADN**

- 30 Prioridad:  
**05.09.2014 GB 201415789**
- 45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.06.2024**

73 Titular/es:  
**TOUHLIGHT IP LIMITED (100.0%)  
Morelands And Riverdale Buildings, Lower  
Sunbury Road  
Hampton, TW12 2ER, GB**

72 Inventor/es:  
**PORTER, NEIL;  
ROTHWELL, PAUL y  
EXTANCE, JONATHAN**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 973 011 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Síntesis del ADN

Campo

5 La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la síntesis de ADN, ARN, proteínas y moléculas similares, en particular la síntesis enzimática de ADN sin células, preferiblemente a gran escala.

Antecedentes

10 La amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) se puede llevar a cabo mediante el uso de procesos celulares, tal como por ejemplo mediante cultivo de bacterias que propagan un ADN que se amplificará en fermentadores. También se han descrito procesos enzimáticos libres de células para la amplificación de ADN a partir de una plantilla inicial, incluida la reacción en cadena de la polimerasa y las reacciones de desplazamiento de cadenas.

En el pasado, la amplificación del ADN a escala de prueba se realizaba utilizando aparatos basados en placas de microtitulación y pipetas controladas robóticamente para añadir componentes de reacción según fuera necesario.

15 Dichos aparatos y procesos son adecuados para fabricar pequeñas cantidades de moléculas de ADN con fines de prueba, pero no proporcionan cantidades suficientes para otros fines. La amplificación y fabricación a gran escala de proteínas y ácidos nucleicos específicos se ha llevado a cabo principalmente mediante procesos celulares. Estos métodos son generalmente eficaces para la producción de volúmenes muy grandes de producto, pero su instalación es costosa.

20 También hay muchos aparatos disponibles que están específicamente adaptados para amplificar muestras de ADN utilizando el método termocíclico para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos aparatos son ideales para esa reacción, pero son inflexibles y no pueden adaptarse para realizar otras reacciones. Un ejemplo de tal aparato se divulga en US 8,163,489.

25 La síntesis de ADN a gran escala mediante síntesis química, tal como los métodos de fosforamidita, es conocida, pero no está exenta de inconvenientes. La reacción generalmente debe realizarse en disolventes orgánicos, muchos de los cuales son tóxicos o peligrosos. Otro inconveniente de la síntesis química es que no es completamente eficiente, ya que después de cada adición de nucleótidos, al menos el 2 por ciento de las cadenas de oligonucleótidos en crecimiento se tapan, lo que resulta en una pérdida de rendimiento. La pérdida total de rendimiento de la cadena de nucleótidos que se sintetiza aumenta con cada nucleótido añadido a la secuencia. Esta ineficiencia inherente en la síntesis química de oligonucleótidos limita en última instancia la longitud del oligonucleótido que se puede producir eficientemente a oligonucleótidos que tienen 50 residuos de ácido nucleico o menos.

30 Hasta la fecha, los catalizadores biológicos tales como la polimerasa no se han explotado de forma rutinaria para la fabricación a escala industrial de productos de ADN y las reacciones se han limitado en gran medida a volúmenes a escala de microlitros. La ampliación de los procesos mediante la síntesis enzimática de ADN ha resultado problemática, sobre todo por el decepcionante rendimiento del producto de ADN.

35 Por lo tanto, existe la necesidad de un proceso que pueda usarse para sintetizar ADN y moléculas similares a una escala significativa.

Resumen

40 La presente invención se refiere a un proceso para la producción de ADN sin células. El proceso puede permitir una producción mejorada de ADN en comparación con las metodologías actuales que implican procesos por lotes cerrados. Esto aumenta significativamente la productividad y al mismo tiempo reduce el coste de sintetizar ADN, particularmente a gran escala. La presente invención se refiere en general a métodos isotérmicos de amplificación de ADN que no requieren que la temperatura cambie mediante calentamiento y enfriamiento.

45 Por consiguiente, se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN en una cantidad superior a 1 g por litro de mezcla de reacción, que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de nucleótidos y uno o más cationes metálicos para formar dicha mezcla de reacción., en el que la amplificación isotérmica de la plantilla de ADN se produce mediante replicación por desplazamiento de cadena y en el que se suministran independientemente más nucleótidos y cationes metálicos a la mezcla de reacción de forma continua o en alícuotas de modo que la proporción de cationes metálicos: nucleótidos esté entre 3:1 y 1:3.

50 Por tanto, el proceso sin células implica la amplificación de la plantilla mediante replicación por desplazamiento de cadena. En una realización, se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de nucleótidos y iones metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación de dicha plantilla mediante replicación por desplazamiento de cadena, en el que se suministran de forma controlada otros nucleótidos y cationes metálicos adicionales a la mezcla de reacción.

5 Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la invención, la provisión de un suministro controlado de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción es ventajosa, ya que esta estrategia de control racional puede permitir mejoras en la velocidad de síntesis del ADN y/o un rendimiento de ADN mejorado. Estas mejoras se comparan con una mezcla de reacción análoga en la que todos los nucleótidos se suministran en la mezcla de reacción al principio. El suministro controlado de nucleótidos adicionales puede permitir una mayor productividad y/o procesividad de la enzima polimerasa.

10 Por tanto, de acuerdo con una realización de la invención, es ventajoso proporcionar un suministro controlado de cationes metálicos adicionales a la mezcla de reacción, ya que esta estrategia de control racional puede permitir mejoras en la tasa de síntesis del ADN. Estas mejoras se comparan con una mezcla de reacción análoga en la que todos los cationes metálicos se suministran en la mezcla de reacción al principio. El suministro controlado de cationes metálicos adicionales puede permitir una mayor productividad y/o procesividad de la enzima polimerasa.

15 También se proporciona una realización adicional que comprende un proceso libre de células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de uno o más cebadores, nucleótidos y cationes metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación de dicha plantilla mediante desplazamiento de cadenas replicadas a través de replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena, en el que se suministran más nucleótidos y cationes metálicos de manera controlada a la mezcla de reacción.

20 Por tanto, el proceso sin células implica la amplificación de la plantilla mediante replicación por desplazamiento de cadena. Se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de uno o más cebadores, nucleótidos y iones metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación de dicha plantilla mediante replicación por desplazamiento de cadena, en donde se suministran de manera controlada otros nucleótidos y cationes metálicos adicionales a la mezcla de reacción.

25 En una realización, también se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de nucleótidos y cationes metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación de dicha plantilla mediante el desplazamiento de cadenas replicadas mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena, en donde se suministran de manera controlada otros nucleótidos y cationes metálicos a la mezcla de reacción.

30 Los otros nucleótidos y otros cationes metálicos pueden suministrarse juntos o por separado. Se prefiere que los nucleótidos y los iones metálicos no se mezclen entre sí antes de suministrarlos a la mezcla de reacción. Los nucleótidos adicionales y cationes metálicos adicionales se pueden agregar según sea necesario a la mezcla de reacción independientemente entre sí.

35 Así, de acuerdo con una realización, es ventajoso proporcionar un suministro controlado de más nucleótidos y cationes metálicos adicionales a la mezcla de reacción, ya que esta estrategia de control racional puede permitir mejoras en la tasa de síntesis del ADN y/o en un rendimiento de ADN mejorado. Estas mejoras se comparan con una mezcla de reacción análoga en la que todos los nucleótidos y cationes metálicos se suministran en la mezcla de reacción al principio. El suministro controlado de nucleótidos adicionales puede permitir una mayor productividad y/o procesividad de la enzima polimerasa.

40 De acuerdo con cada uno de varios aspectos adicionales de la invención, se proporciona un aparato configurado para realizar un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. El aparato se puede utilizar para realizar un proceso de acuerdo con cualquier aspecto de la invención.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la plantilla de ADN puede comprender uno o más sitios objetivo de enzimas de procesamiento. La mezcla de reacción se puede poner en contacto en cualquier momento con una o más enzimas de procesamiento. Dichas enzimas se pueden proporcionar a dicha mezcla de reacción de manera controlada. Preferiblemente, la enzima de procesamiento es una enzima protelomerasa.

50 Independientemente, características opcionales de cualquier aspecto de la invención pueden ser: La plantilla de ADN puede ser circular. La amplificación por desplazamiento de cadena de dicha plantilla de ADN se puede llevar a cabo mediante amplificación por círculo rodante (RCA). La ADN polimerasa puede ser Phi29 o una variante de la misma. La amplificación del ADN es una amplificación isotérmica. Uno o más cebadores pueden ser cebadores aleatorios. El ADN sintetizado puede comprender concatámeros que comprenden unidades en tándem de secuencia de ADN amplificada a partir de la plantilla de ADN. La plantilla de ADN puede ser un ADN lineal cerrado; preferiblemente la plantilla de ADN se incuba en condiciones desnaturalizantes para formar un ADN monocatenario circular cerrado. La plantilla de ADN puede comprender al menos una secuencia objetivo de enzima de procesamiento, preferiblemente una secuencia objetivo de recombinasa o una secuencia objetivo de protelomerasa. La plantilla de ADN puede comprender un casete de expresión que comprende un promotor eucariótico enlazado operativamente a una secuencia codificante de interés y, opcionalmente, una secuencia de terminación de la transcripción eucariótica. El casete de expresión puede estar flanqueado en cualquier lado por una secuencia objetivo de enzima de procesamiento, preferiblemente una secuencia objetivo de recombinasa o una secuencia objetivo de protelomerasa.

El ADN amplificado puede ponerse en contacto con una enzima recombinasa o una enzima protelomerasa, según corresponda.

La cantidad de ADN que se puede sintetizar es superior a 1 gramo por litro de mezcla de reacción.

5 Los nucleótidos adicionales y/o los iones metálicos adicionales se pueden suministrar en varias partes alícuotas a la mezcla de reacción. Los otros nucleótidos y/o otros iones metálicos se pueden suministrar a intervalos regulares durante toda la duración del proceso, opcionalmente al menos cada 30 minutos. Se pueden suministrar al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alícuotas a la mezcla de reacción. Los otros nucleótidos y/o otros iones metálicos se pueden suministrar de forma continua a la mezcla de reacción. Los iones metálicos adicionales y/o los nucleótidos adicionales se pueden alimentar a la mezcla de reacción, opcionalmente desde una fuente externa usando una bomba o se suministran a la mezcla de reacción usando una bomba osmótica.

10 Los nucleótidos o nucleótidos adicionales pueden comprender nucleótidos biológicamente inactivos; opcionalmente, estos nucleótidos biológicamente inactivos se suministran a la mezcla de reacción mediante activación, preferiblemente por medios químicos o físicos. Los nucleótidos biológicamente inactivos pueden ser nucleótidos enjaulados que se activan mediante fotólisis.

15 Los nucleótidos adicionales y/o iones metálicos adicionales y/o enzima de procesamiento pueden suministrarse en respuesta a una señal relacionada con la concentración de ADN en la mezcla de reacción, que puede monitorearse opcionalmente midiendo la diferencia de presión de la mezcla de reacción, o una porción del mismo, que posiblemente pueda generar una señal. La señal que indica la concentración de ADN se puede generar midiendo una diferencia de presión creada por una bomba alternativa que elimina y devuelve una porción de la mezcla de reacción, opcionalmente sobre un sensor de presión.

20 Los cationes metálicos o cationes metálicos adicionales pueden comprender uno o más metales seleccionados de la lista que consiste en:  $Mg^{2+}$ ,  $Be^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , preferiblemente  $Mg^{2+}$ . Los otros cationes metálicos se pueden suministrar con los otros nucleótidos. La proporción entre los cationes metálicos y los nucleótidos se puede mantener en aproximadamente 3:1 en la mezcla de reacción. La concentración de iones metálicos discutida en el presente documento, particularmente la concentración de iones metálicos libres se relaciona con el catión metálico específico de interés (es decir,  $Mg^{2+}$ ) y no la concentración de todas las especies de iones metálicos en la mezcla de reacción.

30 La mezcla de reacción contiene al menos un nucleótido. Luego se añaden uno o más nucleótidos adicionales. Los nucleótidos u otros nucleótidos son desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) o un derivado o una versión modificada de los mismos. Los nucleótidos o nucleótidos adicionales son uno o más de trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), trifosfato de desoxitimidina (dTTP) y derivados de los mismos. Los nucleótidos o nucleótidos adicionales se proporcionan como uno o más ácidos libres, sus sales o quelatos de los mismos. Las sales o quelatos pueden incluir uno o más de los siguientes iones metálicos:  $Mg^{2+}$ ,  $Be^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ . La concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se puede mantener entre 0.001 mM y 6 mM, opcionalmente a aproximadamente 3 mM.

35 El proceso puede ser un proceso por lotes o un proceso de flujo continuo. Otras características opcionales son las que se describen en las reivindicaciones dependientes.

Más ventajas se describen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

40 La presente invención se describirá más adelante con referencia a realizaciones ejemplares y los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un aparato de síntesis útil de acuerdo con una realización de la invención. Para facilitar la comprensión y hacer más visibles los componentes principales, en esta Figura se omiten ciertos componentes y conductos de conexión;

45 La Figura 2 es un diagrama esquemático del aparato de la Figura 1;

La Figura 3 es una vista en sección transversal de un recipiente de reacción útil de acuerdo con una realización de la invención;

50 La Figura 4 es un gráfico que muestra datos que comparan los datos de presión diferencial para una reacción de control solo con agua (cuadrados) con datos generados a partir de una reacción de amplificación de ADN estándar usando ADN polimerasa Phi29 (diamantes) frente al tiempo (como se describe en la Tabla 1). Las unidades de diferencia de presión son arbitrarias y el tiempo está en minutos;

La Figura 5 es un gráfico de la diferencia de presión mediante el ensayo fluorométrico Qubit® BR ADNds. Las unidades de diferencia de presión son arbitrarias y la concentración de ADN está en  $\mu g/ml$ ;

La Figura 6 es una fotografía de un gel de electroforesis de productos de ADN lineales cerrados covalentemente (2,6 kbases y 2 kbases) en una reacción de amplificación de ADN con concentraciones iniciales de dNTP de 2 mM, 4 mM y 8 mM;

5 La Figura 7 es un gráfico de mediciones de presión diferencial frente al tiempo (minutos) para una reacción con una concentración inicial de dNTP 2 mM (sin dNTP adicionales añadidos) (círculos abiertos), dNTP 2 mM alimentados con dNTP 2 mM adicionales (triángulos), dNTP 4 mM del inicio (sin dNTP adicionales agregados) (diamantes) y dNTP 2 mM alimentados con una concentración 2 mM de dNTP adicionales tres veces (cruces). Las flechas indican los tiempos de adición de dNTP para cada reacción;

10 La Figura 8 es un gráfico de la rata de reacción inicial (unidades de presión diferencial/min) frente a la proporción de iones de magnesio a dNTP para una reacción con una concentración inicial de dNTP 2 mM alimentada 3 veces más con dNTP 2 mM;

La Figura 9 representa la plantilla de ADN proTLx-N3X2 Cal 09 HA;

La Figura 10 representa la plantilla de ADN proTLx B5X4 Cal 09 HA;

La Figura 11 representa la plantilla de ADN proTLx-K N3X2 ova;

15 La Figura 12 representa la plantilla de ADN proTLx-K N3X2 lux; y

La Figura 13 representa un gráfico de mediciones de presión diferencial frente al tiempo (minutos) para una reacción que contiene inicialmente dNTP 2 mM y  $Mg^{2+}$  7.5 mM, que tenía una adición controlada ("Alimentación") de nucleótidos y  $Mg^{2+}$  en los puntos indicados (300 min, 600 min, 900 min, 1080 min, 1230 min y 1440 min - triángulos blancos) con dNTP 2 mM y suficiente  $Mg^{2+}$  para mantener una proporción de 3:1  $Mg^{2+}$ : dNTPS después de la primera alimentación), a la que se realiza una adición controlada de una protelomerasa a 1050 minutos (TelN 2  $\mu$ M) como se indica (cuadrado). Las flechas indican el tiempo de cada adición de dNTP seguida inmediatamente por la adición de  $Mg^{2+}$  y adición de TelN.

#### Descripción detallada

25 La presente invención se refiere a procesos libres de células para sintetizar ADN. Los procesos de la invención pueden permitir una síntesis de ADN de alto rendimiento.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) sintetizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier molécula de ADN. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario. El ADN puede ser lineal. El ADN se puede procesar para formar círculos, particularmente minicírculos, círculos cerrados monocatenarios, círculos cerrados bicatenarios, círculos abiertos bicatenarios o ADN bicatenario lineal cerrado. Se puede permitir que el ADN se forme o procesarse para formar una estructura secundaria particular, tal como, entre otros, bucles en horquilla (bucles de tallo), bucles en horquilla imperfectos, pseudonudos o uno cualquiera de los diversos tipos de doble hélice (A-ADN, ADN-B o ADN-Z). El ADN también puede formar horquillas.

35 El ADN sintetizado puede tener cualquier longitud adecuada. Pueden ser posibles longitudes de hasta 77 kilobases (kb o kbase) o superiores utilizando el proceso de la invención. Más particularmente, la longitud del ADN que puede sintetizarse de acuerdo con el proceso puede ser del orden de hasta 60 kilobases, o hasta 50 kilobases, o hasta 40 kilobases, o hasta 30 kilobases. Preferiblemente, el ADN sintetizado puede tener de 100 bases a 60 kilobases, de 200 bases a 20 kilobases, más preferiblemente de 200 bases a 15 kilobases, lo más preferiblemente de 2 kilobases a 15 kilobases.

40 La cantidad de ADN sintetizado de acuerdo con los procesos de la presente invención puede exceder los 10 g/l de mezcla de reacción. Se prefiere que la cantidad de ADN sintetizado sea de hasta 10, 9, 8, 7, 6 o 5 g/l. Una cantidad preferida de ADN sintetizado es preferiblemente de 1 a 5 g/l. La cantidad de ADN producida puede describirse como cantidades industriales o comerciales, a gran escala o producción en masa. El ADN producido por los procesos puede ser uniforme en calidad, es decir, en longitud y secuencia del ADN. Por tanto, los procesos pueden ser adecuados para la síntesis de ADN a gran escala.

45 En las técnicas actualmente disponibles para sintetizar ADN, la mayoría se realizan a pequeña escala o en laboratorio, y las reacciones tienen lugar en volúmenes de microlitros. Los esfuerzos para ampliar la PCR todavía dan como resultado rendimientos bajos de ADN, tal como aproximadamente 20-40 mg por litro de mezcla de reacción (Vandalia), ya que la reacción se lleva a cabo solo con una cantidad inicial de nucleótidos y no se suministran más nucleótidos, y la formación del producto inhibe la reacción.

50 La plantilla de ADN puede ser cualquier plantilla adecuada. La plantilla de ADN puede ser monocatenaria (ss) o bicatenaria (ds). La plantilla de ADN puede ser lineal o circular. Una plantilla de ADN bicatenario puede ser un ADN ds circular abierto, un ADN ds circular cerrado, un ADN ds lineal abierto o un ADN ds lineal cerrado. Una plantilla de ADN monocatenario puede ser un ADN ss lineal o un ADN ss circular cerrado. Esta última plantilla de ADN se puede producir desnaturizando un ADN ds lineal cerrado. El ADN lineal cerrado, es decir, moléculas de ADN lineales cerradas

covalentemente, normalmente comprende extremos cerrados covalentemente, es decir, extremos en horquilla, donde el apareamiento de bases entre cadenas de ADN complementarias no está presente. Los bucles en forma de horquilla unen los extremos de las cadenas de ADN complementarias. Los propios bucles pueden contener secuencias complementarias, particularmente si los bucles comprenden parte de la secuencia objetivo de la protelomerasa. El ADN ds lineal cerrado puede ser un plásmido.

La plantilla de ADN puede comprender cualquier secuencia, ya sea de origen natural o artificial. La plantilla de ADN puede comprender al menos una secuencia objetivo de enzima de procesamiento, tal como uno, dos, tres, cuatro o más sitios objetivo de enzima de procesamiento. Dicha secuencia objetivo debe permitir que el ADN se procese adicionalmente opcionalmente después de la síntesis. Una enzima de procesamiento es una enzima que reconoce su sitio objetivo y procesa el ADN. La secuencia objetivo de la enzima de procesamiento puede ser una secuencia objetivo para una enzima de restricción. Una enzima de restricción, es decir, una endonucleasa de restricción se une a una secuencia objetivo y la escinde en un punto específico. La secuencia objetivo de la enzima de procesamiento puede ser un objetivo para una recombinasa. Una recombinasa cataliza direccionalmente reacciones de intercambio de ADN entre secuencias cortas (30-40 nucleótidos) del sitio objetivo que son específicas de cada recombinasa. Ejemplos de recombinasas incluyen la recombinasa Cre (con loxP como secuencia objetivo) y la recombinasa FLP (con sitios objetivo de reconocimiento de flippasa (FRT) cortos). La secuencia objetivo de la enzima de procesamiento puede ser un objetivo para una integrasa específica de sitio, tal como la integrasa phiC31. La secuencia objetivo de la enzima de procesamiento puede ser un objetivo para una enzima protelomerasa. Una secuencia objetivo de protelomerasa es cualquier secuencia de ADN cuya presencia en una plantilla de ADN permite su conversión en un ADN lineal cerrado mediante la actividad enzimática de la protelomerasa. En otras palabras, la secuencia objetivo de la protelomerasa es necesaria para la escisión y religación del ADN bicatenario mediante la protelomerasa para formar ADN lineal covalentemente cerrado. Normalmente, una secuencia objetivo de protelomerasa comprende cualquier secuencia palindrómica, es decir, cualquier secuencia de ADN bicatenario que tenga simetría rotacional doble, también descrita en el presente documento como una repetición invertida. La longitud de la repetición invertida difiere según el organismo específico. El palíndromo o repetición invertida puede ser perfecto o imperfecto. Una secuencia objetivo de protelomerasa comprende preferiblemente una secuencia palindrómica (repetición invertida) bicatenaria de al menos 14 pares de bases de longitud. Los sitios de direccionamiento de protelomerasa adecuados se conocen en la técnica y se analizan en el documento EP2,391,731. Una enzima protelomerasa adecuada puede ser TelN del fago N15 de *Escherichia coli*. Se prefiere que el sitio objetivo de la enzima de procesamiento sea un sitio objetivo de protelomerasa.

La secuencia objetivo de la enzima de procesamiento puede ser una secuencia objetivo para una ARN polimerasa, de modo que el ADN se convierta en una plantilla para la síntesis de polipéptidos. En este caso, el sitio de direccionamiento de la enzima de procesamiento es un promotor, preferiblemente un promotor eucariótico.

El proceso puede comprender un paso adicional de poner en contacto la mezcla de reacción con una enzima de procesamiento. La mezcla de reacción se puede poner en contacto con una enzima de procesamiento en cualquier momento. Preferiblemente, la mezcla de reacción se pone en contacto con una enzima de procesamiento una vez que se completa la síntesis de ADN. La enzima de procesamiento puede ser una ARN polimerasa, una recombinasa, una endonucleasa de restricción o una protelomerasa. Preferiblemente la enzima de procesamiento es una protelomerasa.

Una protelomerasa, como se puede usar en la invención, es cualquier polipéptido capaz de escindir y volver a unirse a una plantilla que comprende un sitio objetivo de protelomerasa para producir una molécula de ADN lineal cerrada covalentemente. Por tanto, la protelomerasa tiene funciones de ligadura y escisión del ADN. También se han descrito enzimas con actividad de tipo protelomerasa como resolvasas teloméricas (por ejemplo, en *Borrelia burgdorferi*). Un sustrato típico de la protelomerasa es el ADN circular de doble cadena. Si este ADN contiene un sitio objetivo de protelomerasa, la enzima puede cortar el ADN en este sitio y ligar los extremos para crear una molécula de ADN lineal bicatenaria cerrada covalentemente. Los requisitos para los sitios objetivo de la protelomerasa se analizan anteriormente. Como también se describió anteriormente, la capacidad de un polipéptido dado para catalizar la producción de ADN lineal cerrado a partir de una plantilla que comprende un sitio objetivo de protelomerasa se puede determinar usando cualquier ensayo adecuado descrito en la técnica.

El procesamiento del ADN puede requerir el uso de al menos una protelomerasa. El proceso de la invención puede comprender el uso de más de una protelomerasa, tal como dos, tres, cuatro, cinco o más protelomerasas diferentes. Ejemplos de protelomerasas adecuadas incluyen aquellas de bacteriófagos tales como phiHAP-1 de *halomonas quamarina*, PY54 desde *Yersinia enterocolitica* phiK02 de *Klebsiella oxitoca* y VP882 de *Vibrio sp.*, y N15 de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 15), o variantes de cualquiera de los mismos. Se prefiere particularmente el uso de protelomerasa del bacteriófago N15 o una variante de la misma. Esta enzima también se conoce como TelN. Estas enzimas se describen con más detalle en el documento WO2012/017210. El documento WO2006119066, otro documento sobre amplificación de ADN describe el uso de una reacción de desplazamiento de cadena.

Por lo tanto, el proceso puede realizarse sobre una plantilla de ADN que incluye una enzima de procesamiento, y la enzima de procesamiento puede suministrarse de manera controlada a la mezcla de reacción. La enzima de procesamiento puede suministrarse en cualquier momento apropiado a la mezcla de reacción; esto puede ser en respuesta a una señal. Se pueden realizar una o más adiciones de enzima de procesamiento. Se prefiere que la enzima de procesamiento se suministre en alícuotas, que se añaden discretamente a la mezcla de reacción. Se pueden añadir a la mezcla de reacción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más alícuotas de enzima de procesamiento. Puede

ser ventajoso añadir la enzima de procesamiento justo antes de que se requiera una alícuota de nucleótidos adicionales y/o iones metálicos adicionales. Alternativamente, la enzima de procesamiento se puede agregar con o después de agregar una alícuota de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción. La enzima de procesamiento puede agregarse en respuesta a una señal de que el ADN en la mezcla de reacción ha alcanzado una concentración deseada. Esta concentración de ADN puede detectarse como se describe en el presente documento.

La plantilla de ADN puede comprender un casete de expresión que comprende, consiste o consiste esencialmente en un promotor eucariótico enlazado operativamente a una secuencia que encierra una proteína de interés y, opcionalmente, una secuencia de terminación de la transcripción eucariótica. Opcionalmente, el casete de expresión puede ser un casete mínimo, que carece de una o más secuencias bacterianas o vectoriales, típicamente seleccionadas del grupo que consiste en: (i) orígenes bacterianos de replicación; (ii) marcadores de selección bacteriana (tales como genes de resistencia a antibióticos) y (iii) motivos CpG no metilados. Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que inicia y regula la transcripción de un polinucleótido. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor está reprimida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.) y promotores constitutivos. Se pretende que el término "promotor" o "elemento de control" incluya regiones promotoras de longitud completa y segmentos funcionales (por ejemplo, controla la transcripción o traducción) de estas regiones. "Enlazado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, un promotor determinado enlazado operativamente a una secuencia de ácido nucleico es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia cuando están presentes las enzimas adecuadas. No es necesario que el promotor sea contiguo a la secuencia, siempre que funcione para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico y la secuencia promotora todavía puede considerarse "enlazada operativamente" a la secuencia codificante. Por tanto, el término "enlazado operativamente" pretende abarcar cualquier espaciamiento u orientación del elemento promotor y la secuencia de ADN de interés que permita el inicio de la transcripción de la secuencia de ADN de interés tras el reconocimiento del elemento promotor por un complejo de transcripción.

La plantilla de ADN puede tener cualquier longitud adecuada. En particular, la plantilla de ADN puede tener hasta 60 kilobases, o hasta 50 kilobases, o hasta 40 kilobases, o hasta 30 kilobases. Preferiblemente, la plantilla de ADN puede tener de 100 bases a 60 kilobases, de 200 bases a 20 kilobases, más preferiblemente de 200 bases a 15 kilobases, lo más preferiblemente de 2 kilobases a 15 kilobases.

La plantilla de ADN puede proporcionarse en una cantidad suficiente para su uso en el proceso mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la plantilla puede producirse mediante PCR.

En el proceso se puede amplificar la totalidad o una porción seleccionada de la plantilla de ADN.

La plantilla de ADN puede comprender una secuencia de ADN para la expresión. El ADN puede ser para expresión en una célula (es decir, una célula transfectada *in vitro* o *en vivo*), o puede ser para expresión en un sistema libre de células (es decir, síntesis de proteínas). La secuencia de ADN para la expresión puede tener fines terapéuticos, es decir, terapia génica de una vacuna de ADN. La secuencia para la expresión puede ser un gen, y dicho gen puede codificar una vacuna de ADN, una proteína terapéutica y similares. La secuencia de ADN puede comprender una secuencia que se transcribe en una forma de ARN activa, es decir, una pequeña molécula de ARN de interferencia (ARNsi).

La plantilla de ADN se pone en contacto con al menos una polimerasa. Se pueden usar una, dos, tres, cuatro o cinco polimerasas diferentes. La polimerasa puede ser cualquier polimerasa adecuada, de modo que sintetice polímeros de ADN. La polimerasa puede ser una ADN polimerasa. Puede usarse cualquier ADN polimerasa, incluyendo cualquier ADN polimerasa disponible comercialmente. Se pueden usar dos, tres, cuatro, cinco o más ADN polimerasas diferentes, por ejemplo, una que proporcione una función de corrección y una o más que no la proporcionen.

Una polimerasa puede ser muy estable, de modo que su actividad no se reduzca sustancialmente mediante una incubación prolongada en las condiciones del proceso. Por lo tanto, la enzima preferiblemente tiene una vida media larga bajo una variedad de condiciones de proceso que incluyen, entre otras, temperatura y pH. También se prefiere que una polimerasa tenga una o más características adecuadas para un proceso de fabricación. La polimerasa tiene preferiblemente una alta fidelidad, por ejemplo, debido a que tiene actividad correctora. Además, se prefiere que una polimerasa muestre una alta procesividad, una alta actividad de desplazamiento de cadena y una Km baja para dNTP y ADN. Una polimerasa puede ser capaz de utilizar ADN circular y/o lineal como plantilla. La polimerasa puede ser capaz de utilizar ADNds o ADNss como plantilla. Se prefiere que una polimerasa no muestre actividad exonucleasa de ADN que no esté relacionada con su actividad correctora.

El experto puede determinar si una polimerasa determinada muestra o no características tal como se definen anteriormente en comparación con las propiedades mostradas por polimerasas disponibles comercialmente, por ejemplo Phi29 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, EE. UU.), Deep Vent® (New England Biolabs, Inc.), ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (New England Biolabs, Inc.), fragmento Klenow de ADN polimerasa

I (New England Biolabs, Inc.), transcriptasa inversa M-MuLV (New England Biolabs, Inc.), VentR®(exo-menos) ADN polimerasa (New England Biolabs, Inc.), VentR® ADN polimerasa (New England Biolabs, Inc.), Deep Vent® (exo-)ADN polimerasa (New England Biolabs, Inc.) y fragmento grande de ADN polimerasa Bst (New England Biolabs, Inc.). Cuando se hace referencia a una alta procesividad, esto normalmente denota el número promedio de nucleótidos agregados por una enzima polimerasa por asociación/disociación con la plantilla, es decir, la longitud de la extensión del cebador obtenida de un único evento de asociación.

Se prefieren las polimerasas del tipo de desplazamiento de cadenas. Las polimerasas de tipo desplazamiento de cadena preferidas son Phi 29, Deep Vent y Bst ADN polimerasa I o variantes de cualquiera de las mismas. El "desplazamiento de cadena" describe la capacidad de una polimerasa de desplazar cadenas complementarias al encontrar una región de ADN bicatenario durante la síntesis. De este modo, la plantilla se amplifica desplazando cadenas complementarias y sintetizando una nueva cadena complementaria. Por lo tanto, durante la replicación por desplazamiento de cadena, una cadena recién replicada se desplazará para dejar paso a la polimerasa para replicar una cadena complementaria adicional. La reacción de amplificación se inicia cuando un cebador o el extremo libre 3' de una plantilla monocatenaria se fusiona con una secuencia complementaria en una plantilla (ambos son eventos de cebado). Cuando continúa la síntesis de ADN y si encuentra un cebador adicional u otra cadena fusionada con la plantilla, la polimerasa lo desplaza y continúa elongación de su cadena. El desplazamiento de la cadena genera ADN monocatenario recién sintetizado que puede actuar como plantilla para más eventos de cebado. La preparación del ADN recién sintetizado conduce a una hiperramificación y a un alto rendimiento de productos. Debe entenderse que los métodos de amplificación por desplazamiento de cadena difieren de los métodos basados en PCR en que los ciclos de desnaturalización no son esenciales para una amplificación eficiente del ADN, ya que el ADN bicatenario no es un obstáculo para la síntesis continua de nuevas cadenas de ADN. La amplificación por desplazamiento de cadena puede requerir solo una ronda inicial de calentamiento, para desnaturalizar la plantilla inicial si es bicatenaria, para permitir que el cebador se hibride con el sitio de fusión del cebador si se usa. Por lo tanto, la amplificación puede describirse como isotérmica, ya que no es necesario ningún calentamiento o enfriamiento adicional. Por el contrario, los métodos de PCR requieren ciclos de desnaturalización (es decir, elevar la temperatura a 94 grados centígrados o más) durante el proceso de amplificación para fundir el ADN bicatenario y proporcionar nuevas plantillas monocatenarias. Durante el desplazamiento de cadenas, la polimerasa desplazará cadenas de ADN ya sintetizado. Además, utilizará ADN recién sintetizado como plantilla, lo que garantizará una rápida amplificación del ADN.

Una polimerasa de desplazamiento de cadena usada en el proceso de la invención tiene preferiblemente una procesividad de al menos 20 kb, más preferiblemente, al menos 30 kb, al menos 50 kb o al menos 70 kb o mayor. En una realización, la ADN polimerasa de desplazamiento de cadena tiene una procesividad que es comparable o mayor que la ADN polimerasa phi29.

Por lo tanto, se prefiere la replicación por desplazamiento de cadena. Durante la replicación por desplazamiento de cadena, la plantilla se amplifica desplazando cadenas ya replicadas, que han sido sintetizadas por la acción de la polimerasa, desplazando a su vez otra cadena, que puede ser la cadena complementaria original de una plantilla bicatenaria, o una cadena complementaria recién sintetizada, esta última sintetizada por la acción de una polimerasa sobre un cebador anterior fusionado con la plantilla. Por lo tanto, la amplificación de la plantilla puede ocurrir mediante el desplazamiento de cadenas replicadas mediante el desplazamiento de cadena por replicación de otra cadena. Este proceso puede describirse como amplificación por desplazamiento de cadena o replicación por desplazamiento de cadena.

Un proceso de replicación por desplazamiento de cadena preferido es la amplificación isotérmica mediada por bucles o LAMP. LAMP generalmente utiliza de 4 a 6 cebadores que reconocen de 6 a 8 regiones distintas del ADN plantilla. En resumen, una ADN polimerasa que desplaza cadenas inicia la síntesis y 2 de los cebadores forman estructuras de bucle para facilitar rondas posteriores de amplificación. Un cebador interno que contiene secuencias de las cadenas sentido y antisentido del ADN objetivo inicia LAMP. La siguiente síntesis de ADN por desplazamiento de cadena cebada por un cebador externo libera un ADN monocatenario. Esto sirve como plantilla para la síntesis de ADN cebada por los segundos cebadores internos y externos que se hibridan con el otro extremo del objetivo, lo que produce una estructura de ADN de tallo-bucle. En el ciclo LAMP posterior, un cebador interno se hibrida con el bucle del producto e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento, produciendo el ADN de tallo-bucle original y un nuevo ADN de tallo-bucle con un tallo dos veces más largo.

Un proceso de replicación por desplazamiento de cadena preferido es la amplificación por círculo rodante (RCA). El término RCA describe la capacidad de las polimerasas de tipo RCA para progresar continuamente alrededor de una cadena plantilla de ADN circular mientras se extiende un cebador hibridado. Esto conduce a la formación de productos lineales monocatenarios con múltiples repeticiones de ADN amplificado. La secuencia de la plantilla circular (una sola unidad) se repite varias veces dentro de un producto lineal. Para una plantilla circular, el producto inicial de la amplificación por desplazamiento de cadena es un concatámero monocatenario, que es sentido o antisentido, dependiendo de la polaridad de la plantilla. Estos productos lineales monocatenarios sirven como base para múltiples eventos de hibridación, extensión de cebadores y desplazamiento de cadenas, lo que da como resultado la formación de productos de ADN bicatenario concataméricos, que nuevamente comprenden múltiples repeticiones de ADN amplificado. Por tanto, hay múltiples copias de cada ADN de "unidad única" amplificado en los productos de ADN bicatenario concataméricos. Las RCA polimerasas son particularmente preferidas para su uso en el proceso de la presente invención. Los productos de los procesos de replicación por desplazamiento de cadena de tipo RCA pueden

requerir procesamiento para liberar ADN de una sola unidad. Esto es deseable si se requieren unidades individuales de ADN.

5 Para permitir la amplificación, la plantilla de ADN también se pone en contacto con uno o más cebadores. Los cebadores pueden ser no específicos (es decir, de secuencia aleatoria) o pueden ser específicos para una o más secuencias comprendidas dentro de la plantilla de ADN. Si los cebadores son de secuencia aleatoria, permiten un inicio no específico en cualquier sitio de la plantilla de ADN. Esto permite una alta eficiencia de amplificación a través de múltiples reacciones de iniciación desde cada cadena plantilla. Ejemplos de cebadores aleatorios son hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros o secuencias de mayor longitud, por ejemplo, de 12, 15, 18, 20 o 30 nucleótidos de longitud. Un cebador aleatorio puede tener una longitud de 6 a 30, 8 a 30 o 12 a 30 nucleótidos. Los cebadores aleatorios normalmente se proporcionan como una mezcla de oligonucleótidos que son representativos de todas las combinaciones potenciales de, por ejemplo, hexámeros, heptámeros, octámeros o nonámeros en la plantilla de ADN.

15 En una realización, los cebadores o uno o más de los cebadores son específicos. Esto significa que tienen una secuencia que es complementaria a una secuencia en la plantilla de ADN a partir de la cual se desea iniciar la amplificación. En esta realización, se puede usar un par de cebadores para amplificar específicamente una porción de la plantilla de ADN que es interna a los dos sitios de unión del cebador. Alternativamente, se puede utilizar un único cebador específico.

20 En una realización, la plantilla de ADN incluye una o más secuencias objetivo de protelomerasa. Estas secuencias objetivo son de naturaleza palindrómica. En esta realización, es posible utilizar un cebador específico que se une a la secuencia palindrómica dentro de un sitio de unión de protelomerasa y, por lo tanto, puede cebar la amplificación en ambas cadenas de la plantilla de ADN. Este proceso se describe en detalle en el documento WO2012/017210. Por tanto, un único cebador es suficiente para la amplificación.

25 Los cebadores pueden no estar marcados o pueden comprender uno o más marcadores, por ejemplo, radionucleidos o tintes fluorescentes. Los cebadores también pueden comprender nucleótidos modificados químicamente. Por ejemplo, el cebador se puede tapar para evitar el inicio de la síntesis de ADN hasta que se retire la tapa, es decir, por medios químicos o físicos. Las longitudes/secuencias de los cebadores normalmente se pueden seleccionar basándose en consideraciones de temperatura, es decir, que sean capaces de unirse a la plantilla a la temperatura utilizada en el paso de amplificación.

30 El contacto de la plantilla de ADN con la polimerasa y uno o más cebadores puede tener lugar en condiciones que promuevan la fusión de los cebadores con la plantilla de ADN. Las condiciones incluyen la presencia de ADN monocatenario que permita la hibridación de los cebadores. Las condiciones también incluyen una temperatura y un amortiguador que permitan la fusión del cebador con la plantilla. Se pueden seleccionar condiciones de fusión/hibridación apropiadas dependiendo de la naturaleza del cebador. Un ejemplo de condiciones de fusión preferidas utilizadas en la presente invención incluye un amortiguador Tris-HCl 30 mM, pH 7.5, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM. La fusión se puede llevar a cabo después de la desnaturalización usando calor mediante enfriamiento gradual hasta la temperatura de reacción deseada.

35 Sin embargo, la amplificación mediante replicación por desplazamiento de cadena también puede tener lugar sin un cebador y, por lo tanto, no requiere que se produzca hibridación ni extensión del cebador. En cambio, la plantilla de ADN monocatenario se autoceba formando horquillas, que tienen un extremo 3' libre disponible para extensión. Los pasos restantes de la amplificación siguen siendo los mismos.

La plantilla de ADN y la polimerasa también se ponen en contacto con nucleótidos. La combinación de plantilla de ADN, polimerasa y nucleótidos forma una mezcla de reacción. La mezcla de reacción también puede comprender uno o más cebadores. La mezcla de reacción también incluye uno o más cationes metálicos.

45 Un nucleótido es un monómero o unidad única de ácidos nucleicos y los nucleótidos están compuestos por una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos (ribosa o desoxirribosa) y al menos un grupo fosfato. Puede usarse cualquier nucleótido adecuado.

Los nucleótidos pueden estar presentes como ácidos libres, sus sales o quelatos, o una mezcla de ácidos libres y/o sales o quelatos.

50 Los nucleótidos pueden estar presentes como sales de nucleótidos de iones metálicos monovalentes o sales de nucleótidos de iones metálicos divalentes. Las sales pueden incluir sales de iones metálicos divalentes, tales como, entre otras, magnesio (Mg<sup>2+</sup>), manganeso (Mn<sup>2+</sup>), calcio (Ca<sup>2+</sup>), berilio (Be<sup>2+</sup>), zinc (Zn<sup>2+</sup>) y estroncio (Sr<sup>2+</sup>), o sales de iones metálicos monovalentes, incluidos, entre otros, litio (Li<sup>+</sup>), sodio (Na<sup>+</sup>) o potasio (K<sup>+</sup>).

55 La base nitrogenada puede ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). La base nitrogenada también puede ser bases modificadas, tales como 5-metilcitosina (m5C), pseudouridina (ψ), dihidrouridina (D), inosina (I) y 7-metilguanosina (m7G).

Se prefiere que el azúcar de cinco carbonos sea una desoxirribosa, de modo que el nucleótido sea un desoxinucleótido.

El nucleótido puede estar en forma de desoxinucleósido trifosfato, denominado dNTP. Esta es una realización preferida de la presente invención. Los dNTP adecuados pueden incluir dATP (trifosfato de desoxiadenosina), dGTP (trifosfato de desoxiguanosina), dTTP (trifosfato de desoxitimidina), dUTP (trifosfato de desoxiuridina), dCTP (trifosfato de desoxicitidina), dITP (trifosfato de desoxiinosina), dXTP (trifosfato de desoxixantosina) y derivados y versiones modificadas de los mismos. Se prefiere que los dNTP comprendan uno o más de dATP, dGTP, dTTP o dCTP, o versiones modificadas o derivados de los mismos. Se prefiere usar una mezcla de dATP, dGTP, dTTP y dCTP o una versión modificada de los mismos.

Los nucleótidos pueden estar en solución o presentarse en forma liofilizada. Se prefiere una solución de nucleótidos.

Los nucleótidos pueden comprender nucleótidos modificados, y estos nucleótidos modificados pueden estar en una forma biológicamente inactiva. Por tanto, el nucleótido modificado puede ser un nucleótido biológicamente inactivo. Un nucleótido biológicamente inactivado puede tener una fracción eliminable que protege un grupo del nucleótido, tal como el oxígeno del carbono 3' o el oxígeno del fosfato terminal. Un nucleótido biológicamente inactivo puede ser un nucleótido enjaulado o un nucleótido bloqueado. Las fracciones adecuadas incluyen, entre otros, un grupo foto activable (enjaulado), que incluye  $\alpha$ -carboxi-2-nitrobencilo (CNB), 1-(2-nitrofenil)etilo (NPE), 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo (DMNB), 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)etilo (DMNPE) y 5-carboximetoxi-2-nitrobencilo (CMNB) (Molecular Probes). Estos grupos generalmente están unidos a través de oxígeno fosfato terminal. La fracción puede eliminarse mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, si la fracción es fotolábil, la fotólisis instantánea de la fracción mediante luz ultravioleta conduce a una liberación rápida y altamente localizada del nucleótido biológicamente activo en el sitio de iluminación. La fracción puede ser termolábil y, por tanto, el nucleótido biológicamente activo puede liberarse mediante calor. Si se usa calor para activar biológicamente el nucleótido, se deben considerar los requisitos de temperatura de la polimerasa, y esto es competencia del experto. Por ejemplo, el fosfato terminal puede esterificarse con una fracción enjaulada o bloqueante.

Los nucleótidos pueden proporcionarse en una mezcla de una o más bases adecuadas, preferiblemente una o más de adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C). En el proceso de síntesis de ADN se utilizan dos, tres o preferiblemente los cuatro nucleótidos (A, G, T y C).

Todos los nucleótidos pueden ser nucleótidos naturales (es decir, no modificados), pueden ser nucleótidos modificados que actúan como nucleótidos naturales y son biológicamente activos (es decir, nucleótidos LNA - ácido nucleico bloqueado), pueden estar modificados y ser biológicamente inactivos o pueden ser una mezcla de nucleótidos no modificados y modificados, y/o una mezcla de nucleótidos biológicamente activos y biológicamente inactivos. Cada tipo (es decir, base) de nucleótido se puede proporcionar en una o más formas, es decir, modificada y no modificada, o biológicamente activa y biológicamente inactiva.

En un aspecto de la invención, los nucleótidos se incluyen en la mezcla de reacción y se controla el suministro de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción. De acuerdo con este aspecto, los nucleótidos pueden estar presentes en la mezcla de reacción a una concentración inicial de menos de 8 mM, menos de 7 mM, menos de 6 mM, menos de 5 mM, menos de 4 mM, menos de 3 mM, menos de 2 mM o menos de 1 mM. Los nucleótidos se añaden así para formar la mezcla de reacción de manera que la concentración inicial de nucleótidos en la mezcla de reacción sea 8 mM o menos, preferiblemente 5 mM o menos, más preferiblemente 4 mM o menos. La concentración inicial se refiere a la concentración total de nucleótidos (todas las bases) en la mezcla de reacción al inicio de la reacción.

Los nucleótidos pueden estar presentes en la mezcla de reacción en una concentración inicial suficiente para sintetizar al menos 0.3 g/l de ADN. Se prefiere que la concentración inicial sea suficiente para sintetizar 0.5 g/l de ADN, más preferiblemente 0.6 g/l o 0.65 g/l de ADN. El volumen dado es el volumen de la mezcla de reacción. La concentración inicial de nucleótidos no será suficiente para sintetizar la cantidad deseada de ADN a partir de la mezcla de reacción, es decir, puede que no sea suficiente para lograr el rendimiento final. La concentración inicial de nucleótidos se puede determinar con base en una o más polimerasas en la mezcla de reacción.

Alternativa o adicionalmente, la concentración inicial de nucleótidos puede definirse como una proporción entre la concentración de la polimerasa y la concentración de los nucleótidos. La proporción entre el número de moléculas de nucleótidos y cada enzima polimerasa al inicio puede ser de hasta 500,000:1, hasta 300,000:1 o hasta 200,000:1 o dentro de 5,000:1 a 100,000:1, preferiblemente de 20,000:1 a 90,000:1, más preferiblemente de 30,000:1 a 80,000:1, más preferiblemente de 40,000:1 a 60,000:1. La proporción entre el número de moléculas de nucleótidos y cada polimerasa es preferiblemente superior a 5,000:1. En un aspecto preferido, la proporción de nucleótidos: enzima polimerasa al inicio es 50,000:1.

La mezcla de reacción se incuba en condiciones que promuevan la amplificación de dicha plantilla. Se prefiere la amplificación por desplazamiento de cadena. Preferiblemente, las condiciones promueven la amplificación de dicha plantilla mediante el desplazamiento de cadenas replicadas mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena. Las condiciones comprenden el uso de cualquier temperatura que permita la amplificación del ADN, comúnmente en el intervalo de 20 a 90 grados centígrados. Un intervalo de temperatura preferido puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 o de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 grados centígrados. Una temperatura preferida para la amplificación LAMP es de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 grados centígrados.

Normalmente, se selecciona una temperatura adecuada con base en la temperatura a la que una polimerasa específica tiene actividad óptima. Esta información está comúnmente disponible y forma parte del conocimiento general del experto. Por ejemplo, cuando se usa ADN polimerasa phi29, un intervalo de temperatura adecuado sería de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 grados centígrados, preferiblemente aproximadamente 30 grados centígrados. El experto en la técnica sería capaz de identificar de forma rutinaria una temperatura adecuada para una amplificación eficaz de acuerdo con el proceso de la invención. Por ejemplo, el proceso podría llevarse a cabo en un intervalo de temperaturas y se podrían monitorizar los rendimientos de ADN amplificado para identificar un intervalo de temperatura óptimo para una polimerasa determinada. La amplificación se puede llevar a cabo a una temperatura constante y se prefiere que el proceso sea isotérmico. Dado que se prefiere la amplificación por desplazamiento de cadena, no es necesario alterar la temperatura para separar las cadenas de ADN. Por tanto, el proceso puede ser un proceso isotérmico.

Otras condiciones que promueven la amplificación de la plantilla de ADN comprenden la presencia de agentes amortiguador/pH adecuados y otros factores que se requieren para el rendimiento o la estabilidad de la enzima. Las condiciones adecuadas incluyen cualquier condición utilizada para proporcionar la actividad de las enzimas polimerasas conocidas en la técnica.

Por ejemplo, el pH de la mezcla de reacción puede estar dentro del intervalo de 3 a 10, preferiblemente de 5 a 8 o aproximadamente 7, tal como aproximadamente 7.5. El pH puede mantenerse en este intervalo mediante el uso de uno o más agentes amortiguador. Dichos amortiguadores incluyen, entre otros, 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-hidrogenofosfato de sodio, ácido cítrico-citrato de sodio, acetato de sodio-ácido acético, imidazol y carbonato-bicarbonato de sodio.

Si bien se utiliza la aplicación de calor (exposición a 95°C durante varios minutos) para desnaturalizar el ADN bicatenario, se pueden utilizar otros enfoques que son más adecuados para la síntesis de ADN. El ADN bicatenario puede desnaturalizarse fácilmente mediante la exposición a un entorno de pH alto o bajo o cuando los cationes están ausentes o presentes en concentraciones muy bajas, tal como en el agua desionizada. La polimerasa requiere la unión de una secuencia cebadora oligonucleotídica corta a una región monocatenaria de la plantilla de ADN para iniciar su replicación. La estabilidad de esta interacción y, por tanto, la eficacia de la amplificación del ADN puede verse especialmente influenciadas por la concentración de cationes metálicos y, en particular, de cationes divalentes tales como los iones  $Mg^{2+}$ , que pueden considerarse parte integral del proceso.

La mezcla de reacción también comprende iones metálicos. La mezcla de reacción también puede comprender sales de metales tales como, entre otras, sales de iones metálicos divalentes: magnesio ( $Mg^{2+}$ ), manganeso ( $Mn^{2+}$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), berilio ( $Be^{2+}$ ), zinc ( $Zn^{2+}$ ) y estroncio ( $Sr^{2+}$ ), o sales de iones metálicos monovalentes, incluyendo, entre otros, litio ( $Li^+$ ), sodio ( $Na^+$ ) o potasio ( $K^+$ ). Las sales pueden incluir cloruros, acetatos y sulfatos. Otras sales que pueden incluirse son las sales de amonio, en particular el sulfato de amonio. El experto en la técnica sabrá que el suministro de nucleótidos en forma de una sal de ion metálico afectará a la concentración de iones metálicos en la mezcla de reacción, y podrá tener en cuenta esta fuente adicional de iones metálicos si es necesario. La concentración total de iones metálicos en la mezcla de reacción incluye preferiblemente todas las fuentes de iones metálicos.

También se pueden incluir detergentes en la mezcla de reacción. Ejemplos de detergentes adecuados incluyen Triton X-100, Tween 20 y derivados de cualquiera de los mismos. También se pueden incluir agentes estabilizantes en la mezcla de reacción. Puede usarse cualquier agente estabilizante adecuado, en particular, albúmina sérica bovina (BSA) y otras proteínas estabilizantes. Las condiciones de reacción también se pueden mejorar agregando agentes que relajen el ADN y faciliten la desnaturalización de la plantilla. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), formamida, glicerol y betaína. También se pueden incluir agentes condensantes de ADN en la mezcla de reacción. Tales agentes incluyen, por ejemplo, polietilenglicol o lípidos catiónicos o polímeros catiónicos.

Debe entenderse que el experto es capaz de modificar y optimizar las condiciones de amplificación e incubación para el proceso de la invención utilizando estos componentes y condiciones adicionales basándose en su conocimiento general. Asimismo, las concentraciones específicas de agentes particulares pueden seleccionarse basándose en ejemplos previos en la técnica y optimizarse adicionalmente basándose en el conocimiento general. Como ejemplo, se puede optimizar la cantidad de polimerasa presente en la mezcla de reacción. Esto puede implicar realizar una adición adicional de enzima polimerasa a la mezcla de reacción durante la síntesis de ADN. Como ejemplo adicional, se puede optimizar la cantidad de plantilla de ADN. Esto puede implicar realizar una adición adicional de plantilla de ADN a la mezcla de reacción durante la síntesis de ADN. El suministro adicional de enzima polimerasa y/o plantilla de ADN puede ser continuo o discontinuo, preferiblemente discontinuo.

Como ejemplo, un amortiguador de reacción adecuado usado en métodos basados en RCA en la técnica es Tris HCl 50 mM, pH 7.5,  $MgCl_2$  10 mM,  $(NH_4)_2SO_4$  20 mM, 5 % de glicerol, BSA 0.2 mM, dNTP 1 mM. Un amortiguador de reacción preferido utilizado en la amplificación RCA de la invención es Tris-HCl 30 mM, pH 7.4, KCl 30 mM,  $MgCl_2$  7.5 mM,  $(NH_4)_2SO_4$  10 mM, DTT 4 mM, dNTP 2 mM. Este amortiguador es particularmente adecuado para su uso con la polimerasa Phi29 RCA.

La mezcla de reacción también puede comprender el uso de una o más proteínas adicionales. La plantilla de ADN puede amplificarse en presencia de al menos una pirofosfatasa, tal como pirofosfatasa inorgánica de levadura. Se pueden usar dos, tres, cuatro, cinco o más pirofosfatasas diferentes. Estas enzimas son capaces de degradar el pirofosfato generado por la polimerasa a partir de dNTP durante la replicación de la cadena. La acumulación de pirofosfato en la reacción puede provocar la inhibición de las ADN polimerasas y reducir la velocidad y eficiencia de la amplificación del ADN. Las pirofosfatasas pueden descomponer el pirofosfato en fosfato no inhibitor. Un ejemplo de una pirofosfatasa adecuada para usar en el proceso de la presente invención es *Saccharomyces cerevisiae* pirofosfatasa, disponible comercialmente en New England Biolabs, Inc.

En el proceso de la invención se puede utilizar cualquier proteína de unión monocatenaria (SSBP) para estabilizar el ADN monocatenario. Las SSBP son componentes esenciales de las células vivas y participan en todos los procesos que involucran ADNss, como la replicación, reparación y recombinación del ADN. En estos procesos, las SSBP se unen al ADNss formado transitoriamente y pueden ayudar a estabilizar la estructura del ADNss. Un ejemplo de una SSBP adecuada para usar en el proceso de la presente invención es la proteína del gen 32 de T4, disponible comercialmente en New England Biolabs, Inc.

La mezcla de reacción se puede incubar en condiciones que promuevan la amplificación de la plantilla de ADN, como se describe anteriormente. La amplificación es una replicación por desplazamiento de cadena. La mezcla de reacción comprende nucleótidos, preferiblemente en la concentración inicial o proporción inicial (con respecto a la polimerasa) discutida anteriormente. La mezcla de reacción comprende además iones metálicos.

Para sintetizar ADN, se requiere un suministro de nucleótidos adicionales de acuerdo con cualquier aspecto de la invención. El suministro de nucleótidos a la mezcla de reacción se controla de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Por tanto, no se añaden todos los nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN a la mezcla de reacción al inicio del proceso. Los nucleótidos adicionales pueden suministrarse o proporcionarse en cualquier momento adecuado a la mezcla de reacción. Se controla o dirige el momento del suministro de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción y/o la cantidad de nucleótidos suministrados a la mezcla de reacción. Por tanto, la propia reacción puede controlarse mediante el suministro preciso de nucleótidos. Este control puede basarse en cálculos teóricos de la cinética enzimática, o el control puede basarse en parámetros mensurables de la mezcla de reacción, de modo que se suministren más nucleótidos a medida que los requiera la polimerasa.

Los nucleótidos adicionales pueden suministrarse una vez que la mezcla de reacción se haya formado e incubado en condiciones que promuevan la amplificación de la plantilla de ADN. Los nucleótidos adicionales pueden suministrarse después de que haya comenzado o iniciado la amplificación. En una realización, el suministro adicional de nucleótidos comienza al menos 20 minutos, o al menos 30 minutos o al menos 40 minutos después de que se proporcionen los nucleótidos iniciales. Sin embargo, el suministro puede iniciarse al inicio de la reacción, particularmente si el suministro de nucleótidos es continuo.

En una realización, la concentración o cantidad de nucleótidos en la mezcla de reacción no excede un umbral superior durante el proceso. El suministro de nucleótidos se controla de manera que la concentración o cantidad de nucleótidos no exceda el umbral superior. El umbral más alto puede ser 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM o 2 mM de nucleótidos en la mezcla de reacción. Preferiblemente, el umbral más alto es aproximadamente 4 mM de nucleótidos en la mezcla de reacción. De manera similar, en una realización, la concentración o cantidad de nucleótidos en la mezcla de reacción no puede caer por debajo de un umbral inferior durante el proceso. El suministro de nucleótidos se controla de manera que la concentración o cantidad de nucleótidos no caiga por debajo del umbral inferior. Este umbral inferior puede ser 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M o 10  $\mu$ M de nucleótidos en la mezcla de reacción. Se prefiere que la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se mantenga entre los umbrales superior e inferior durante el proceso. Por tanto, la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se puede mantener entre 0.0001 mM y 8 mM, preferiblemente entre 0.001 mM y 6 mM, lo más preferiblemente entre 0.01 mM y 5 mM. La concentración de nucleótidos se puede mantener controlando el suministro de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción. En una realización, la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se puede estimar mediante cromatografía iónica. Alternativamente, la concentración aproximada de nucleótidos se puede calcular estimando la cantidad de ADN sintetizado, como se analiza en el presente documento.

Alternativamente, los umbrales superior e inferior pueden describirse en proporción con la proporción entre la cantidad de nucleótidos y polimerasa presentes en la mezcla de reacción. Por tanto, el umbral más alto puede ser 500,000:1 (nucleótidos: polimerasa), 200,000:1, 150,000:1, 100,000:1 u 80,000:1. El umbral inferior puede ser 1,000:1, 1,500:1 o 2,000:1. Por tanto, la proporción de nucleótidos a polimerasa se puede mantener entre 1,000:1 y 500,000:1, preferiblemente entre 2,000:1 y 450,000:1, más preferiblemente entre 5,000:1 y 400,000:1, lo más preferiblemente entre 10,000:1 y 100,000:1. Más preferiblemente, la proporción se mantiene entre 40,000:1 y 70,000:1, a aproximadamente 50,000:1.

En una realización, los nucleótidos adicionales se suministran a la mezcla de reacción en una o más adiciones discretas, es decir, como alícuotas. Cualquier número de adiciones o alícuotas está dentro del alcance de esta realización. Así, se pueden añadir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, es decir, 20-25, 25-30, 35-40 adiciones o alícuotas a la mezcla de reacción. Así, se pueden utilizar 1-50, 1-40, 1-30 o 1-20 alícuotas para suministrar los nucleótidos. Una alícuota puede ser una porción de la cantidad total de nucleótidos necesarios o

- añadidos al proceso. El volumen y/o concentración de nucleótidos en la alícuota puede variar dependiendo de los requisitos del proceso. Una alícuota puede comprender una pequeña cantidad de nucleótidos, es decir, una cantidad suficiente para garantizar que una concentración o cantidad particular de nucleótidos esté presente en la mezcla de reacción. Los nucleótidos pueden suministrarse a la mezcla de reacción en forma de alícuotas a intervalos regulares (es decir, cada 30 minutos, cada 60 minutos, cada 90 minutos, cada 120 minutos, cada 180 minutos o cada 240 minutos o cualquier otro período de tiempo adecuado). Los nucleótidos pueden suministrarse a la mezcla de reacción en forma de alícuotas a intervalos irregulares. Por ejemplo, el período de tiempo entre cada suministro de nucleótidos puede ser más corto inicialmente y luego aumentar a medida que avanza el proceso, o *viceversa*. Las alícuotas pueden proporcionarse para mantener una concentración constante de nucleótidos en la mezcla de reacción, o pueden proporcionarse para reponer la concentración de nucleótidos hasta la concentración inicial. En una realización preferida, los nucleótidos se suministran de manera que la concentración en la mezcla de reacción no exceda de 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM o 4 mM. En una realización preferida, los nucleótidos se suministran de tal manera que se asegure que la concentración o cantidad de nucleótidos en la mezcla de reacción caiga dentro del umbral superior e inferior.
- Se prefiere que la alícuota no se suministre únicamente para reemplazar un volumen de mezcla de reacción tomada para análisis o prueba, sino que se suministre porque la reacción requiere más nucleótidos. Se prefiere que la prueba de la mezcla de reacción no sea invasiva y que no se extraiga ningún material de la mezcla de reacción hasta que se complete la reacción.
- Se pueden suministrar más nucleótidos en respuesta a la necesidad de más nucleótidos en la mezcla de reacción. Esto puede determinarse mediante varios parámetros, incluidos, entre otros, la tasa de síntesis de ADN, la concentración de ADN sintetizado o la viscosidad o volumen de la mezcla de reacción. La tasa de síntesis de ADN se puede calcular a partir de la concentración de ADN sintetizado a lo largo del tiempo. A medida que la tasa de síntesis de ADN comienza a disminuir, se pueden suministrar más nucleótidos. Alternativamente, la concentración de ADN sintetizado se puede controlar mediante métodos que se analizan más adelante. A medida que la concentración de ADN aumenta hasta un nivel umbral, se pueden suministrar más nucleótidos. Se puede medir la viscosidad de la mezcla de reacción y un aumento de la viscosidad puede indicar la necesidad de más nucleótidos. La viscosidad de la reacción se puede medir con un viscosímetro.
- En una realización, los nucleótidos adicionales se suministran a la mezcla de reacción de forma continua, es decir, se añaden de manera continua a la mezcla de reacción. En otras palabras, los nucleótidos pueden ser alimentados por goteo o suministrados constantemente. El suministro de nucleótidos adicionales de acuerdo con esta realización puede ser en cantidades suficientemente pequeñas como para que el suministro de nucleótidos coincida con la demanda de la polimerasa de nucleótidos adicionales. En esta realización, el suministro constante de nucleótidos mantiene una concentración aproximadamente constante de nucleótidos en la mezcla de reacción. Se prefiere que el suministro constante de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción asegure que la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se mantenga dentro de los umbrales superior e inferior.
- Los nucleótidos adicionales pueden proporcionarse físicamente a la mezcla de reacción, es decir, son externos a la mezcla de reacción. Por tanto, el suministro puede provenir de una fuente externa, tal como un reservorio. Este reservorio puede estar conectado a la mezcla de reacción. Los nucleótidos pueden bombearse a la mezcla de reacción. Por tanto, los nucleótidos y la mezcla de reacción están físicamente separados y el suministro de los nucleótidos adicionales es un suministro físico de nucleótidos. Alternativamente, los nucleótidos pueden suministrarse mediante una bomba osmótica. Una bomba osmótica proporciona un método para el suministro de nucleótidos continuo y controlado.
- Alternativamente, los nucleótidos pueden proporcionarse a la mezcla de reacción activando nucleótidos biológicamente inactivados, tales como los discutidos anteriormente. Para suministrar los nucleótidos a la mezcla de reacción, los nucleótidos biológicamente inactivos se activan mediante medios adecuados. Por tanto, los nucleótidos adicionales pueden comprender cualquier nucleótido biológicamente inactivo adecuado. Los nucleótidos biológicamente inactivos pueden incluirse en la mezcla de reacción al inicio, pero sólo suministrarse a la mezcla de reacción mediante activación controlada. Alternativamente, los nucleótidos biológicamente inactivos pueden añadirse físicamente a la mezcla de reacción en alícuotas o de forma continua, y posteriormente activarse para suministrar los nucleótidos a la mezcla de reacción. La activación puede ser física (es decir, calor o luz) o química, y es el control de la activación el que controla el suministro del nucleótido.
- El suministro de nucleótidos a la mezcla de reacción puede controlarse hasta que se complete la síntesis de ADN, por ejemplo, una vez que se agote la plantilla de ADN y no sea posible ninguna incorporación adicional. Alternativamente, la reacción puede completarse una vez que se haya sintetizado el rendimiento esperado o deseado de ADN. Dicho rendimiento puede basarse en la cantidad de nucleótidos añadidos. La síntesis de ADN puede completarse una vez que se ha sintetizado la cantidad requerida de ADN, tal como 1 g por litro de mezcla de reacción 2 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l o hasta 10 g/l o más. La síntesis de ADN puede completarse una vez que la tasa de síntesis de ADN ha disminuido y un suministro adicional de nucleótidos no aumenta esta tasa, la mezcla de reacción se queda sin otro componente (tal como, entre otros, el cebador), la enzima polimerasa está inactivada, la pirofosfatasa inorgánica está inactivada, no hay más plantilla monocatenaria disponible, los cofactores necesarios tales como cationes metálicos se agotan, la

viscosidad de la mezcla de reacción alcanza un cierto umbral, el volumen de la mezcla de reacción alcanza un cierto umbral o se inhibe la polimerasa.

El rendimiento de la reacción está relacionado con la cantidad de ADN sintetizado. El rendimiento esperado de un proceso de acuerdo con la presente invención puede exceder los 10 gramos/litro de mezcla de reacción, o 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 g/l. La presente invención mejora el rendimiento posible de la síntesis enzimática de ADN. Un objetivo de la presente invención es mejorar el rendimiento de un proceso de síntesis de ADN enzimático libre de células, de modo que el ADN pueda sintetizarse a gran escala de forma rentable. La presente invención permite la fabricación/síntesis de ADN de forma económica a escala industrial utilizando un proceso enzimático catalizado por una polimerasa. El presente proceso permite la incorporación eficiente de nucleótidos al producto de ADN. Se cree que el proceso de la invención permitirá ampliar las mezclas de reacción a varios litros, incluyendo decenas de litros. El rendimiento, la tasa de síntesis de ADN, la productividad o la procesividad mejorados se pueden comparar con una mezcla de reacción idéntica en la que todos los nucleótidos se suministran al principio. Se cree que el rendimiento puede mejorarse controlando el suministro de nucleótidos adicionales a la mezcla de reacción, como se demuestra en los Ejemplos.

La tasa de síntesis de ADN se relaciona con la cantidad o concentración de ADN sintetizado por minuto del proceso. En los Ejemplos, se verá que la tasa de síntesis de ADN disminuye progresivamente a medida que avanza el proceso.

La productividad del proceso, o la tasa de producción de ADN por unidad de nucleótido suministrada, puede aumentarse utilizando el proceso o procesos de la invención.

En una realización, la presente invención se refiere a un proceso para mejorar la síntesis de ADN. Esta mejora se puede comparar con una mezcla de reacción idéntica, con la excepción de que todos los componentes necesarios, incluidos los nucleótidos, se añaden al principio. No se hacen más adiciones a esta mezcla de reacción de control.

En un aspecto, se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de uno o más cebadores, nucleótidos y cationes metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación de dicha plantilla mediante el desplazamiento de cadenas replicadas a través de replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena, en donde se suministran más nucleótidos y cationes metálicos adicionales de manera controlada a la mezcla de reacción.

En otras palabras, la amplificación se produce mediante replicación por desplazamiento de cadena de la plantilla. Por lo tanto, la invención proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de uno o más cebadores, nucleótidos y cationes metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la replicación por desplazamiento de cadena de dicha plantilla, en el que se suministran de forma controlada otros nucleótidos y cationes metálicos adicionales a la mezcla de reacción.

Se prefiere que la tasa de reacción del proceso sin células para sintetizar ADN se controle suministrando cationes adicionales de manera controlada a la mezcla de reacción.

El suministro de cationes metálicos a la mezcla de reacción se puede controlar de acuerdo con este aspecto de la invención. Se cree que dicho control mejora la tasa de síntesis de ADN, particularmente en un proceso a gran escala. Al principio están presentes uno o más cationes metálicos en la mezcla de reacción. Por tanto, la mezcla de reacción también contiene uno o más cationes metálicos, preferiblemente suministrados en forma de sales. Se puede controlar el suministro de otros cationes metálicos a la mezcla de reacción. Se pueden suministrar uno o más cationes metálicos. Cationes metálicos adecuados incluyen iones metálicos divalentes: magnesio ( $Mg^{2+}$ ), manganeso ( $Mn^{2+}$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), berilio ( $Be^{2+}$ ), zinc ( $Zn^{2+}$ ) y estroncio ( $Sr^{2+}$ ), o iones metálicos monovalentes, incluidos, entre otros, litio ( $Li^+$ ), sodio ( $Na^+$ ) o potasio ( $K^+$ ). Los cationes metálicos se suministran preferiblemente en forma de sales. Las sales pueden incluir cloruros, acetatos y sulfatos, y se prefiere que los cationes metálicos se suministren como sales de cloruro. Otras sales que pueden incluirse son las sales de amonio, en particular el sulfato de amonio. Se prefiere que los cationes metálicos sean magnesio o manganeso, más preferiblemente magnesio. En una realización más preferida, los cationes metálicos se proporcionan como cloruro de magnesio.

Para sintetizar ADN, se requiere un suministro de cationes metálicos adicionales de acuerdo con cualquier aspecto de la invención. El suministro de cationes metálicos a la mezcla de reacción se controla de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Por tanto, todos los cationes metálicos necesarios para la síntesis de ADN no se añaden a la mezcla de reacción al inicio del proceso. Los cationes metálicos adicionales pueden suministrarse o proporcionarse en cualquier momento adecuado a la mezcla de reacción. Se controla o dirige el momento del suministro de cationes metálicos adicionales a la mezcla de reacción y/o la cantidad de iones metálicos suministrados a la mezcla de reacción. Por tanto, la propia reacción puede controlarse mediante el suministro preciso de iones metálicos. Este control puede basarse en cálculos teóricos de la cinética de la enzima, o el control puede basarse en parámetros mensurables de la mezcla de reacción, de modo que se suministren más iones metálicos según sea necesario. El suministro de cationes metálicos adicionales puede controlarse en paralelo o junto con el suministro controlado de nucleótidos adicionales. El suministro puede controlarse de forma independiente o controlarse en conjunto.

Los cationes metálicos adicionales se pueden suministrar una vez que la mezcla de reacción se haya formado e incubado en condiciones que promuevan la amplificación de la plantilla de ADN. Los cationes metálicos adicionales se pueden suministrar una vez iniciada o iniciada la amplificación. En una realización, el suministro adicional de cationes metálicos comienza al menos 20 minutos, o al menos 30 minutos o al menos 40 minutos después de que se proporciona la concentración inicial de cationes metálicos. Sin embargo, el suministro puede iniciarse al inicio de la reacción, particularmente si el suministro de cationes metálicos es continuo.

En una realización, la concentración o cantidad de cationes metálicos libres o no unidos en la mezcla de reacción no excede un umbral más alto durante el proceso. El suministro de cationes metálicos se controla de manera que la concentración o cantidad de cationes metálicos libres o no unidos no exceda el umbral más alto. El umbral más alto puede ser 4 mM, 3 mM o 2 mM en la mezcla de reacción. Preferiblemente, el umbral más alto es aproximadamente 3 mM en la mezcla de reacción. De manera similar, en una realización, la concentración o cantidad de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción no puede caer por debajo de un umbral más bajo durante el proceso. El suministro de cationes metálicos se controla de tal manera que la concentración o cantidad de cationes metálicos libres no caiga por debajo del umbral más bajo. Este umbral más bajo puede ser 0.03  $\mu$ M, 0.15  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M o 3  $\mu$ M en la mezcla de reacción. Se prefiere que la concentración de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción se mantenga entre los umbrales más alto y más bajo durante el proceso. Por tanto, la concentración de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción se puede mantener entre 0.03  $\mu$ M y 4 mM, o 0.5  $\mu$ M a 3 mM o 1  $\mu$ M a 2 mM o 10  $\mu$ M a 1 mM. Preferiblemente, la concentración de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción se mantiene entre 1 mM y 1.5 mM.

Alternativamente, el umbral más alto puede ser 10 mM, 8 mM, 6 mM, 4 mM, 3 mM o 2 mM en la mezcla de reacción. Preferiblemente, el umbral más alto es aproximadamente 3 mM en la mezcla de reacción. De manera similar, en una realización, la concentración o cantidad de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción no puede caer por debajo de un umbral más bajo durante el proceso. El suministro de cationes metálicos se controla de tal manera que la concentración o cantidad de cationes metálicos libres no caiga por debajo del umbral más bajo. Este umbral más bajo puede ser 0.03  $\mu$ M, 0.15  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 5  $\mu$ M en la mezcla de reacción. Se prefiere que la concentración de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción se mantenga entre los umbrales más alto y más bajo durante el proceso. Por tanto, la concentración de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción se puede mantener entre 0.03  $\mu$ M y 10 mM, o entre 0.15  $\mu$ M y 8 mM o entre 0.3  $\mu$ M y 6 mM o entre 1.5  $\mu$ M y 3 mM. Preferiblemente, la concentración de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción se mantiene entre 0.15  $\mu$ M y 5  $\mu$ M.

La concentración de cationes metálicos libres se puede mantener controlando el suministro de otros iones metálicos a la mezcla de reacción. En una realización, la concentración de iones metálicos libres en la mezcla de reacción se puede estimar mediante espectroscopia de absorción atómica, cromatografía iónica y otros métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, la concentración aproximada de cationes metálicos libres se puede calcular estimando la cantidad de ADN sintetizado, como se analiza en el presente documento. Para evitar dudas, los cationes metálicos, como los iones de magnesio, pueden unirse a diferentes entidades en la mezcla de reacción, incluyendo, entre otros, pirofosfato, fosfato y ADN. Estos iones están unidos y no libres.

En una realización, los cationes metálicos adicionales se suministran a la mezcla de reacción en una o más adiciones discretas, es decir, como alícuotas. Cualquier número de adiciones o alícuotas está dentro del alcance de esta realización. Así, se pueden añadir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, es decir, 20-25, 25-30, 35-40 adiciones o alícuotas a la mezcla de reacción. Así, se pueden utilizar 1-50, 1-40, 1-30 o 1-20 alícuotas para suministrar los cationes metálicos. Una alícuota puede ser una porción de la cantidad total de cationes metálicos necesarios o añadidos al proceso. El volumen y/o concentración de cationes metálicos en la alícuota puede variar dependiendo de los requisitos del proceso. Una alícuota puede comprender una pequeña cantidad de cationes metálicos, es decir, una cantidad suficiente para garantizar que una concentración o cantidad particular de cationes metálicos esté presente en la mezcla de reacción. Los cationes metálicos se pueden suministrar a la mezcla de reacción como alícuotas a intervalos regulares (es decir, cada 30 minutos, cada 60 minutos, cada 90 minutos, cada 120 minutos, cada 180 minutos o cada 240 minutos o cualquier otro período de tiempo adecuado). Los cationes metálicos pueden suministrarse a la mezcla de reacción en forma de alícuotas a intervalos irregulares. Por ejemplo, el período de tiempo entre cada suministro de cationes metálicos puede ser más corto inicialmente y luego aumentar a medida que avanza el proceso, o viceversa. Las alícuotas pueden proporcionarse para mantener una concentración constante de cationes metálicos en la mezcla de reacción, o pueden proporcionarse para reponer la concentración de cationes metálicos hasta la concentración inicial, preferiblemente la concentración óptima de iones metálicos libres.

En una realización preferida, los cationes metálicos se suministran de tal manera que se asegure que la concentración o cantidad de cationes metálicos libres en la mezcla de reacción esté dentro del umbral más alto y más bajo.

Se pueden suministrar cationes metálicos adicionales en respuesta a la necesidad de los mismos en la mezcla de reacción. Esto puede determinarse mediante varios parámetros, como se analizó anteriormente.

En una forma de realización, los otros cationes metálicos se suministran de forma continua a la mezcla de reacción.

Los cationes metálicos adicionales se pueden proporcionar físicamente a la mezcla de reacción, es decir, son externos a la mezcla de reacción.

Se prefiere que también se controle el suministro de más nucleótidos.

5 En un aspecto adicional, se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de uno o más cebadores, nucleótidos y cationes metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación de dicha plantilla mediante desplazamiento de cadenas replicadas a través de replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena, en el que se suministran más nucleótidos y cationes metálicos de manera controlada a la mezcla de reacción.

10 También se proporciona un proceso sin células para sintetizar ADN que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de nucleótidos y cationes metálicos para formar una mezcla de reacción, en condiciones que promueven la amplificación por desplazamiento de cadena de dicha plantilla, en el que se añaden nucleótidos y se suministran otros cationes metálicos de forma controlada a la mezcla de reacción.

Los otros nucleótidos y otros iones metálicos pueden suministrarse juntos o por separado. El suministro controlado de nucleótidos adicionales o cationes metálicos adicionales se puede lograr como se analizó anteriormente en relación con estas entidades.

15 El suministro de los cationes metálicos o de otros cationes metálicos puede realizarse en paralelo al suministro de nucleótidos, o puede realizarse en momentos diferentes al suministro de nucleótidos.

Se prefiere que los cationes metálicos adicionales puedan suministrarse a la mezcla de reacción con el suministro de los nucleótidos, particularmente cuando los cationes metálicos son monovalentes. Los cationes metálicos y los nucleótidos pueden así suministrarse en forma de mezcla. De este modo se puede combinar el suministro de cationes metálicos y nucleótidos, aunque se prefiere que se mantengan separados.

20 El suministro de cationes metálicos adicionales y/o nucleótidos adicionales puede realizarse como se describe para cada una de estas entidades individualmente.

25 En la invención, los cationes metálicos y los nucleótidos se suministran de manera que la proporción (cantidad) de cationes metálicos: nucleótidos esté entre aproximadamente 3:1 y 1:3, preferiblemente aproximadamente 3:1. Estas relaciones son particularmente preferidas cuando el catión metálico es un catión metálico divalente, tal como, entre otros, magnesio ( $Mg^{2+}$ ), manganeso ( $Mn^{2+}$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), berilio ( $Be^{2+}$ ), zinc ( $Zn^{2+}$ ) y estroncio ( $Sr^{2+}$ ).

Se cree que mantener la proporción de cationes metálicos: nucleótidos, preferiblemente cationes de magnesio, puede ser importante para controlar la tasa de síntesis de ADN. La proporción de nucleótido:polimerasa también se puede mantener como se analizó anteriormente. Por tanto, controlar estas dos proporciones, controlando el suministro de nucleótidos y cationes metálicos, puede controlar la síntesis de ADN.

30 Con relevancia para cualquier aspecto de la invención, si los nucleótidos se suministran como sales de cationes metálicos, la concentración de cationes metálicos en estas sales suministradas a la mezcla de reacción incluirá estos cationes metálicos. El experto en la técnica sabrá que el suministro de nucleótidos en forma de una sal de catión metálico afectará a la concentración de cationes metálicos en la mezcla de reacción y podrá tener en cuenta esta cantidad adicional.

35 Los nucleósidos trifosfato (ATP, GTP, CTP y TTP), en virtud de sus propiedades químicas, tienen el potencial de interferir con la amplificación del ADN de varias maneras si se usan altas concentraciones para aumentar el rendimiento del producto de ADN. Se puede considerar que las concentraciones altas son concentraciones de dNTP superiores a 4 mM en la mezcla de reacción. Los grupos fosfato de los dNTP son capaces de interactuar con cationes metálicos mono y divalentes y poseen la mayor afinidad por el  $Mg^{2+}$ . Por ejemplo, la afinidad del ATP por el  $Mg^{2+}$  es más de 700 veces mayor que  $Na^+$  y casi 400 veces mayor que  $Li^+$ .

40 Durante la amplificación, las polimerasas liberan pirofosfato de los nucleótidos que se incorporan a la cadena de ADN en crecimiento. El pirofosfato tiene una afinidad de unión por los iones  $Mg^{2+}$  similar a la del ATP, por lo que este proceso no libera iones  $Mg^{2+}$  libres. La consecuencia de utilizar altas concentraciones iniciales de nucleótidos durante la amplificación será reducir los niveles de iones  $Mg^{2+}$  libres. Dado que pueden ser necesarios iones  $Mg^{2+}$  para la actividad catalítica de la polimerasa, es probable que los niveles subóptimos causados por la interacción con fosfatos o grupos fosfato sean perjudiciales para una amplificación eficiente. Sin embargo, a la inversa, se ha demostrado que altas concentraciones de iones  $Mg^{2+}$  afectan la fidelidad de algunas ADN polimerasas. Por lo tanto, se puede pensar que las concentraciones de reacción de iones  $Mg^{2+}$  son críticas para el rendimiento y la calidad del ADN.

45 La descomposición del pirofosfato puede ser catalizada por una enzima y se puede esperar que libere iones  $Mg^{2+}$  unidos del pirofosfato. Sin embargo, los iones  $Mg^{2+}$  se unen a los iones  $PO_4^{3-}$  para formar  $Mg_3(PO_4)_2$  esencialmente insoluble (solubilidad de 0.01 mM en agua a 20°C).

50 Los iones  $Mg^{2+}$  también se unirán al ADN sintetizado.

5 El nivel de iones  $Mg^{2+}$  libres en cualquier reacción catalizada por ADN polimerasa en cualquier momento particular dependerá de la concentración inicial, la concentración total de moléculas capaces de unirse al catión y el pH de la reacción. Dado que los procesos están en equilibrio, siempre es probable que haya algo de  $Mg^{2+}$  libre. En una realización, el nivel de  $Mg^{2+}$  libre se controla controlando el suministro de iones  $Mg^{2+}$  libres, preferiblemente como sales de magnesio, a la mezcla de reacción.

10 Polimerasas que son capaces de amplificar plantillas de ADN circulares a través de un círculo rodante, mecanismo de desplazamiento de cadena y son capaces de producir repeticiones concataméricas lineales largas de la plantilla. Se prefieren tales polimerasas que desplazan cadenas circulares rodantes. Se informa, por ejemplo, que la ADN polimerasa Phi29 puede amplificar plantillas de ADN circulares para producir repeticiones lineales de hasta 77 kilobases de longitud. Estas moléculas muy largas se comportan como polímeros y pueden alterar significativamente las propiedades reológicas de la reacción al aumentar la viscosidad. Este aumento de viscosidad puede medirse mediante cambios de presión que pueden correlacionarse directamente con la concentración de ADN sintetizado. Dichas mediciones se pueden realizar de forma continua o en momentos establecidos para proporcionar una señal, preferiblemente una señal en línea que pueda usarse para indicar el estado de la reacción. El suministro de más nucleótidos puede controlarse en respuesta a la señal de presión. Tal suministro de nucleótidos, en respuesta a una señal que indica un parámetro de la mezcla de reacción, puede realizarse para aumentar el rendimiento y/o la productividad de la mezcla de reacción.

20 Las mediciones diferenciales de presión para estimar las concentraciones de ADN tienen una ventaja importante sobre los ensayos basados en la unión de reactivos químicos fluorescentes como los colorantes Syto. A diferencia de estos reactivos que sólo se unen al ADN bicatenario, las mediciones diferenciales de presión no dan estimaciones erróneas del ADN en muestras que contienen formas monocatenarias.

25 En una realización, el suministro de nucleótidos se controla en respuesta a una señal. La señal puede ser cualquier señal adecuada y puede ser una señal en línea. Se prefiere que la señal se relacione con la concentración de ADN, particularmente se base en una estimación de la concentración total de ADN en la mezcla de reacción. Alternativamente, la señal puede referirse al volumen de la mezcla de reacción. De manera similar se puede controlar el suministro de otros iones metálicos en respuesta a una señal. La señal puede ser la misma o diferente.

30 Una señal preferida es aquella que se refiere a la viscosidad de la mezcla de reacción. La viscosidad de la mezcla de reacción puede proporcionar una estimación de la concentración de ADN en la mezcla de reacción. La viscosidad puede medirse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo un viscosímetro. Se prefiere que la viscosidad se mida mediante cambios de presión. El diferencial de presión se puede medir mediante un sensor de presión, transductores de presión, transmisores de presión, indicadores de presión, piezómetros o manómetros. En una realización, el diferencial de presión se puede crear usando una bomba alternativa que elimina y reemplaza una porción de la mezcla de reacción. Se prefiere que la reacción se controle en tiempo real de forma no invasiva como se indica aquí.

35 El proceso de la invención se puede realizar como una reacción discontinua. En esta realización, la mezcla de reacción está presente en un reactor. Al reactor se le puede suministrar el suministro de otros nucleótidos y/o de otros cationes metálicos. Por lo tanto, el proceso puede realizarse en un reactor alimentado por lotes. Alternativamente, el proceso puede realizarse en un reactor de flujo continuo. Dichos reactores están dentro del conocimiento del experto. A continuación, se presenta un formato particularmente preferido.

40 En una realización, se suministran una o más enzimas de procesamiento a la mezcla de reacción en una o más adiciones discretas, es decir, como alícuotas. Cualquier número de adiciones o alícuotas está dentro del alcance de esta realización. Así, se pueden añadir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, es decir, 20-25, 25-30, 35-40 adiciones o alícuotas a la mezcla de reacción. Por lo tanto, se pueden utilizar 1-50, 1-40, 1-30 o 1-20 alícuotas para suministrar las enzimas de procesamiento. Una alícuota puede ser una porción de la cantidad total de enzima de procesamiento requerida o añadida al proceso. El volumen y/o concentración de enzima de procesamiento en la alícuota puede variar dependiendo de los requisitos del proceso. Una alícuota puede comprender una pequeña cantidad de enzima de procesamiento, es decir, una cantidad suficiente para garantizar que una concentración o cantidad particular de enzima de procesamiento esté presente en la mezcla de reacción. La enzima de procesamiento se puede suministrar a la mezcla de reacción en forma de alícuotas a intervalos regulares (es decir, cada 30 minutos, cada 60 minutos, cada 90 minutos, cada 120 minutos, cada 180 minutos o cada 240 minutos o cualquier otro período de tiempo adecuado). La enzima de procesamiento puede suministrarse a la mezcla de reacción en forma de alícuotas a intervalos irregulares. Por ejemplo, el período de tiempo entre cada suministro de enzima de procesamiento puede ser más largo inicialmente y luego disminuir a medida que avanza el proceso, o viceversa.

55 Se pueden suministrar enzimas de procesamiento en respuesta a la necesidad de las mismas en la mezcla de reacción. Esto puede determinarse mediante varios parámetros, como se analizó anteriormente, incluyendo la concentración de ADN en la mezcla de reacción y/o la tasa de síntesis de ADN.

Las enzimas de procesamiento pueden proporcionarse físicamente a la mezcla de reacción, es decir, son externas a la mezcla de reacción. Estas enzimas pueden mantenerse en un reservorio separado y liberarse de manera controlada en la mezcla de reacción.

Se prefiere que la enzima de procesamiento tenga un recambio único, tal como protelomerasa, ya que entonces controlar la cantidad de enzima de procesamiento controla directamente la cantidad de ADN procesado por la enzima. La enzima de procesamiento se puede añadir junto con los nucleótidos adicionales o después de los nucleótidos adicionales. Si también se requieren más iones metálicos, puede preferirse que éstos se agreguen después de la adición de la enzima de procesamiento, de modo que el procesamiento del ADN se produzca antes de que se agreguen más iones metálicos.

El proceso se puede realizar en cualquier aparato adecuado. A continuación, se describirá un aparato particular adecuado para llevar a cabo el proceso. El aparato 1 de síntesis está construido sobre un chasis 11 autónomo y provisto de una cubierta 12 frontal que se puede abrir para permitir el acceso a los componentes principales. La cubierta 12 frontal está deseablemente hecha de un material transparente, pero puede estar teñida para proteger los componentes de reacción de niveles de luz excesivos. También sirve para limitar la entrada de contaminantes. El aparato está provisto de un interruptor 13 de alimentación accesible desde el exterior y una entrada de alimentación, por ejemplo, en un lado del aparato. Además, hay puertos 14 de entrada/salida para permitir que el aparato se comunique con y/o sea controlado por una computadora de uso general que ejecuta software de automatización de laboratorio tal como, por ejemplo, Labview™ suministrado por National Instruments Corporation de Texas, EE. UU. Se proporciona una luz 15 indicadora de funcionamiento en una posición visible desde la parte frontal del aparato e indica si el aparato está en funcionamiento o no.

El componente central del aparato de síntesis es un recipiente 2 de reacción con camisa que puede tener un volumen superior a 30 ml, tal como 50 ml, 75 o 120 ml. El volumen del recipiente de reacción puede ser inferior a 300 ml. El volumen del recipiente de reacción se puede seleccionar de acuerdo con el uso previsto del aparato y la cantidad de producto que se pretende preparar en un lote, o la rata de producción en un proceso continuo. Claramente, el tamaño del recipiente de reacción establece un límite superior en la cantidad de producto que se puede producir en un lote.

La proporción de aspecto del recipiente de reacción no puede ser mayor que 8:1, o no mayor que 7:1, 6:1 o 5:1. Si el recipiente de reacción es demasiado alto, resulta más difícil realizar una mezcla completa de los contenidos mediante la retirada y retorno de la mezcla de reacción. Si el recipiente de reacción es demasiado ancho, resulta más difícil garantizar una temperatura uniforme en todo momento, especialmente con volúmenes de reacción más pequeños. La agitación de la mezcla puede ayudar a obtener la temperatura deseada en toda la mezcla, especialmente si la mezcla de reacción se calienta a 95°C. Los recipientes de reacción con proporciones de aspecto dentro de los límites anteriores se pueden adaptar a diferentes cantidades de componentes de reacción.

En la Figura 3 se muestra en sección transversal un recipiente 2 de reacción que puede usarse en una realización de la invención. El recipiente 2 de reacción comprende un recipiente 23 interior rodeado por una camisa 25. El fluido de control de temperatura circula a través del espacio 26 entre el recipiente 23 interior y la camisa 25 para controlar la temperatura del contenido del recipiente 23 interior. Se proporcionan un puerto 27 inferior y un puerto 28 superior para conectar el recipiente interior a las válvulas 32b, 32a de selección respectivamente.

El recipiente 23 interior puede tener una parte principal que tiene la forma de un cilindro de diámetro D1, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 50 mm, preferiblemente de 25 a 35 mm, y una parte 24 ahusada que conecta la parte cilíndrica al puerto 27 inferior. La altura total H1 del recipiente interior puede estar en el intervalo de 150 mm a 300 mm, deseablemente de 200 mm a 250 mm. La altura de la parte 24 ahusada puede estar en el intervalo de 5 a 20 mm, preferiblemente de 10 a 15 mm. El ángulo de las paredes laterales de la parte ahusada puede estar en el intervalo de 30 a 60° con respecto al eje del recipiente interior, preferiblemente aproximadamente 45°. El diámetro D2 del puerto 27 inferior puede estar en el intervalo de 5 a 10 mm.

El recipiente de reacción puede tener una sección transversal no constante, por ejemplo, con un estrechamiento hacia abajo en toda su altura o un abultamiento central.

La temperatura del recipiente de reacción puede controlarse mediante un flujo de fluido de control de temperatura a través de la camisa exterior hasta el recipiente de reacción. El fluido de control de temperatura puede ser suministrado por la entrada 2a y retirado de la salida 2b mediante un dispositivo 22 de control de temperatura de recirculación. El dispositivo de control de temperatura de recirculación controla la temperatura del fluido de control de temperatura calentando y/o enfriando el fluido. El recipiente de reacción se puede mantener a una temperatura constante, por ejemplo, a pesar de la aparición de reacciones endotérmicas o exotérmicas, o puede controlarse para seguir un perfil de temperatura deseado. El fluido de control de temperatura puede ser agua o aceite. El fluido de control de temperatura puede suministrarse a través de puertos 16 proporcionados en el chasis del aparato. Un dispositivo de control de temperatura de recirculación adecuado es el sistema de control de temperatura Presto A30 fabricado por Julabo USA, Inc. de Pensilvania, EE. UU. En una realización de la invención, el dispositivo 22 de control de temperatura de recirculación comprende calentadores óhmicos y/o dispositivos Peltier. En una realización, la temperatura del recipiente de reacción se puede controlar a una temperatura en el intervalo de 4 °C a 95 °C con una precisión de 0.01 °C.

Se pueden proporcionar reservorios 4a-4c con temperatura controlada para los componentes de reacción que se utilizarán en la reacción de síntesis. Los componentes de la reacción se mantienen en jeringas 42a-42c, por ejemplo, jeringas de polipropileno desechables, que están montadas en dispositivos 41a-41c de control de temperatura. Los

dispositivos de control de temperatura en esta realización comprenden bloques de material conductor, por ejemplo, aluminio, que tiene orificios para recibir estrechamente las jeringas 42a-42c. Si se desea, se puede proporcionar una pasta térmicamente conductora para aumentar la conductividad térmica entre el bloque y las jeringas. Dispositivos de calefacción/refrigeración, por ejemplo, calentadores óhmicos o dispositivos Peltier, están unidos a los bloques térmicamente conductores para controlar la temperatura de los mismos y, por tanto, de los componentes de reacción almacenados en los reservorios 42a-42c.

Los dispositivos de control de temperatura 41a-41c pueden usarse para calentar o enfriar los componentes de reacción almacenados. Es deseable que algunos componentes de la reacción se mantengan a baja temperatura, por ejemplo, aproximadamente 4°C, para evitar su degradación. Los cebadores se pueden almacenar a una temperatura elevada para prevenir y/o reducir el oscurecimiento del cebador. Los reservorios también se pueden calentar para desnaturalizar y fusionar plantillas y cebadores antes de agregarlos al recipiente de reacción. Al igual que con el control de temperatura principal del recipiente de reacción, los reservorios de temperatura controlada se pueden mantener a una temperatura constante o seguir un perfil de temperatura deseado, por ejemplo, calentar un componente de reacción justo antes de su adición al recipiente de reacción. En una realización, las temperaturas de los reservorios con temperatura controlada se pueden controlar independientemente dentro de un intervalo de 4 °C a 95 °C con una precisión de 0.01 °C.

Se pueden proporcionar uno o más calentadores en línea (no mostrados) para elevar la temperatura, por ejemplo, a 95 °C, de un componente de reacción tal como un cebador antes de la adición al recipiente de reacción. Se proporciona/o un calentador en el conducto entre un reservorio 4a-c, 5a-g y la válvula 32c de selección y/o entre la válvula 32a de selección y el recipiente 2 de reacción.

En esta realización, uno de los reservorios 4c de temperatura controlada comprende dos jeringas 42c y 42c' de reservorio en contacto térmico con un bloque 41c de control de temperatura único. Esto es útil cuando es necesario mantener dos componentes de reacción a la misma temperatura o cuando se requiere un volumen mayor de un único componente de reacción para una reacción deseada.

El aparato también comprende una pluralidad de reservorios adicionales 5a-5g que no están provistos de dispositivos de control de temperatura. En esta realización hay siete de dichos reservorios; en otras realizaciones se proporcionan más o menos. Los reservorios adicionales 5a-5g también pueden comprender jeringas, por ejemplo, jeringas de vidrio o polipropileno, que se puedan retirar y desechar cuando estén vacías. El uso de jeringas es ventajoso ya que el volumen del reservorio se reduce automáticamente a medida que se retiran los componentes de la reacción. Se puede lograr un efecto similar con bolsas o tubos plegables. Si se utiliza un recipiente rígido, es deseable que se proporcione un filtro en cualquier descarga a la atmósfera para evitar la entrada de contaminantes.

Convenientemente, se proporciona un soporte 51 giratorio para montar los reservorios 5. Si se requiere un componente de reacción en grandes cantidades, el aparato puede estar provisto de puertos para conectarse a un reservorio externo. Deseablemente, el aparato está dispuesto de manera que se minimicen las longitudes de conducto necesarias para conectar los reservorios a las válvulas de selección. Los conductos pueden ser desmontables de los reservorios y luego pueden unirse a un colector que está conectado a un suministro de fluido de limpieza o agua para enjuague. De esta manera se puede limpiar todo el aparato *in situ*, es decir, sin desmantelarse.

Los reservorios 4a-c y 5a-g pueden tener una capacidad de 3 a 10 ml, por ejemplo, aproximadamente 5 ml. Se pueden proporcionar uno o más reservorios más grandes, por ejemplo, para soluciones amortiguador, con una capacidad de 10 a 500 ml, por ejemplo, aproximadamente 250 ml.

El suministro de un componente de reacción al recipiente de reacción se puede efectuar mediante una bomba 3a de jeringa alternativa. Esta bomba se conoce como bomba de suministro. Este comprende una jeringa 31a, por ejemplo, una jeringa de vidrio o polipropileno, accionada por un solenoide 33a y conectada a una válvula 32a de selección controlable para conectar selectivamente el solenoide a cada uno de los reservorios y al recipiente de reacción. Para agregar una cantidad controlada de un componente de reacción al recipiente de reacción, primero se usa la válvula 32a de selección para conectar la jeringa de bomba al reservorio relevante y luego se acciona el solenoide para aspirar hacia la jeringa el volumen relevante del componente de reacción. A continuación, se utiliza la válvula 32a de selección para conectar la jeringa 31a al recipiente 2 de reacción y se invierte el solenoide para expulsar el contenido de la jeringa al recipiente de reacción. Con esta disposición, es posible añadir rápidamente cantidades de componentes de reacción deseados de forma secuencial al recipiente de reacción sin requerir múltiples bombas de jeringa y múltiples entradas al recipiente de reacción. Sin embargo, si es deseable añadir múltiples componentes de reacción simultáneamente al recipiente de reacción, es posible proporcionar múltiples bombas 3a de suministro. Esto también puede ser deseable si es necesario mantener ciertos componentes de la reacción absolutamente separados antes de su adición al recipiente de reacción.

Además, se puede usar una segunda bomba 3b de jeringa alternativa para agitar el contenido del recipiente de reacción, así como para eliminar la mezcla de reacción o el producto al final de la reacción o con fines de muestreo durante un proceso de reacción. Esta bomba se denomina bomba de extracción y comprende una jeringa 31b accionada por un solenoide 33b. La segunda bomba 3b de jeringa está conectada a una salida en el fondo del recipiente de reacción a través de una segunda válvula 32b de selección. Para agitar el contenido del recipiente de

reacción, se usa la segunda válvula 32b de selección para conectar la jeringa 31b al recipiente de reacción mientras se retira una cantidad de la mezcla de reacción del recipiente de reacción y luego se devuelve al mismo. La cantidad de mezcla de reacción que se retira y la rata a la que se devuelve se pueden controlar para controlar el grado de agitación que se efectúa. Dicha agitación se puede efectuar de forma continua durante el transcurso de una reacción, periódicamente o en momentos específicos relacionados con la adición de componentes de la reacción.

Alternativa o adicionalmente, la segunda bomba 3b de jeringa alternativa también puede conectarse al reservorio 4a y puede usarse para suministrar el componente de reacción almacenado en ese reservorio al recipiente 2 de reacción.

Se puede proporcionar un sensor 82 de presión en un ramal corto conectado al conducto entre el recipiente 2 de reacción y la válvula 32b de selección o entre la válvula 32b de selección y la bomba 3b de extracción. Durante la retirada y retorno de material desde o hacia el recipiente 2 de reacción, la presión medida por el sensor 82 es indicativa de la viscosidad de la mezcla que se transfiere: cuanto mayor es la presión, mayor es la viscosidad. En particular, la amplitud de las variaciones de presión durante la retirada y el retorno cíclicos de material es indicativa de la viscosidad de la mezcla de reacción. La relación exacta entre presión y viscosidad depende de varios factores, incluida la rata de extracción o retorno de material, el diámetro de los conductos utilizados y la geometría del recipiente de reacción. Esta relación se puede determinar teóricamente o mediante calibración. En una realización, la relación exacta no es necesaria y las señales del sensor 82 de presión pueden usarse simplemente para detectar cambios en la mezcla de reacción sin conocer su viscosidad exacta. En una reacción donde la viscosidad aumenta debido a la formación de producto, la señal del sensor de presión se puede utilizar para controlar la reacción. Activando la bomba para suministrar uno o más reactivos apropiados desde uno o más reservorios a una rata apropiada o en una cantidad apropiada en función de la señal de presión, es posible aumentar el rendimiento del producto. En otros casos, la señal de presión puede indicar la finalización de la reacción o una etapa de la reacción y así usarse para desencadenar la recolección del producto o la adición de componentes para una siguiente etapa.

Se puede usar una señal del sensor 82 de presión para controlar la rata de extracción y/o retorno de la mezcla al recipiente de reacción para garantizar que el material de ADN en la mezcla no se dañe por las fuerzas de cizallamiento. La rata de extracción y/o retorno de la mezcla puede controlarse para garantizar que no se exceda un límite de presión. El límite de presión puede depender de la viscosidad.

Para eliminar material, por ejemplo, producto de reacción, del recipiente de reacción, primero se conecta la bomba 3b de extracción al recipiente de reacción mediante la segunda válvula 32b de selección y se acciona el solenoide para retirar el pistón de la jeringa con el fin de retirar material del recipiente 2 de reacción. Luego, la bomba de extracción se conecta a un puerto 7 de salida mediante la segunda bomba de selección y se activa el solenoide 33b para expulsar el material recolectado a través del puerto 7 de salida.

El puerto 7 de salida se puede conectar, por ejemplo, a un recipiente para el producto de reacción, un recipiente de muestra, un dispositivo de medición o cualquier otro aparato. También es posible que una muestra que se ha retirado para fines de medición se devuelva al recipiente de reacción después de la medición.

La bomba 3b de extracción puede tener una capacidad mayor que la bomba 3a de suministro de modo que, por ejemplo, todo el recipiente de reacción pueda vaciarse en una única operación de bombeo. También es deseable una capacidad tan grande para la bomba 3b de extracción para ayudar a limpiar el aparato haciendo fluir grandes volúmenes de solución limpiadora y/o agua desionizada a través de todo el sistema. Para este fin, el aparato puede estar provisto de reservorios grandes adicionales para contener cantidades suficientes de solución limpiadora y agua desionizada.

Puede usarse una sola bomba para suministrar componentes de reacción, agitar la mezcla de reacción y retirar la mezcla de reacción y/o el producto.

La bomba 3a de suministro y/o la bomba 3b de extracción pueden comprender otra forma de bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica.

El aparato también comprende un recipiente 6 de desechos que está conectado a la atmósfera a través de una descarga 62 que puede estar provista de una válvula unidireccional. El recipiente 6 de residuos está conectado a la parte superior del recipiente 2 de reacción para proporcionar una descarga y por lo tanto evitar una acumulación de presión en el recipiente 2 de reacción. También se proporcionan conductos para conectar el recipiente 6 de residuos con las válvulas 32a y 32b de selección para permitir el vertido del producto del recipiente de reacción y cualquier componente de reacción no utilizado y no deseado. El recipiente de residuos también se puede utilizar para recibir líquidos de limpieza y enjuague durante limpieza y enjuague *in-situ*, así como pequeñas cantidades de componentes de reacción provenientes del cebado de los conductos para permitir la entrega exacta de las cantidades deseadas al recipiente de reacción.

Puede prescindirse del recipiente 6 de residuos. En este caso es deseable proporcionar una válvula de seguridad al recipiente 2 de reacción y proporcionar conexiones desde las válvulas 32a, 32b de selección a un drenaje externo.

El funcionamiento del aparato está controlado por un controlador 8 que está conectado eléctricamente a los dispositivos 41a-c de control de temperatura, a las jeringas 32a-b de selección, a los solenoides 33a-b, al dispositivo

22 de control de temperatura y al sensor 82 de presión para controlar esos componentes del aparato. El controlador 8 también comprende una interfaz 81 que permite la conexión a un ordenador externo 9 para el control general del proceso a llevar a cabo.

5 El controlador 8 puede preprogramarse para realizar rutinas específicas de uso común tales como cebado, muestreo, recolección, enjuague y limpieza. En una realización, el controlador 8 simplemente pasa comandos desde el ordenador 9 externo a los diferentes componentes del aparato. Las rutinas mencionadas se pueden realizar bajo el control de un ordenador externo o manualmente.

10 Cebado el aparato puede comprender extraer componentes de reacción de cada uno de los reservorios que se van a utilizar de modo que los conductos entre los reservorios y las válvulas de selección se llenen con el componente de reacción respectivo. Esto es deseable para aumentar la precisión en las cantidades de componentes de reacción suministradas al recipiente de reacción y reduce las posibilidades de contaminación. En una realización, tomar muestras de la mezcla de reacción comprende retirar una cantidad predeterminada del componente de reacción a un recipiente o sensor externo durante el curso de una reacción. En algunos casos es posible devolver la muestra al recipiente de reacción. La recolección puede comprender retirar parte o la totalidad del producto de reacción al final de un proceso por lotes o en un momento apropiado en un proceso continuo. El enjuague puede comprender enjuagar los conductos y reservorios usados con agua pura. La limpieza del aparato puede comprender enjuagar conductos y reservorios con una solución limpiadora.

20 En una realización de la invención, se añaden una plantilla de ADN, al menos una polimerasa, uno o más cebadores y nucleótidos a un recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción. Una parte o porción de la mezcla de reacción se retira del recipiente de reacción y se devuelve al mismo para agitar la mezcla de reacción y asegurar su mezcla. Al final de la reacción, se retira el ADN del recipiente de reacción. En una realización, la mezcla de reacción se retira de un puerto provisto en una parte inferior del recipiente de reacción, preferiblemente en el punto más bajo del recipiente de reacción. En una realización, la parte de la mezcla de reacción que se elimina asciende al 50% o menos de toda la mezcla de reacción, deseablemente al 40% o menos, preferiblemente al 30% o menos. En una realización, la parte de la mezcla de reacción que se elimina asciende al 5% o más de toda la mezcla de reacción, deseablemente al 10% o más, preferiblemente al 20% o más.

En una realización, el volumen inicial de la mezcla de reacción está entre 10 ml y 10 litros, preferiblemente de 10 a 100 ml, de 100 ml a 1000 ml o de 1 a 10 litros.

La invención se describirá ahora con referencia a varios ejemplos no limitantes.

### 30 Ejemplos

#### Materiales y métodos

35 La amplificación de ADN llevada a cabo en los siguientes ejemplos se llevó a cabo utilizando la ADN polimerasa Phi29 que actúa sobre una plantilla circular ds que contiene sitios objetivo para la protelomerasa TelN. La polimerasa Phi29 produce repeticiones lineales largas de la plantilla circular (concatámeros) que pueden procesarse con protelomerasa TelN (Touchlight Genetics) para obtener el producto de ADN lineal cerrado deseado. La creación de ADN concatamérico por la ADN polimerasa Phi29 conduce a un aumento en la viscosidad de la reacción debido a su gran longitud (al parecer hasta 77 kilobases), mientras que el procesamiento del ADN concatamérico bicatenario con protelomerasa TelN conduce a una disminución de la viscosidad debido a su gran longitud más corta (entre 2 y 3 kilobases en los ejemplos dados).

40 En los Ejemplos 1 y 3, el ADN se produce en un aparato como se describe en el presente documento y con referencia a las Figuras 1 a 3.

Ejemplo 1: cuantificación en línea del ADN producido en una reacción a partir de mediciones diferenciales de presión.

45 Primero se limpió y descontaminó el aparato. Los tubos se desconectaron de los 10 reservorios de reactivo (42a, 42b, 42c', 42c, 5a a 5g) y se volvieron a conectar mediante accesorios Luer a un colector de 10 posiciones alimentado desde un reservorio de 120 ml que contenía una solución de hipoclorito de sodio al 10 %. De manera similar, se conectó un reservorio de 60 ml de solución de hipoclorito de sodio al 10 % al puerto 7 de salida de la válvula 32b de selección. Controlando las posiciones de las válvulas 32a y 32b de selección y las acciones de los solenoides 33a y 33b en las jeringas 31a y 31b de vidrio de 5 ml respectivamente, todo el sistema, incluyendo el propio recipiente 2 de reacción, se llenó completamente con solución de hipoclorito de sodio sin espacios muertos. Se extrajo un mínimo de 50 5 ml de solución a través de cada tubo. El recipiente de reacción (120 ml de capacidad) se calentó a 50°C mediante acción de control en el termocirculador 22 y el sistema se mantuvo en este estado durante un período de 30 minutos. Este procedimiento aseguró que todo el ADN contaminante dentro de todos los tubos de alimentación y el propio recipiente de reacción fuera completamente destruido.

55 De manera similar, usando un programa apropiado para controlar las válvulas de selección y los solenoides descritos anteriormente, se vació todo el sistema de la solución de hipoclorito de sodio dispensándola en el recipiente 6 de desechos. Repetir el proceso 5 anterior veces después de reemplazar la solución de hipoclorito de sodio en los

## ES 2 973 011 T3

reservorios con agua desionizada aseguró la eliminación completa de cualquier hipoclorito de sodio residual de todo el sistema, dejándolo listo para su uso.

Luego, los tubos se desconectaron del colector y se volvieron a conectar a los 10 reservorios de reactivos que comprendían jeringas de polipropileno desechables estériles con accesorios Luer Lock (de 5 ml a 20 ml de capacidad).

- 5 Cuando se indica a continuación, estas jeringas contenían componentes de reacción individuales en un volumen mínimo de 2 ml. De lo contrario, se dejaban vacíos con los émbolos completamente presionados. El reservorio 5d constaba de dos jeringas de 60 ml en paralelo para dar una capacidad total de 120 ml de agua desionizada. En las jeringas que contenían reactivos, el aire en cada cilindro de la jeringa se expulsó, después del llenado, presionando manualmente el émbolo hasta que el líquido apenas escapó de la salida de la jeringa. Durante este procedimiento, la salida de la jeringa se mantuvo verticalmente por encima del émbolo de la jeringa para permitir la expulsión de todo el aire del cilindro.
- 10

TABLA 1

Orden de adición	Reservorio	Temperatura del reservorio °C	Reactivo	Concentración	Volumen dispensado	Concentración en la mezcla de reacción
1	3a	Temperatura ambiente	Plantilla circular de ADN  proTLx-K N3X2 Ca109 HA  (figura 9)  (Touchlight Genetics)	100µg/ml	7ml	7µg/ml
2	3b	Temperatura ambiente	Cebador de oligonucleótido único (11-mer)  5' gcgtataat *g *g 3' *enlace fosforilato  (Oligo Factory)	4.5mM	555µl	25µM
3	3c	Temperatura ambiente	NaDH	1M	1ml	10mM
4	3f	Temperatura ambiente	amortiguador 10x  300mM Tris-HCl, pH 7.5  300mM KCl  75mM MgCl <sub>2</sub>  50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  20mM DTT		10ml	30mM Tris-HCl, pH 7.5  30mM KCl  7.5mM MgCl <sub>2</sub>  5mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  2mM DTT

5	42c	4.0	Polimerasa ADN phi 29  {Touchlight Genetics}	1 mg/ml	1.3ml	12/ µg/ml
6	42c'	4.0	Pirofosfatasa  {Enzymatics}	4483 unidades/ml	20µl	0.9 unidades/ml
7	5e	Temperatura ambiente	dNTPs  sales de Li <sup>+</sup>  {Bioline}	100mM	2ml	2mM  (0.5mM de cada dNTP)
8	5d	Temperatura ambiente	H <sub>2</sub> O		78.225ml	

Los reactivos enzimáticos, ADN polimerasa Phi29 y pirofosfatasa, en los reservorios 42c y 42c' respectivamente, se mantuvieron en condiciones estables a 4°C mediante el dispositivo 41c de control de temperatura. Todos los demás reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente.

- 5 Para lograr una dispensación precisa de reactivos en el recipiente 2 de reacción, los tubos entre los reservorios de reactivos y las válvulas 32a y 32b de selección se cebaron retirando secuencialmente cantidades muy pequeñas de los reactivos y dispensándolos en el recipiente 6 de desechos.

10 Para desnaturalizar la plantilla de ADN y unir el cebador oligonucleotídico, los reactivos de los reservorios 5a, 5b y 5c se dispensaron a través de la válvula 32a de selección (mediante la acción del solenoide 33a en la jeringa 31a) en una jeringa vacía cerrada de 5 ml (reservorio 42b). La temperatura de este reservorio fue controlada por el dispositivo 41b de control de temperatura. Se usó una acción de control sobre 41b para elevar su temperatura a 95°C durante 3 minutos y luego enfriar a 30°C. Los componentes de reacción combinados en el reservorio 42b se dispensaron luego al recipiente 2 de reacción a través de la válvula 32a de selección. Los 5 componentes de reacción restantes se dispensaron secuencialmente a través de la válvula 32a de selección en el orden mostrado en la Tabla 1 de manera que el volumen final en el recipiente 2 de reacción fuera de 100 ml. La temperatura del recipiente 2 de reacción se ajustó a 30°C mediante acción de control en el termocirculador 22. Los componentes de la reacción no se expusieron a temperaturas superficiales superiores a 2°C por encima del punto de ajuste.

20 La mezcla de los componentes de la reacción se logró mediante la acción de control sobre el solenoide 33b y posteriormente sobre el movimiento de la jeringa 31b mezcladora. Se controló la acción de la jeringa para retirar y regresar al recipiente 2 de reacción, 5 ml de componentes de reacción. La mezcla fue discontinua con la jeringa activada durante 1 minuto a intervalos de 29 minutos a una rata de extracción/dispensación de 55 ml/min.

25 El cambio de presión en el tubo entre el recipiente 2 de reacción y la jeringa 31b se midió mediante un sensor de presión y vacío (Modelo PX409-2.5CGUSBH, Omega Engineering Limited, Manchester, M44 5BD, Reino Unido). Este sensor mide diferencias de presión de -2.5 a +2.5 psi y se conectó mediante una pieza en T utilizando una sección corta de tubo de PTFE de 1/8 de pulgada de diámetro. La señal de salida del sensor se monitorizó en tiempo real y se registró en el ordenador que controla el reactor utilizando el software suministrado por el fabricante. La acción alternativa de la jeringa mezcladora produce una salida del sensor de presión que oscila entre valores positivos y negativos (carrera de tracción/empuje de la jeringa mezcladora). Para cada minuto de datos de presión registrados en cada momento de mezclado, se calcularon las lecturas de presión mínima y máxima durante 3 series de 20 segundos.

30 El valor mínimo se resta del valor máximo para cada conjunto y se calcula un promedio. Con todas las demás variables fijas, tal como la velocidad de la jeringa, el material del tubo, el diámetro y la longitud internos y el tamaño y la geometría de la válvula de selección, cualquier cambio en la altura del pico solo podría deberse a un cambio en la viscosidad de los componentes de la reacción. Los cambios de presión muy pequeños que podrían atribuirse a la temperatura ambiental y las fluctuaciones de presión no se compensaron en los cálculos de diferencia de presión. El primer punto

de datos utilizado para el análisis fue después de aproximadamente 45 minutos para garantizar que el sistema se hubiera equilibrado por completo.

5 La Figura 4 muestra claramente el aumento en la diferencia de presión con el tiempo para una reacción de amplificación de ADN catalizada por la ADN polimerasa Phi29. Las muestras tomadas de esta reacción también se analizaron directamente en busca de ADN utilizando el ensayo fluorométrico Qubit™ BR dsDNA (Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Este ensayo mide únicamente el ADN bicatenario. El ADN concatamérico producido en la reacción se procesó con protelomerasa TelN para producir tres moléculas de ADN lineales cerradas covalentemente. El ADN procesado se precipitó con PEG 8000 y NaCl a concentraciones finales del 5% y 2 M respectivamente. El ADN precipitado se centrifugó a 14,000 g durante 20 minutos y se resuspendió en un volumen equivalente de agua desionizada libre de nucleasas.

10 La Figura 5 muestra claramente que el aumento en la señal diferencial de presión durante el curso de la reacción se correlaciona directamente con un aumento en la concentración de ADN. La relación lineal directa entre la presión y el ADN medido también indica que, durante este período de la reacción, el ADN existe predominantemente en forma de bicatenario.

15 Ejemplo 2: efecto de las concentraciones iniciales de dNTP sobre la eficiencia de su incorporación al ADN.

En este experimento, las reacciones de amplificación de ADN (volúmenes de 5 ml) se llevaron a cabo en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Los componentes se agregaron secuencialmente a los tubos en el orden que se muestra en la Tabla 2 para dar las concentraciones finales indicadas. Los efectos de las concentraciones iniciales de dNTP sobre la amplificación del ADN se probaron a 2 mM, 4 mM y 8 mM.

TABLA 2

Orden de adición	Reactivo	Concentración en la mezcla de reacción
1	Plantilla circular de ADN proTLx-K BSX4 Cal09 HA (Figura 10) (Touchlight Genetics)	5µg/ml
2	Cebador de oligonucleótido único (14-mer 5' atggrgcwattgt*g*t 3')  r = a o g w = t o a *indica enlace fosforotioato (Oligo Factory)	50µM
3	H <sub>2</sub> O	A 5ml
4	NaOH	10mM
5	dNTPs  sales de Li <sup>+</sup> (Bioline)	2mM  4mM  8mM
6	<u>amortiguador 10x</u>  300mM Tris-HCl, pH 7.5  300mM KCl  75mM MgCl <sub>2</sub>	  30mM Tris-HCl, pH 7.5  30mM KCl  7.5mM MgCl <sub>2</sub>

	50mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20mM DTT	5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2mM DTT
7	Polimerasa ADN phi 29 (Enzymatics)	200 unidades/ml
8	Pirofosfatasa (Enzymatics)	0.4 unidades/ml

Todos los tubos se incubaron a 30°C en una incubadora orbital con agitación mínima durante un período de 61.5 horas. Este período de tiempo correspondió a aproximadamente 10 veces el requerido para completar una reacción de amplificación de ADN suministrada con dNTP 2 mM. Al final de la reacción, el ADN concatamérico producido en cada condición se procesó con protelomerasa TeIN para producir dos moléculas de ADN lineales cerradas covalentemente diferentes. El ADN procesado se precipitó con PEG 8000 y NaCl a concentraciones finales del 5% y 2 M respectivamente. El ADN precipitado se centrifugó a 14,000 g durante 20 minutos y se resuspendió en 5 ml de agua desionizada libre de nucleasas. Se diluyó una muestra de este producto de ADN 1 en 50 en agua desionizada y se calentó a 75°C durante 1 minuto. Se mezcló una muestra de 10 µl de este ADN diluido con 2 µl de tinte de carga (Novel Juice, Newmarket Scientific Ltd., Reino Unido) y se aplicó una muestra de 10 µl a un gel de agarosa al 0.8% y se ejecutó en condiciones de electroforesis estándar hasta que los componentes del ADN se separaron claramente (Figura 6).

El gel de electroforesis en la Figura 6 muestra claramente una disminución dramática en el rendimiento del producto para los dos productos de ADN lineales cerrados covalentemente cuando la concentración inicial de dNTP era 8 mM. Dado que la reacción se llevó a cabo durante un largo período de tiempo, esto indica un efecto inhibitorio muy fuerte sobre la amplificación del ADN. También se analizó el ADN de las muestras tomadas al final de la reacción utilizando mediciones de absorbancia a 260 nm y los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Las concentraciones de ADN procesado total al final de la reacción se calcularon a partir de mediciones de absorbancia a 260 nm y se expresaron como porcentaje del rendimiento máximo teórico de ADN de los diferentes niveles de dNTP.

Reacción concentración(mM) dNTP (sales $\text{Li}^+$ ) en la mezcla de reacción	Rendimiento máximo teórico de ADN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rendimiento de ADN como porcentaje del rendimiento teórico máximo (%)
2	650	100
4	1300	85
8	2600	15

La Tabla 3 confirma los resultados de la electroforesis mostrados en la Figura 6: iniciar concentraciones de dNTP superiores a 4 mM puede reducir drásticamente los rendimientos de ADN en reacciones catalizadas por la ADN polimerasa Phi 29. También fue evidente que con una concentración inicial de dNTP de 8 mM, también hubo una reducción significativa en la pureza del producto evidenciada por manchas alrededor de las dos bandas principales del producto (Figura 6).

La reducción observada en el rendimiento de ADN, al aumentar las concentraciones iniciales de dNTP, se puede atribuir a una serie de efectos sobre la reacción. Éstos incluyen, entre otros: inhibición del sustrato de la enzima;  $\text{Li}^+$  o efectos de los nucleótidos sobre la estabilidad de las interacciones de la cadena de ADN, principalmente interacciones del cebador-plantilla y/o el nivel de  $\text{Mg}^{2+}$  libre disponible para la actividad enzimática como resultado de la unión de  $\text{Mg}^{2+}$  a dNTP. La inhibición de la amplificación del ADN puede ser causada por un solo factor o por múltiples factores que funcionan de manera directa o indirecta. Claramente, no se puede lograr aumentar el rendimiento de ADN en la reacción a niveles considerados aceptables para la producción industrial simplemente aumentando las concentraciones iniciales de dNTP.

Ejemplo 3: Efecto de alimentar dNTP a una reacción de amplificación de ADN catalizada por ADN polimerasa Phi29

Se llevaron a cabo experimentos para comparar el efecto de complementar las reacciones de amplificación de ADN catalizadas por Phi29 con cantidades adicionales de dNTP. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1, pero las concentraciones de ADN se calcularon a partir de mediciones de absorbancia a 260 nm. Se hicieron comparaciones entre una reacción con dNTP 2 mM y no se agregaron dNTP adicionales (Reacción 1), una reacción con dNTP 2 mM y se alimentó con dNTP 2 mM adicionales a los 530 minutos (Reacción 2), una reacción con dNTP 4 mM desde el principio (sin dNTP adicionales añadido) y una reacción con dNTP 2 mM alimentados con concentraciones 2 mM de dNTP adicionales tres veces (a 500, 1430 y 4340 minutos). El desencadenante para alimentar cualquier dNTP agregado fue una nivelación de la señal diferencial de presión. Esto activó la adición de un volumen apropiado de solución de dNTP desde un reservorio de modo que la concentración de dNTP en el reactor aumentó en 2 mM.

Para cada una de estas condiciones de reacción, en la Figura 7 se muestra un gráfico del diferencial de presión versus el tiempo.

A partir de los datos presentados en la Figura 7, las ratas iniciales se calcularon antes, entre y después de la adición de dNTP, según correspondiera. Estos se muestran en la Tabla 4. Además, al final de cada reacción, se estimaron y calcularon los rendimientos finales de ADN como porcentaje del rendimiento teórico máximo de la concentración de dNTP añadidos. Los datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4: Ratas iniciales de amplificación de ADN para las reacciones 1 a 4 estimadas a partir de mediciones de presión diferencial

	Reacción 1	Reacción 2	Reacciones	Reacción 4	Catión metálico: proporción fosfato para la Reacción 4
	dNTP de 2 mM	dNTP de 4 mM	dNTP de 2 mM más 1 adición de dNTP de 2 mM	dNTP de 2 mM más 3 adiciones de dNTP de 2 mM	Proporción $Mg^{2+}/PO_4^{3-}$
[dNTP]mM	Rata de reacción inicial (unidades de presión diferencial/min)				
2		0.3143		0.2646	0.3588
4			0.0761	0.0598	0.0593
6					0.0226
8					0.0135

Tabla 5: Los rendimientos finales de ADN para las reacciones 1 a 4 se calcularon a partir de mediciones de absorbancia a 260nm

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
	dNTP de 2 mm	dNTP de 4 mm	dNTP de 2 mM más 1 adición de dNTP de 2 mM	dNTP de 2 mM más 3 adiciones de dNTP de 2 mM
Total [dNTP] mM	2	4	4	8
Rendimiento final de ADN (µg/ml)	405	763	760	1400
Rendimiento de ADN como porcentaje del rendimiento máximo teórico (%)	62	59	58	54

La Tabla 4 muestra claramente que el aumento de la concentración de dNTP reduce drásticamente la rata a la que la ADN polimerasa Phi29 amplifica el ADN. El efecto sobre la rata de reacción es acumulativo e independiente de cuándo se añaden dNTP adicionales.

- 5 En el Ejemplo 2 se demostró que una reacción con una concentración inicial de dNTP de 8 mM produjo sólo el 15% del rendimiento teórico máximo, lo que indica una reacción extremadamente lenta. En la Tabla 5, una reacción en la que se añaden dNTP 8 mM en alícuotas de 2 mM (Reacción 4) logra un rendimiento de ADN del 54 % del rendimiento teórico máximo, lo que supone una mejora muy significativa. Si bien la alimentación gradual de dNTP parece conducir a una reducción progresiva en la rata de reacción, la rata general es más rápida y produce mayores rendimientos que la introducción de una alta concentración de dNTP al inicio de la reacción.
- 10

La Tabla 4 también muestra que, en el proceso de alimentación de dNTP, la proporción molar de iones  $Mg^{2+}$  a grupos fosfato dNTP (proporción  $Mg^{2+}/PO_4^{3-}$ ) se reduce significativamente y coincide con la disminución observada en la rata de reacción. Esto se ilustra en la Figura 8.

- 15 Por lo tanto, la alimentación con dNTP puede aumentar la producción de ADN a niveles industrialmente aceptables en reacciones catalizadas por enzimas. Sin embargo, para lograr ratas de reacción más altas, parece que la proporción molar de iones  $Mg^{2+}$  a grupos dNTP  $PO_4^{3-}$  debe mantenerse en un nivel óptimo mediante la alimentación con iones  $Mg^{2+}$  con los dNTP.

Ejemplo 4: Efecto de la concentración de iones magnesio sobre la eficiencia de incorporación de dNTP al ADN

- 20 En este experimento, las reacciones de amplificación de ADN (volúmenes de 5 ml) se llevaron a cabo en tubos de centrífuga de polipropileno de 50 ml. Los componentes se precalentaron a 30°C y se agregaron secuencialmente a los tubos en el orden que se muestra en la Tabla 6 para dar las concentraciones finales indicadas. Concentraciones iniciales de  $Mg^{2+}$  de 2.24 mM, 4.52 mM, 9 mM y 11.24 mM en combinación con una concentración inicial de dNTP de 3 mM dieron proporciones  $Mg^{2+}/PO_4^{3-}$  de 0.25, 0.5, 1 y 1.25 respectivamente. Los tubos se incubaron a 30°C durante 19 horas antes de agregar alícuotas adicionales de dNTP y  $MgCl_2$  para aumentar la concentración de reacción de dNTP a 6 mM y las concentraciones de  $Mg^{2+}$  a 4.48 mM, 9.04 mM, 18 mM y 22.48 mM para mantener proporciones  $Mg^{2+}/PO_4^{3-}$  de 0.25, 0.5, 1 y 1.25. Se dejó que la reacción continuara durante 24 horas más, momento en el que se recogió el producto de ADN y se estimó su concentración. El ADN se digirió con una cantidad suficiente de protelomerasa TelN y el ADN se precipitó usando 6% de PEG 8000 en un amortiguador que contenía NaCl 500 mM, MgCl 100 mM<sup>2</sup>. Se resuspendió el ADN en un volumen de 4 ml y se cuantificó el ADN utilizando mediciones de absorbancia a 260 nm.
- 25
- 30

Orden de adición	Reactivo	Concentración en la mezcla de reacción
1	Plantilla circular de ADN  proTLx-K N3X2 ova (Figura 11)  {Touchlight Genetics}	2µg/ml
2	Cebador de oligonucleótido único (11-mer)  5' gcgtataat *g*g 3'  *enlace fosforotato  {Oligo Factory}	50µM
3	H <sub>2</sub> O	A 5ml
4	MgCl <sub>2</sub>	2.24mM  4.52mM  9mM  11.24mM
5	NaOH	2mM
6	dNTPs	3mM

	sales de Li <sup>+</sup> (Bioline)	
7	amortiguador 10x  300mM Tris-HCl, pH 7.9  300mM KCl  50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  20mM DTT  1% Tween-20	30mM Tris-HCl, pH 7.9  30mM KCl  5mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  2mM DTT  0.1% Tween™ 20
8	Polimerasa ADN phi 29  (Enzymatics)	200 unidades/ml
9	Pirofosfatasa  (Enzymatics)	0.4 unidades/ml

Tabla 6. Componentes de mezcla de reacción y orden de adición.

Tabla 7: Rendimientos de ADN en reacciones alimentadas con dNTP que mantienen proporciones Mg<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

Concentración Mg <sup>2+</sup> totales (mM)	Concentración dNTP total de (mM)	Proporción Mg <sup>2+</sup> /PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Proporción Mg <sup>2+</sup> /dNTP	Rendimiento de ADN (mg)	Rendimiento de ADN (mg/mmol de dNTP)	% Rendimiento o teórico máximo	Concentración de ADN (g/l)
4.48	6.0	0.25	0.75	2.67	89.0	27.4	0.53
9.04	6.0	0.50	1.5	5.40	180.0	55.4	1.08
18	6.0	1.00	3	5.49	183.1	56.3	1.10
22.48	6.0	1.25	3.75	4.77	159.0	48.9	0.95

5 Los resultados de la Tabla 7 muestran el efecto de diferentes proporciones Mg<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> sobre el rendimiento de ADN después de 43 horas en reacciones alimentadas con dNTP. El menor rendimiento de ADN logrado después de este tiempo con una proporción Mg<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de 0.25 indica una tasa de reacción más lenta o inhibición de la reacción debido a una concentración insuficiente de iones Mg<sup>2+</sup>. De cualquier manera, los datos indican que existe una proporción óptima de Mg<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> que debe mantenerse para una reacción de amplificación de ADN eficiente para uso industrial.

10 Los datos indican que la proporción óptima puede estar entre 0.5 y 1.25. Los datos también indican que, si se alimentan dNTP a una reacción, la adición de iones Mg<sup>2+</sup> adicionales mantiene una proporción óptima Mg<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (idealmente 1) que permite una conversión eficiente en ADN.

Ejemplo 5: Efecto de la adición de protelomerasa TelN en la reacción de amplificación de ADN catalizada por la ADN polimerasa Phi29 alimentada con múltiples alícuotas de dNTP.

- 5 Se llevaron a cabo experimentos para comparar el efecto de complementar reacciones de amplificación de ADN catalizadas por Phi29 en el plásmido ProTLx-K N3X2 Lux (figura 13), con cantidades adicionales de dNTP y la protelomerasa TelN. Las reacciones se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, pero con el reservorio 42b que contenía una solución TelN 25  $\mu\text{M}$  en Tris-HCl 12 mM (pH 7.4), NaCl 90 mM, EDTA 0.1 mM. DTT 1 mM, glicerol al 50 % mantenido a 4 °C y reservorio de 5 g que contiene solución  $\text{MgCl}_2$  100 mM en agua desionizada. La concentración inicial de la plantilla ProTLx-K\_N3X2 Lux fue de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- 10 Después de la fase discontinua de la reacción, se agregaron alícuotas de dNTP al recipiente 2 de reacción, mediante la jeringa 31a, para lograr un aumento en la concentración de 2 mM en intervalos de tiempo seleccionados de 300 min, 600 min, 900 min, 1080 min, 1230 min y 1440 min. En los mismos intervalos de tiempo e inmediatamente después de la adición de los dNTP, se colocaron alícuotas de  $\text{MgCl}_2$  se agregaron para lograr una proporción 3:1 de  $[\text{Mg}^{2+}]:[\text{dNTPs}]$ . A los 1050 minutos, se dispensó protelomerasa TelN en el recipiente 2 de reacción dando una concentración final de 2  $\mu\text{M}$ .
- 15 Después de la fase discontinua inicial de la reacción (hasta 300 minutos), hay un aumento constante en la medición de la presión diferencial correspondiente a la síntesis de ADN concatamérica. Después de la adición de protelomerasa TelN a la reacción a los 1050 minutos, hay un aumento de 3.6 veces en la rata del cambio de presión correspondiente a un aumento dramático en la síntesis de ADN. Se propone que la adición única de TelN durante la fase de la reacción alimentada con dNTP/ $\text{Mg}^{2+}$  conduzca a la producción de ADN lineal cerrado que puede actuar como plantilla para una mayor amplificación del ADN. La alimentación adicional de  $\text{Mg}^{2+}/\text{dNTPs}$  después de este punto es fundamental para garantizar el aumento observado en la rata de síntesis de ADN.
- 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso sin células para sintetizar ADN en una cantidad superior a 1g por litro de mezcla de reacción, que comprende poner en contacto una plantilla de ADN con al menos una polimerasa en presencia de nucleótidos y uno o más cationes metálicos para formar dicha mezcla de reacción, en donde la amplificación isotérmica de la plantilla de ADN se produce mediante replicación por desplazamiento de cadena y en el que se suministran independientemente más nucleótidos y cationes metálicos a la mezcla de reacción de forma continua o en alícuotas de modo que la proporción de cationes metálicos: nucleótidos esté entre 3:1 y 1:3.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende además uno o más cebadores.
- 10 3. El proceso sin células de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el rendimiento final de ADN de la mezcla de reacción es a gran escala.
4. El proceso sin células de la reivindicación 3, en el que el rendimiento final de ADN de la mezcla de reacción es de 1 - 10 g/l.
- 15 5. El proceso sin células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el suministro de nucleótidos adicionales se controla a la mezcla de reacción basándose en cálculos teóricos de la cinética enzimática para la polimerasa, de manera que los nucleótidos adicionales se suministran según lo requiera la polimerasa.
6. El proceso sin células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el suministro de nucleótidos adicionales se controla a la mezcla de reacción basándose en parámetros medibles de la mezcla de reacción, de modo que los nucleótidos adicionales se suministran según lo requiera la polimerasa.
- 20 7. El proceso sin células de la reivindicación 6, en el que los parámetros medibles de la mezcla de reacción incluyen la tasa de síntesis de ADN, la concentración de ADN sintetizado, la viscosidad de la mezcla de reacción o el volumen de la mezcla de reacción.
8. El proceso sin células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se controla la concentración de ADN sintetizado.
- 25 9. El proceso sin células de la reivindicación 7 u 8, en el que la concentración del ADN en la mezcla de reacción se controla midiendo la diferencia de presión de la mezcla de reacción o una parte o porción de la misma.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha plantilla de ADN es circular y la amplificación de dicha plantilla de ADN se realiza mediante amplificación de círculo rodante.
- 30 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha plantilla de ADN es un ADN lineal cerrado, preferiblemente en la que dicha plantilla de ADN se incubaba en condiciones desnaturalizantes para formar un ADN monocatenario circular cerrado.
12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha plantilla de ADN comprende al menos una secuencia objetivo de enzima de procesamiento, preferiblemente una secuencia objetivo de recombinasa o una secuencia objetivo de protelomerasa.
- 35 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que se suministra una enzima de procesamiento a la mezcla de reacción y dicho suministro está controlado.
14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos nucleótidos adicionales se suministran en una pluralidad de alícuotas a la mezcla de reacción, preferiblemente dichos nucleótidos adicionales se suministran como alícuotas a intervalos regulares durante la duración del proceso, opcionalmente al menos cada 40 30 minutos.
15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos nucleótidos o nucleótidos adicionales comprenden nucleótidos biológicamente inactivos y preferiblemente se suministran a la mezcla de reacción mediante activación.
- 45 16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho proceso se realiza en un aparato de síntesis, comprendiendo dicho aparato:
  - un recipiente de reacción que tiene al menos un primer puerto y un segundo puerto;
  - un dispositivo de control de temperatura para controlar la temperatura del recipiente de reacción;
  - una pluralidad de reservorios para contener componentes de reacción, que comprenden preferiblemente dichos nucleótidos adicionales y/o iones metálicos adicionales;

una pluralidad de conductos, conectando cada uno de la pluralidad de conductos el primer puerto del recipiente de reacción con uno respectivo de la pluralidad de reservorios;

al menos un sensor de presión ubicado cerca del primer puerto o segundo puerto del recipiente de reacción;

5 medios de suministro para suministrar selectivamente al recipiente de reacción cantidades controladas de componentes de reacción contenidos en los recipientes;

medios de agitación para retirar selectivamente una cantidad de contenido del recipiente de reacción a través del segundo puerto del mismo y devolver selectivamente el contenido del recipiente de reacción al recipiente de reacción a través del segundo puerto del mismo; y

medios de control para controlar los medios de suministro y los medios de agitación,

10 en donde, el sensor de presión detecta un cambio en la presión externa del recipiente de reacción relacionado con la concentración del ADN y envía una señal a los medios de control y los medios de control controlan los medios de suministro y/o los medios de agitación en respuesta a un cambio en la presión observada.

15 17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicha señal indica la concentración de ADN y se genera midiendo una diferencia de presión creada por una bomba alternativa que elimina y devuelve una porción de la mezcla de reacción sobre el sensor de presión.

18. El proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dichos cationes metálicos comprenden uno o más cationes metálicos divalentes seleccionados de la lista que consiste en: magnesio ( $Mg^{2+}$ ), manganeso ( $Mn^{2+}$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), berilio ( $Be^{2+}$ ), zinc ( $Zn^{2+}$ ) y estroncio ( $Sr^{2+}$ ), preferiblemente  $Mg^{2+}$ .

20 19. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho catión metálico es un catión divalente y la proporción entre dichos cationes metálicos divalentes y los nucleótidos se mantiene en aproximadamente 3:1 en la mezcla de reacción.

20. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se mantiene entre 0.001mM y 6mM.

25 21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción se mantiene en aproximadamente 3mM.

30 22. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos nucleótidos y/o nucleótidos adicionales son trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTP), o un derivado o versión modificada de los mismos, preferiblemente en el que dichos nucleótidos y/o nucleótidos adicionales son uno o más de trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), trifosfato de desoxitimidina (dTTP) y derivados de los mismos.

23. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos nucleótidos se proporcionan como uno o más ácidos libres, sus sales o quelatos de los mismos.

35 24. El proceso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dichos nucleótidos se proporcionan como uno o más ácidos libres, sus sales o quelatos de los mismos, en el que dichas sales o quelatos incluyen uno o más de los siguientes iones metálicos:  $Mg^{2+}$ ,  $Be^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ .

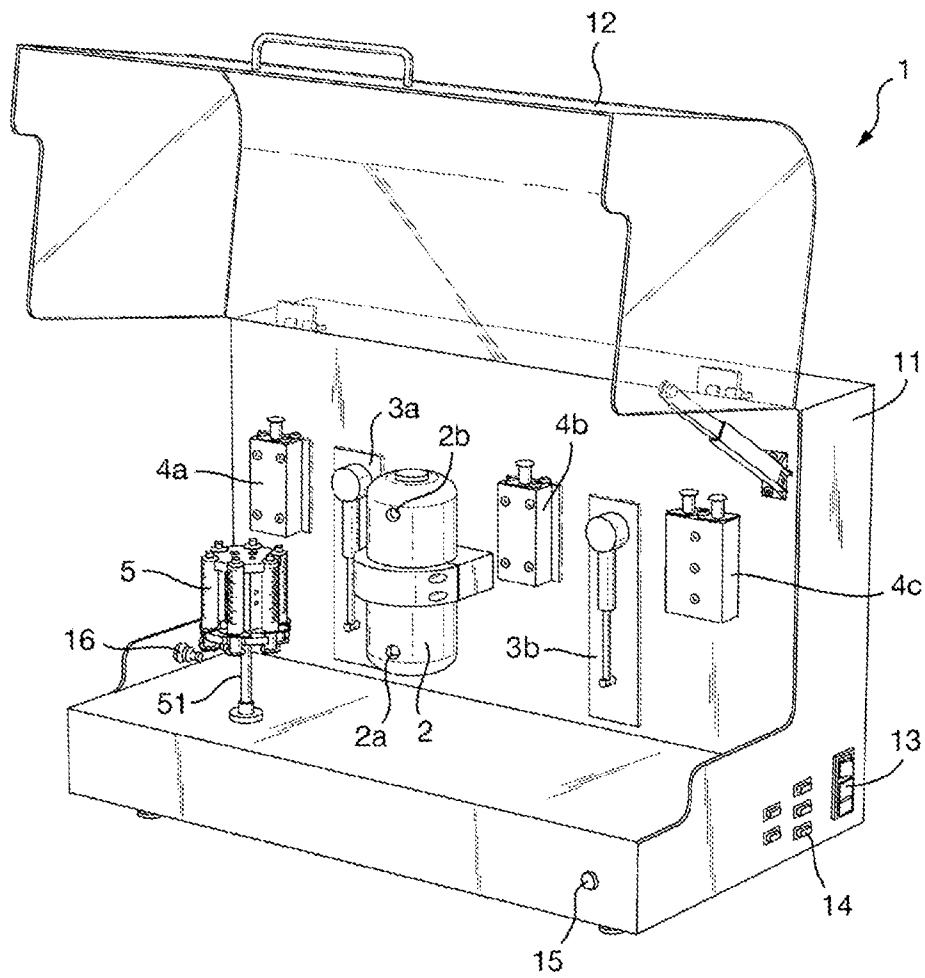


Fig. 1

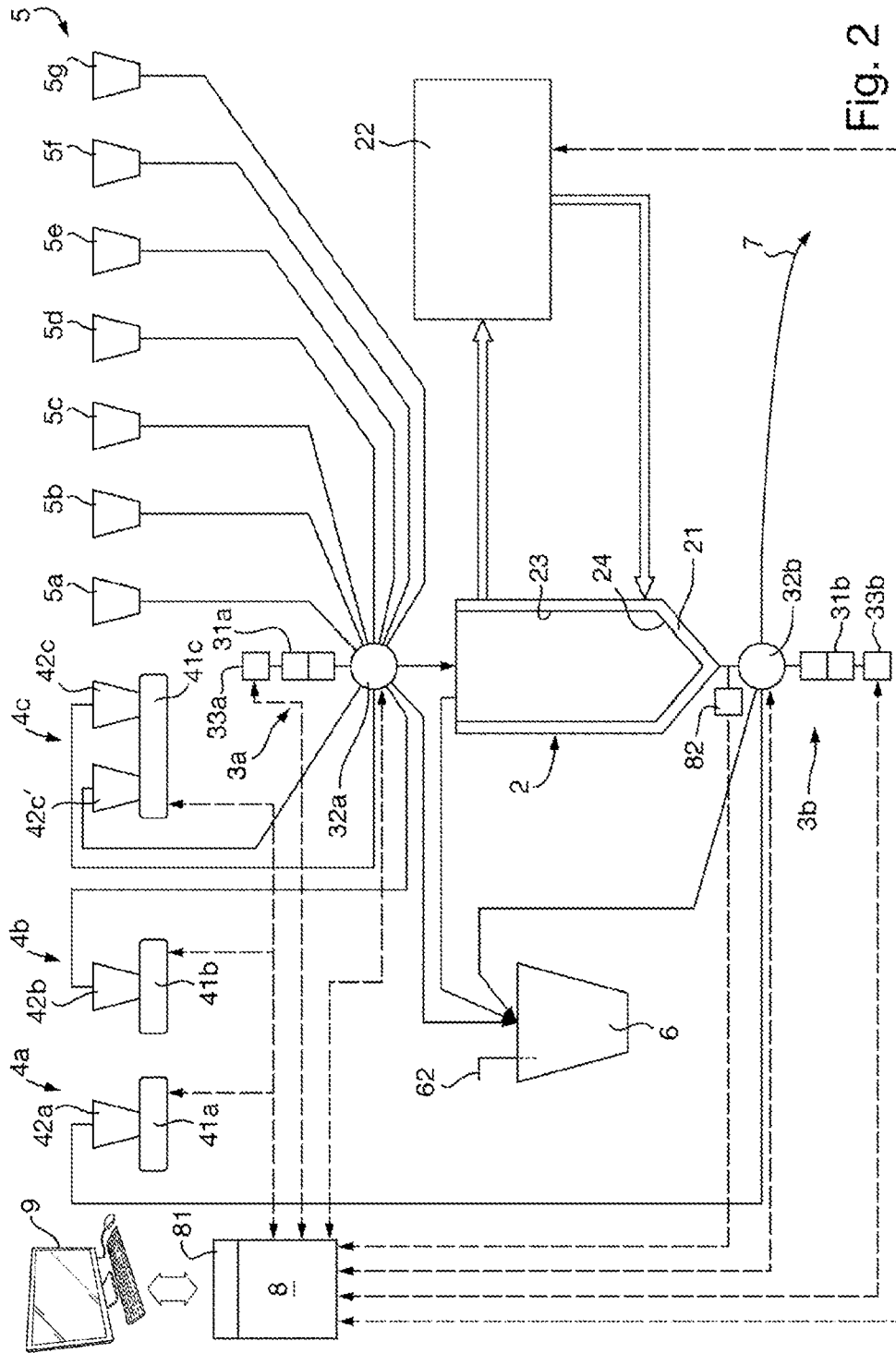


Fig. 2

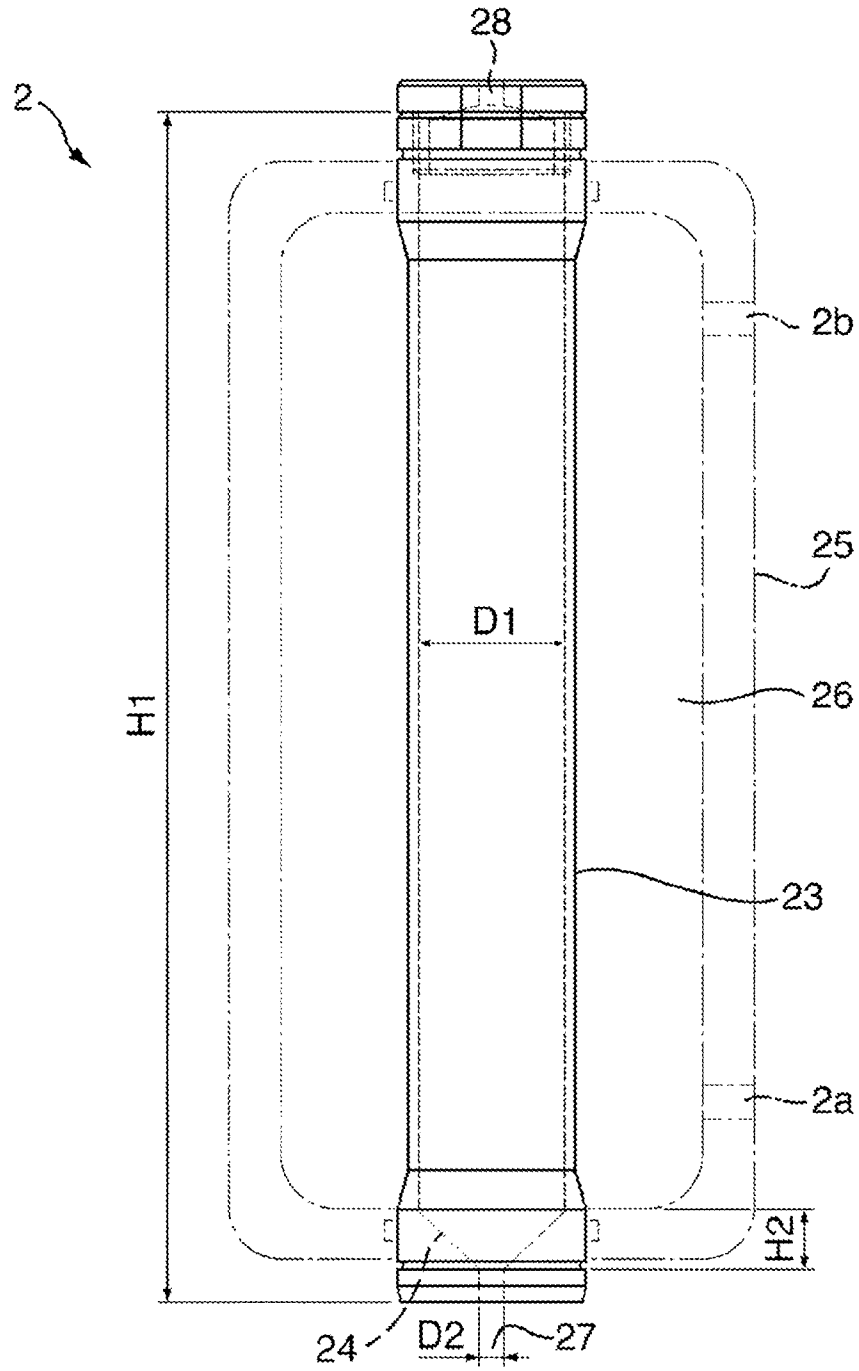


Fig. 3

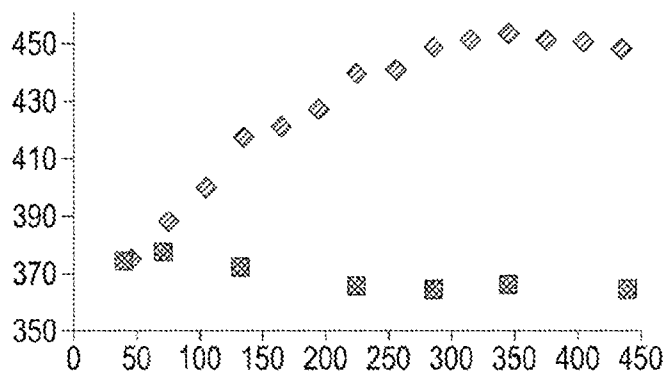


Fig. 4

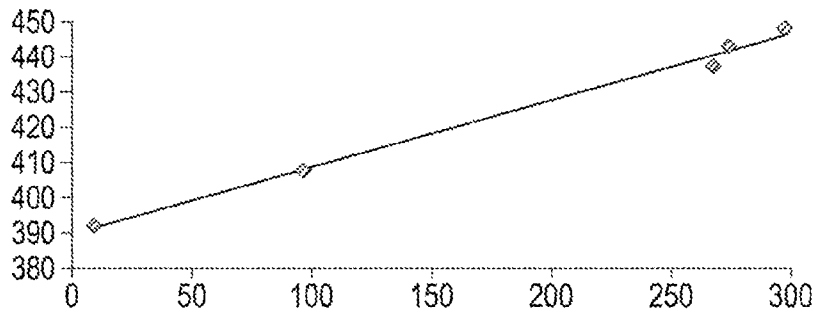


Fig. 5

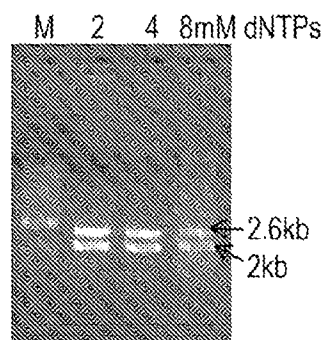


Fig. 6

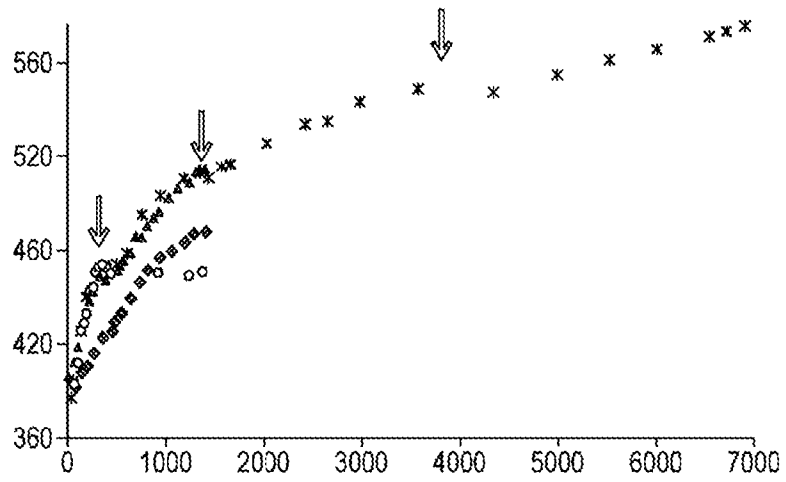


Fig. 7

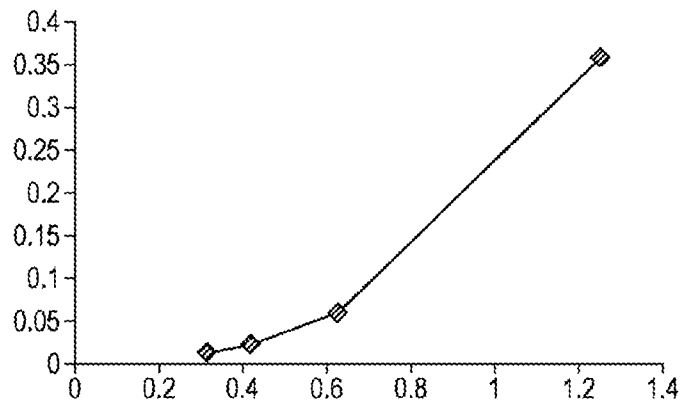


Fig. 8

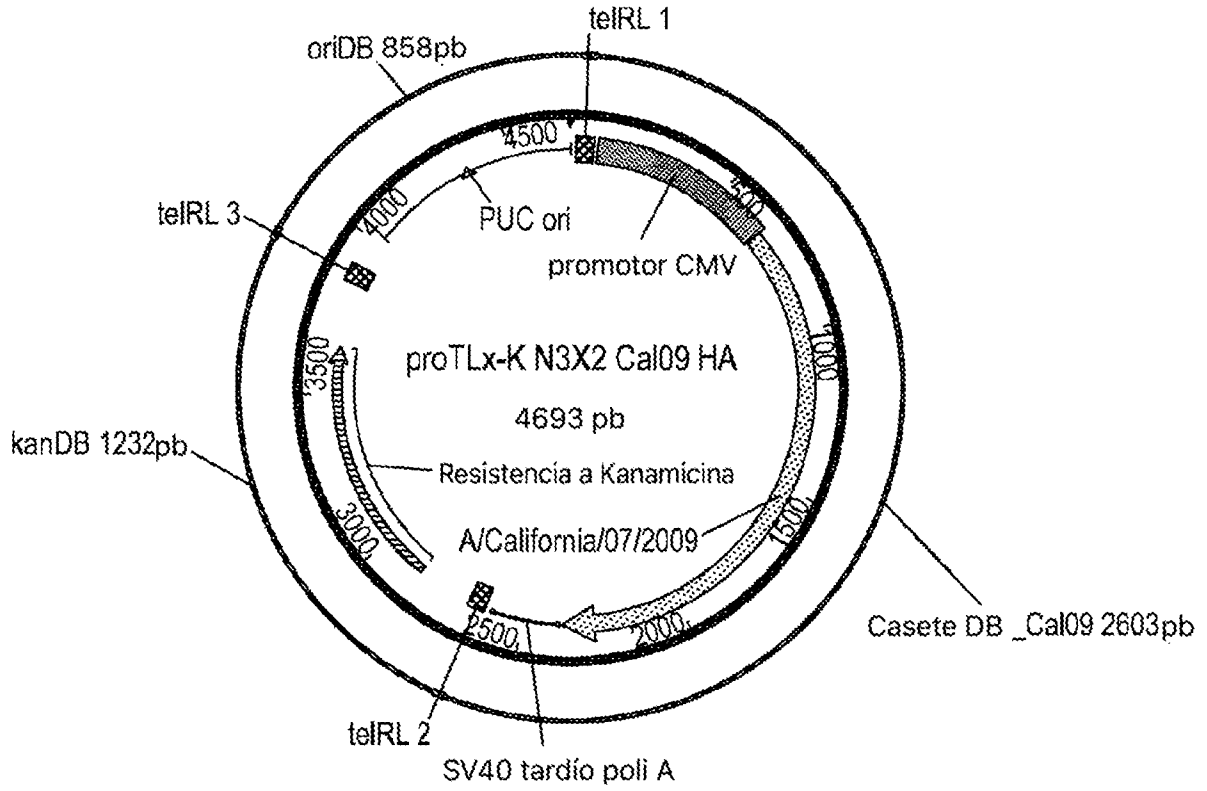


Fig. 9

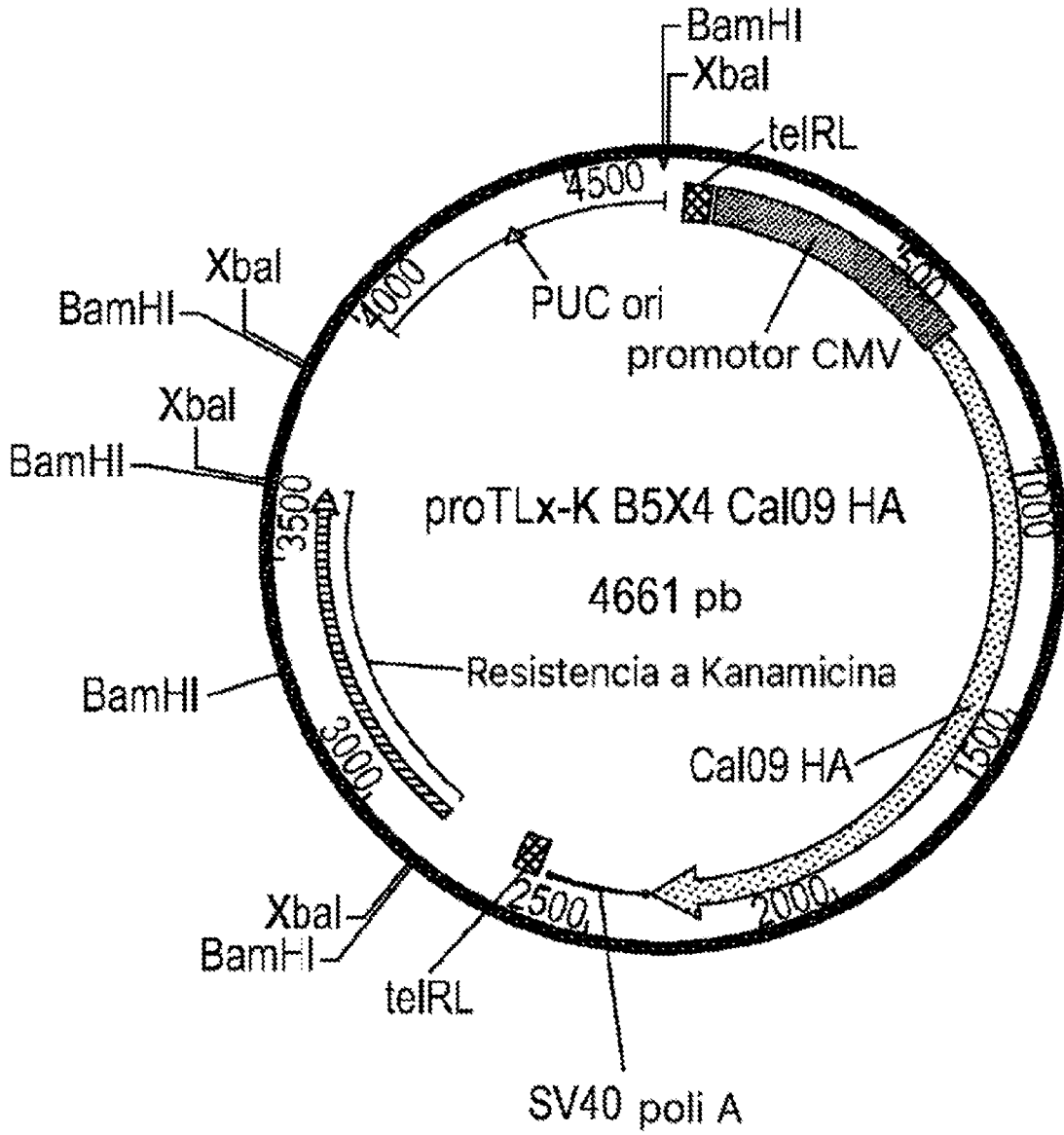


Fig. 10

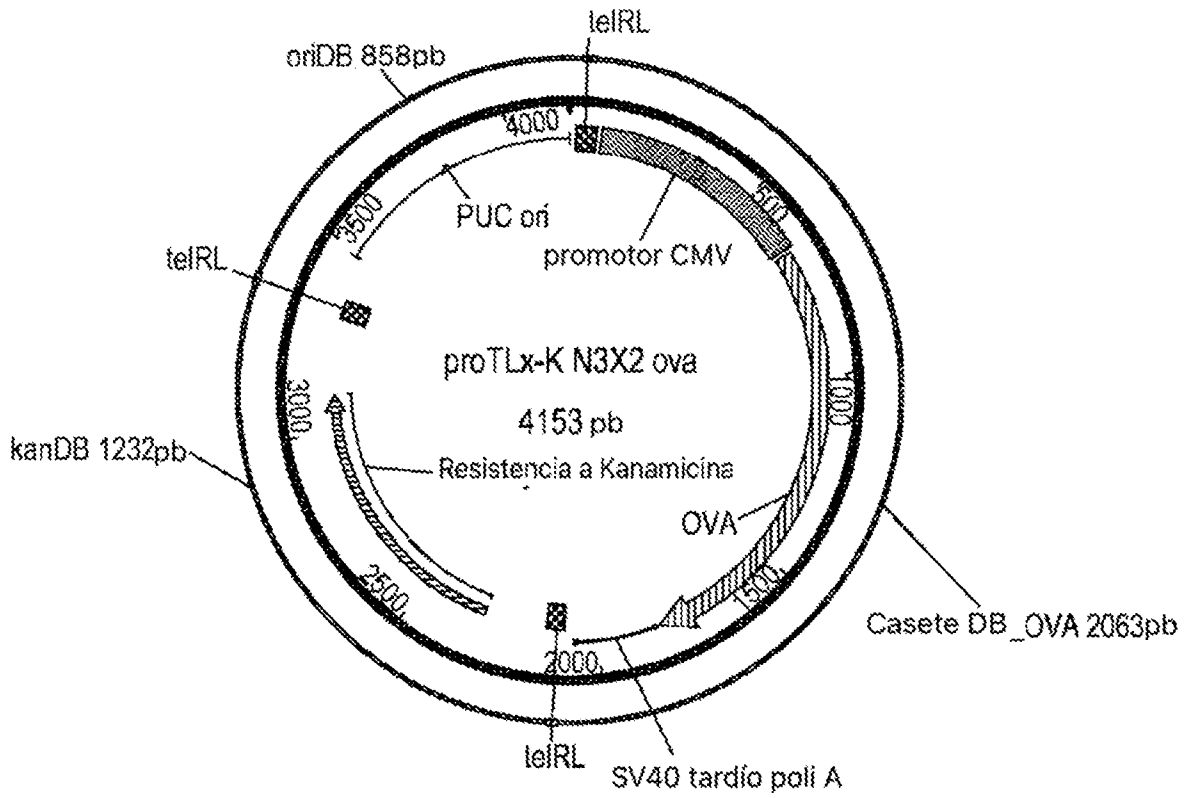


Fig. 11

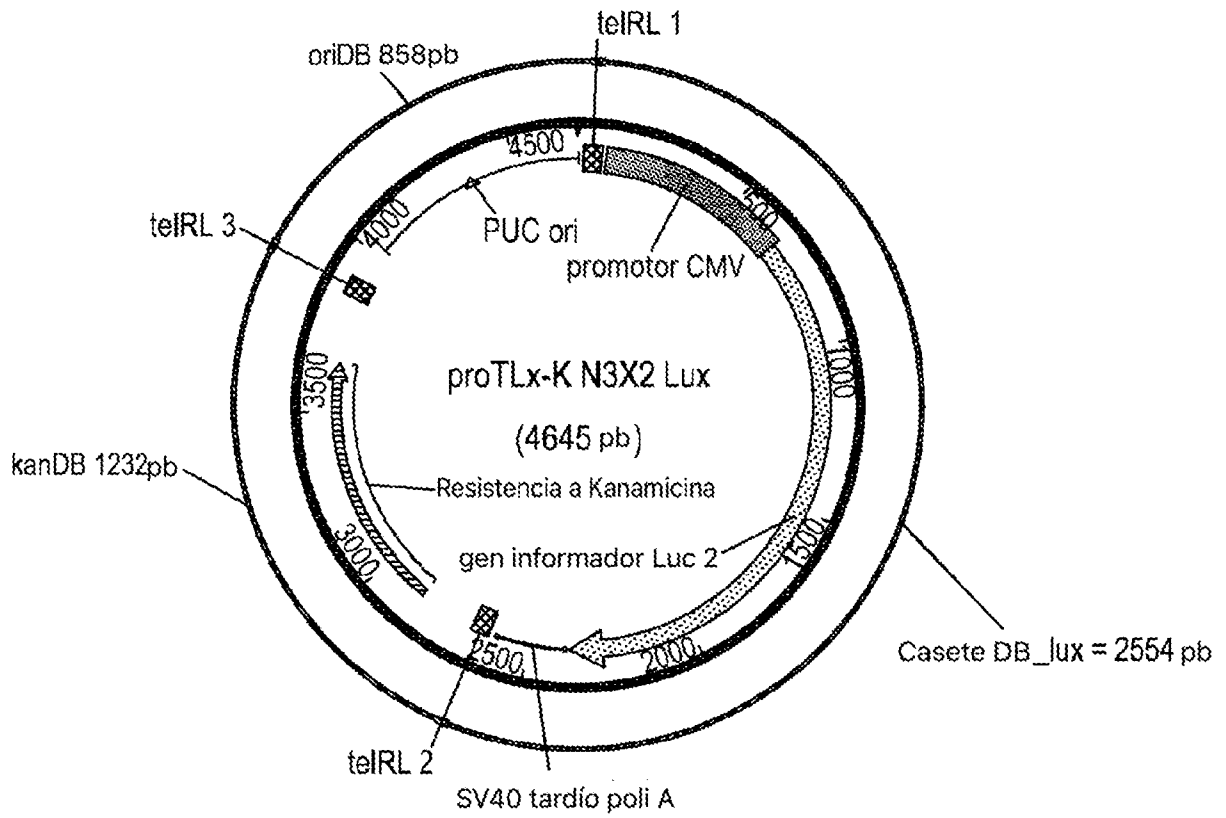


Fig. 12

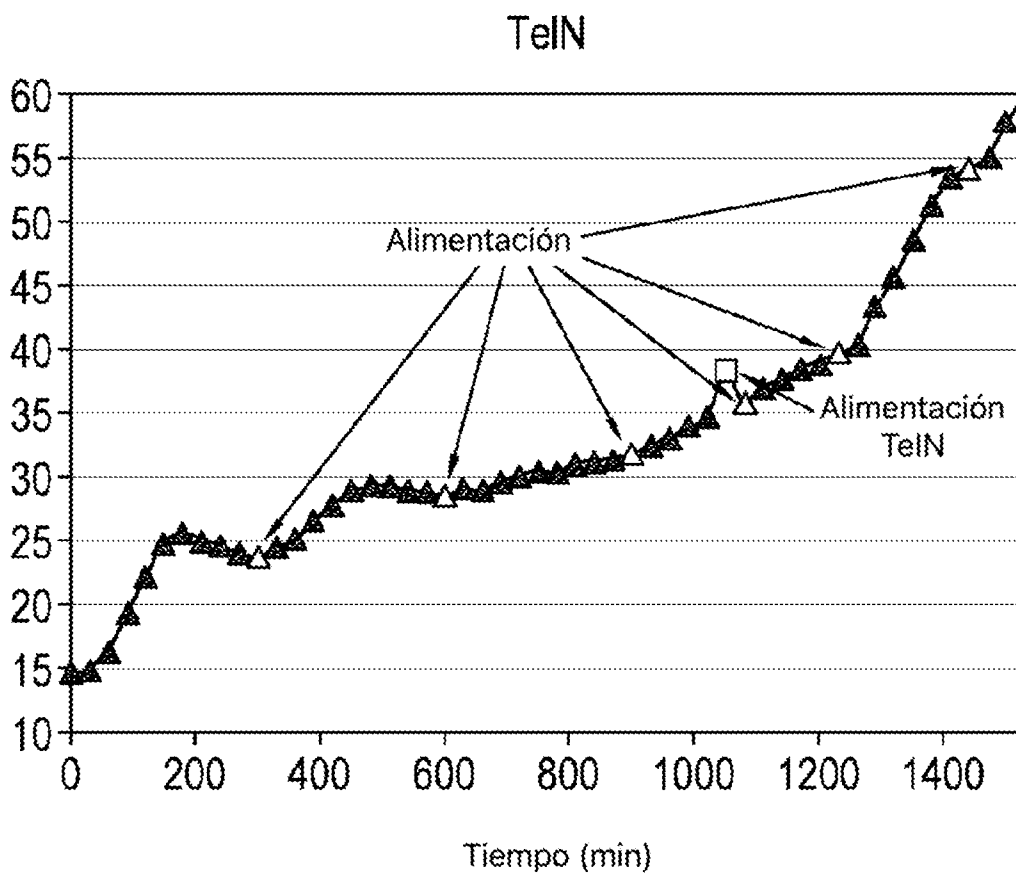


Fig. 13