



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021002764-5 A2



(22) Data do Depósito: 16/08/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 20/07/2021

(54) **Título:** PROCESSO LIVRE DE CÉLULAS PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA, USO DE SAIS DE NUCLEOTÍDEOS, MÉTODO E MÉTODO LIVRE DE CÉLULAS PARA AMPLIFICAR UM MODELO DE DNA, E, SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA

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

(30) **Prioridade Unionista:** 17/08/2018 GB 1813429.6.

(71) **Depositante(es):** TOUCHLIGHT IP LIMITED.

(72) **Inventor(es):** NEIL PORTER; PAUL JAMES ROTHWELL; STEFANIE GEHRIG-GIANNINI; ANNA BABULA; THOMAS ANTONY JAMES ADIE.

(86) **Pedido PCT:** PCT GB2019052307 de 16/08/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/035698 de 20/02/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 12/02/2021

(57) **Resumo:** PROCESSO LIVRE DE CÉLULAS PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA, USO DE SAIS DE NUCLEOTÍDEOS, MÉTODO E MÉTODO LIVRE DE CÉLULAS PARA AMPLIFICAR UM MODELO DE DNA, E, SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA. A presente invenção se refere a um processo melhorado para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), em particular a síntese enzimática de DNA livre de células, de preferência em grande escala, com um rendimento melhorado e/ou com uma eficiência melhorada. A espécie do cátion presente no sal de nucleotídeo como o contraíon é crítica para o rendimento, eficiência e fidelidade da reação de síntese enzimática de DNA de alto rendimento. Os processos no presente documento usam cátions alternativos como contraíons para os nucleotídeos iônicos, permitindo o uso de concentrações maiores de nucleotídeos na síntese de DNA e, ainda, permitindo que condições de reação mais favoráveis sejam usadas.

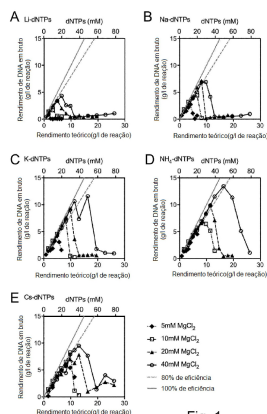


Fig. 1

PROCESSO LIVRE DE CÉLULAS PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA, USO DE SAIS DE NUCLEOTÍDEOS, MÉTODO E MÉTODO LIVRE DE CÉLULAS PARA AMPLIFICAR UM MODELO DE DNA, E, SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA

CAMPO

[001] A presente invenção refere-se a um processo melhorado para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), em particular a síntese enzimática de DNA livre de células, de preferência em grande escala, com um rendimento melhorado e/ou com uma eficiência melhorada.

FUNDAMENTOS

[002] A amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) pode ser realizada através do uso de processos com base em células, como por cultura de bactérias que propagam DNA para ser amplificado em fermentadores. Processos enzimáticos livres de células para amplificação de DNA a partir de um modelo inicial também foram descritos, incluindo a reação em cadeia da polimerase e reações de deslocamento de filamento.

[003] No passado, a amplificação de DNA em uma escala de teste era realizada usando aparelhos com base em placas de microtitulação e pipetas controladas por robôs para adicionar componentes de reação conforme necessário. Tais aparelhos e processos são adequados para a fabricação de pequenas quantidades de DNA para fins de teste, mas não proveem quantidades suficientes para outros fins. A amplificação em grande escala e a fabricação de ácidos nucleicos e proteínas específicas têm sido realizadas principalmente por meio de processos com base em células. Esses métodos são, no geral, eficazes para a produção de grandes volumes de produto, mas de configuração dispendiosa. Além disso, é preferencial sintetizar DNA em um ambiente livre de células para fins clínicos e terapêuticos.

[004] A síntese de DNA em larga escala usando síntese química, como métodos de fosforamidita, é conhecida, mas possui desvantagens. A

reação, no geral, deve ser realizada em solventes orgânicos, muitos dos quais são tóxicos ou perigosos. Outra desvantagem da síntese química é que a mesma não é completamente eficiente, uma vez que após cada adição de nucleotídeo, alguma porcentagem das cadeias de oligonucleotídeos em crescimento são terminadas, resultando em uma perda de rendimento. A perda de rendimento total para a cadeia de nucleotídeos sendo sintetizada aumenta assim com cada nucleotídeo adicionado à sequência. Esta ineficiência inerente na síntese química de oligonucleotídeos, em última análise, limita o comprimento do oligonucleotídeo que pode ser eficientemente produzido em oligonucleotídeos com 50 resíduos de ácido nucleico ou menos e, além disso, afeta a precisão da síntese.

[005] Até o momento, os catalisadores biológicos, como a polimerase, não têm sido rotineiramente explorados para a fabricação em escala industrial de produtos de DNA *in vitro* e as reações têm sido amplamente limitadas a volumes em escala de microlitros. Aumentar a escala de processos usando a síntese enzimática de DNA tem se mostrado problemático, especialmente com o rendimento decepcionante do produto de DNA.

[006] Os presentes requerentes abordaram anteriormente a capacidade de aumento de escala usando nucleotídeos disponíveis comercialmente. Foi desenvolvido um novo processo que envolveu a adição de nucleotídeos novos à mistura de reação conforme os mesmos se esgotavam ou quando a concentração do produto atingia um limite, conforme descrito no documento WO2016/034849, aqui incorporado a título de referência. No entanto, foi estabelecido que rendimentos ainda maiores poderiam ser alcançados e os inventores desenvolveram um novo método aqui descrito para aprimorar ainda mais o rendimento da síntese enzimática de DNA.

[007] A síntese enzimática de DNA, no geral, requer o uso de uma polimerase ou enzima semelhante a polimerase para catalisar a adição de

nucleotídeos a uma cadeia de ácido nucleico nascente. No geral, é necessário um DNA modelo que é amplificado na reação. No entanto, também é possível realizar a síntese de DNA livre de modelo, onde a incorporação acontece *de novo*.

[008] É importante notar que, devido à natureza altamente carregada dos ácidos nucleicos, os mesmos estão constantemente circundados por contraíons para neutralizar a maioria de suas cargas para diminuir a repulsão eletrostática entre as seções da sequência, para que possam ser condensados em estruturas compactas e organizadas na célula. Os blocos de construção dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos, também são uma espécie iônica e requerem a presença de contraíons positivos para manter a neutralidade elétrica. A maioria, senão todos, os nucleotídeos são fornecidos como sais com um contraíon positivo. Uma vez que o nucleotídeo tem quatro cargas negativas, os sais são tipicamente preparados com 2 cátions divalentes ou 4 cátions monovalentes. Será evidente para os especialistas na técnica que assim que um sal de nucleotídeo é disperso em água ou outro solvente, o sal pode se dissociar em solução em componentes aniônicos e catiônicos.

[009] Em geral, os nucleotídeos são fornecidos para a síntese, amplificação ou sequenciamento de DNA como um sal de lítio ou sódio. O lítio é, no geral, preferencial, uma vez que esses sais oferecem maior solubilidade e também estabilidade a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento do que os sais de sódio e permanecem estéreis devido à atividade bacteriostática do lítio em relação a vários microrganismos, dando maior confiabilidade e uma vida útil estendida. A utilização destes sais é tão rotineira que os especialistas na técnica não parecem questionar o contraíon presente com o nucleotídeo. De fato, todos os nucleotídeos usados nos Exemplos do documento WO2016/034849 são sais de lítio de nucleotídeos, uma vez que estes são comercializados como a escolha superior para aqueles versados na técnica.

[0010] Os presentes inventores descobriram que a espécie de cátion presente no sal de nucleotídeo como o contraíon é, no entanto, crítica para o rendimento, eficiência e fidelidade da reação de síntese enzimática de DNA de alto rendimento. Isto é bastante inesperado, uma vez que os nucleotídeos comercialmente disponíveis estão, no geral, disponíveis apenas como sais de lítio ou sódio. No entanto, o uso de cátions alternativos como contraíons para os nucleotídeos iônicos pode ter um grande impacto na reação de síntese de DNA, como pode ser visto a partir dos Exemplos aqui incluídos. Tal efeito é surpreendente e inesperado, uma vez que desafia a compreensão convencional do uso de sais de nucleotídeo e necessita do projeto e produção de novos dNTPs de sal de contraíons para realizar os Exemplos.

SUMÁRIO

[0011] A presente invenção se refere a um processo para a produção livre de células ou síntese de DNA. O processo pode permitir a produção aprimorada de DNA em comparação com as metodologias atuais, ou seja, um rendimento maior ou maior, um processo mais eficiente ou a capacidade de realizar a síntese enzimática de DNA em um ambiente com menos componentes adicionais do que se pensava possível sob as metodologias atuais. Isso aumenta significativamente a produtividade ao mesmo tempo que reduz o custo de síntese de DNA, especialmente em grande escala.

[0012] Em geral, a presente invenção refere-se à síntese enzimática de DNA usando uma enzima polimerase ou outra enzima de síntese de DNA, qualquer uma das quais pode ser opcionalmente projetada para lhe gerar propriedades particulares.

[0013] A presente invenção refere-se, no geral, a métodos isotérmicos de amplificação de DNA que não requerem que a temperatura seja ciclada por meio de aquecimento e resfriamento durante a amplificação, mas podem permitir o uso de calor para desnaturar inicialmente o modelo de DNA. A invenção refere-se preferencialmente ao uso de enzimas polimerase que são

capazes de replicar um modelo de DNA via replicação de deslocamento de filamento, independentemente ou com a ajuda de outras enzimas.

[0014] Os processos da invenção envolvem o uso de nucleotídeos na forma de sais. Os sais incluem um contraíon positivo (cátion). É preferível que este contraíon seja um cátion monovalente, ou seja, ele tenha uma única carga positiva devido à perda de um elétron. A fim de aumentar o rendimento e/ou eficiência da síntese de DNA, os cátions monovalentes não podem ser exclusivamente de sódio ou íons de lítio ou uma mistura dos mesmos, mas pelo menos uma porção dos cátions terá um raio iônico maior que o do sódio íon. A presença de uma razão de sódio ou lítio nos sais ou no processo em geral pode ser tolerada, mas é preferencial que o sal compreenda cátions monovalentes com um raio iônico maior do que o do íon de sódio. Será entendido que como um nucleotídeo tem quatro cargas negativas, em geral quatro cátions monovalentes estarão presentes no sal para manter a neutralidade elétrica.

[0015] Desta maneira, é provido um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA compreendendo o uso de nucleotídeos fornecidos como sais, em que os ditos sais compreendem um cátion monovalente com um raio iônico que é maior que o do íon de sódio.

[0016] Desta maneira, é provido um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA que compreende o uso de nucleotídeos na forma de sais, em que os ditos sais compreendem cátions monovalentes com um raio iônico que é maior do que o do íon de sódio.

[0017] É preferencial que a síntese enzimática de DNA seja para a fabricação de DNA em uma escala maior, isto é, para uso terapêutico ou profilático, em vez de amplificação em escala de laboratório. É nesta ampliação da amplificação em escala de laboratório que os presentes inventores descobriram que não é tão simples quanto prover mais substrato e outros componentes e descobrir que o rendimento segue o exemplo. Para os

sais de nucleotídeos com sódio e lítio, os mesmos foram considerados inibidores para as enzimas de síntese de DNA em concentrações mais altas. Os presentes inventores encontraram formas alternativas de contornar esta inibição. A presente invenção permite que a configuração da reação seja alterada e, portanto, o uso de sais de nucleotídeos em uma concentração igual ou superior a 10 mM. Assim, o processo compreende a utilização de sais de nucleotídeos em uma concentração igual ou superior a 10 mM, sendo a dita concentração determinada quando os nucleotídeos são adicionados. A concentração é determinada na mistura de reação em que o processo é realizado. Assim, a concentração dos nucleotídeos é determinada na mistura de reação no momento em que os nucleotídeos são adicionados. A concentração é, portanto, a concentração inicial ou concentração no início do processo.

[0018] Desta maneira, é provido um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA compreendendo o uso de nucleotídeos fornecidos como sais a uma concentração de pelo menos 10 mM, em que os ditos sais compreendem um cátion monovalente com um raio iônico que é maior do que o do íon de sódio.

[0019] Desta maneira, é provido um processo livre de células para a síntese de DNA enzimático compreendendo o uso de nucleotídeos na forma de sais a uma concentração de pelo menos 10 mM, em que os ditos sais compreendem um cátion monovalente com um raio iônico que é maior do que o do íon de sódio.

[0020] Qualquer sal de nucleotídeo como descrito aqui pode ter até quatro cátions monovalentes presentes para manter a neutralidade elétrica.

[0021] Além disso, é possível usar misturas de sais de nucleotídeos na síntese enzimática de DNA ou processo livre de células.

[0022] Desta maneira, é provido um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA compreendendo o uso de nucleotídeos fornecidos

como sais, em que os ditos nucleotídeos estão:

(a) na forma de um sal com um único cátion monovalente cujo raio iônico é maior do que aquele do íon de sódio, ou

(b) na forma de sais com 2 ou mais cátions monovalentes diferentes, em que pelo menos um dos cátions tem um raio iônico maior do que aquele do íon de sódio.

[0023] Os nucleotídeos neste aspecto podem ser providos em uma concentração maior do que 10 mM. Desta maneira, é provido um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA compreendendo o uso de nucleotídeos na forma de sais, em que os nucleotídeos estão:

(a) na forma de um sal com um único cátion monovalente cujo raio iônico é maior do que aquele do íon de sódio, ou

(b) na forma de sais com 2 ou mais cátions monovalentes diferentes, em que pelo menos um dos cátions tem um raio iônico maior do que aquele do íon de sódio.

[0024] Os nucleotídeos neste aspecto estão presentes em uma concentração maior do que 10 mM.

[0025] Tal como aqui utilizado, “cátion monovalente único” significa uma única espécie de cátion monovalente, da qual pode haver até quatro usadas para contrabalançar a carga negativa no íon nucleotídeo.

[0026] Em alternativa, é provido:

Um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de nucleotídeos na forma de sais, em que os ditos sais estão presentes em uma concentração de pelo menos 10 mM e estão:

(a) na forma de um sal que compreende um único cátion monovalente cujo raio iônico é maior do que aquele do íon de sódio, ou

(b) na forma de dois ou mais sais, sendo que cada sal compreende cátions monovalentes diferentes, em que pelo menos um dos

cátions tem um raio iônico maior do que aquele do íon de sódio.

[0027] A síntese enzimática de DNA pode envolver qualquer enzima capaz de sintetizar DNA, incluindo uma polimerase ou uma polimerase modificada. A polimerase pode ser de qualquer uma das famílias conhecidas de DNA polimerase, incluindo as famílias A, B, C, D, X, Y e RT. Um exemplo de uma DNA polimerase da família X é a desoxinucleotidil transferase terminal.

[0028] A síntese enzimática de DNA pode ocorrer *de novo* sem o uso de um modelo.

[0029] A síntese enzimática de DNA pode envolver um modelo, como um modelo de DNA.

[0030] A síntese enzimática de DNA pode ocorrer em uma mistura de reação, compreendendo os componentes aqui descritos.

[0031] Alternativamente escrito, é provido um processo livre de células para sintetizar DNA que compreende o contato de um modelo de DNA com pelo menos uma polimerase na presença de um ou mais nucleotídeos na forma de um sal para formar uma mistura de reação, em que os ditos nucleotídeos estão presentes em uma concentração de pelo menos 10 mM e estão:

(a) na forma de um sal com um único cátion monovalente cujo raio iônico é maior do que aquele do íon de sódio, ou

(b) na forma de sais com 2 ou mais cátions monovalentes diferentes, em que pelo menos um dos cátions tem um raio iônico maior do que aquele do íon de sódio.

[0032] Em alternativa, os sais de nucleotídeos incluem cátions monovalentes que não são exclusivamente de sódio ou lítio, mas uma razão significativa são sais de nucleotídeos que incluem cátions com um raio iônico maior do que o do íon de sódio. Desta maneira, é provido um processo livre de células para sintetizar DNA compreendendo o contato de um modelo de

DNA com pelo menos uma polimerase na presença de um ou mais nucleotídeos na forma de um sal com um cátion monovalente para formar uma mistura de reação, em que os ditos nucleotídeos são presentes em uma concentração de pelo menos 10 mM e não são exclusivamente de sódio ou lítio.

[0033] É preferencial que quando a concentração do nucleotídeo ou sal de nucleotídeo é referida, esta seja a concentração de nucleotídeo (ou sal do mesmo) quando o processo começa, isto é, a concentração inicial ou inicial de nucleotídeo (ou sal de nucleotídeo). Assim, é a concentração após a adição à mistura de reação. Será reconhecido que a adição de outros componentes pode ser feita durante o processo; tais adições podem diluir a concentração dos nucleotídeos/sais de nucleotídeos, a menos que outros nucleotídeos sejam fornecidos para reabastecer a concentração. Além disso, uma vez que os nucleotídeo/sais de nucleotídeo serão usados ou consumidos pelo processo, isto é, a reação de síntese de DNA, a concentração dos nucleotídeo/sais de nucleotídeo cairá conforme o processo progride. Em certas modalidades, outros nucleotídeos/sais de nucleotídeos podem ser adicionados conforme o processo avança, a fim de reabastecer os substratos para a reação enzimática.

[0034] Os inventores descobriram surpreendentemente que se os sais de nucleotídeos incluem cátions monovalentes com um raio iônico maior do que o do íon de sódio, a necessidade de um cátion divalente na síntese é reduzida. A convenção dita, por exemplo, que o magnésio (um cátion divalente) está presente nas reações de síntese de DNA a uma razão mínima de pelo menos 1:1 com os sais de nucleotídeo. Isso ocorre em virtude de o magnésio ser necessário no local ativo de algumas enzimas da polimerase; pode formar um complexo com o nucleotídeo antes da incorporação e ainda pode formar seu próprio sal com as espécies iônicas de fosfato liberadas durante a síntese de DNA. No entanto, sob certas condições, os presentes inventores desenvolveram um método em que a necessidade de magnésio ou

outros cátions divalentes é muito reduzida. Isso é importante, pois a redução dos componentes incluídos na síntese do DNA reduz notavelmente os custos, mas, além disso, uma concentração mais elevada de magnésio está relacionada a uma fidelidade diminuída na síntese do DNA.

[0035] Os cátions divalentes podem compreender um ou mais metais selecionados da lista que consiste em: Mg^{2+} , Be^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , preferencialmente Mg^{2+} ou Mn^{2+} . A razão entre os cátions metálicos e os sais de nucleotídeo pode ser de cerca de 1:1 na mistura de reação. Razões inferiores a 1:1 são desejáveis e preferíveis na síntese de DNA, uma vez que razões superiores a 1:1 podem levar a alguma infidelidade na síntese de DNA. Os cátions divalentes podem ser providos para a síntese enzimática de DNA na forma de qualquer sal adequado.

[0036] A invenção, portanto, também se refere a uma síntese de DNA enzimática que é realizada em condições de cátions divalentes reduzidos, compreendendo o uso de sais de nucleotídeos com um cátion monovalente ou cátions com um raio iônico maior do que o do íon de sódio. Reduzido neste contexto é em comparação com uma reação idêntica onde os íons de lítio ou sódio estão presentes no sal de nucleotídeo.

[0037] Os inventores descobriram surpreendentemente que a utilização de sais de nucleotídeos com contraíons alternativos, tais como íons de amônio e céσιο, nos processos da invenção reduz a necessidade de agentes tamponantes serem incluídos na síntese enzimática de DNA. Isso novamente é vantajoso, uma vez que reduz o custo da reação de síntese e pode ser benéfico para a síntese de DNA para uso terapêutico.

[0038] Além disso, o método desenvolvido aqui pelos presentes inventores pode ser realizado em uma grande variedade de condições em relação aos outros componentes presentes. Estas condições variam de um nível convencional de tamponamento à provisão de nenhum agente tamponante adicional, realizando efetivamente a reação com os componentes

necessários em água. Os componentes necessários podem incluir a enzima de síntese de DNA, ou seja, uma polimerase, os sais de nucleotídeo e um cátion divalente (como um sal), com componentes adicionais opcionais necessários dependendo das condições da reação, selecionados a partir de um modelo, um agente desnaturante, uma pirofosfatase ou um ou mais iniciadores. Esses componentes podem formar a mistura de reação.

[0039] Assim, a provisão ao processo, ou seja, a mistura de reação, de pelo menos uma razão de nucleotídeos como sais com um contraíon positivo monovalente (cátion) com um raio iônico maior do que o do íon de sódio é vantajoso, uma vez que isso permite surpreendentemente para rendimento de DNA melhorado e/ou uma eficiência melhorada de conversão dos nucleotídeos em DNA. Estas melhorias podem ser comparadas a uma mistura de reação análoga onde todos os nucleotídeos são fornecidos como sais convencionais sozinhos, por exemplo, apenas como sais de lítio ou sódio, ou uma mistura desses dois íons. A provisão de diferentes sais de nucleotídeos para aqueles convencionalmente usados tem algumas outras vantagens surpreendentes, como a capacidade de diminuir a concentração de agentes tamponantes na mistura de reação, em algumas instâncias, para zero, e para diminuir a necessidade de um cofator de cátion divalente para a mistura de reação, mais notavelmente magnésio.

[0040] Em um aspecto, um modelo direciona a síntese enzimática de DNA nos processos. Este modelo pode ser um modelo de DNA. A amplificação do modelo é preferencialmente por deslocamento da cadeia. A amplificação do modelo é preferencialmente isotérmica, isto é, não há necessidade de alternar entre temperaturas baixas e altas para progredir a amplificação. Neste cenário, o calor pode ser usado no início para desnaturar o modelo, se necessário, ou o modelo pode ser desnaturado por meios químicos. No entanto, uma vez que o modelo foi desnaturado, se apropriado, para permitir que quaisquer primers entrem entre o modelo de filamento

duplo, a temperatura pode ser mantida em uma faixa de temperaturas que não afetam a desnaturação do modelo e do produto. As condições de temperatura isotérmica exigem que a reação não seja aquecida a um ponto em que o modelo e os produtos se desnaturem (em comparação com a PCR, que requer ciclos de calor para desnaturar o modelo e o produto)., no geral, essas reações são realizadas a uma temperatura constante, dependendo da preferência da própria enzima. A temperatura pode ser qualquer temperatura adequada para a enzima.

[0041] O processo livre de células envolve preferencialmente a amplificação do modelo por meio da replicação de deslocamento de filamento. Esta síntese libera um DNA de filamento simples, que por sua vez pode ser copiado em DNA de filamento duplo, usando a polimerase. O termo deslocamento de filamento descreve a capacidade de deslocar o DNA a jusante encontrado durante a síntese, em que a polimerase abre o DNA de filamento duplo para estender a filamento simples nascente. As polimerases de DNA com vários graus de atividade de deslocamento de filamento estão disponíveis comercialmente. Alternativamente, o deslocamento da filamento pode ser alcançado fornecendo uma DNA polimerase e uma helicase separada. As helicases replicativas podem abrir o DNA duplex e facilitar o avanço da polimerase de filamento principal.

[0042] Independentemente, os recursos opcionais de qualquer aspecto da invenção podem ser: O modelo pode ser circular. A amplificação por deslocamento de filamento do dito modelo de DNA pode ser realizada por amplificação por círculo rolante (RCA). A polimerase pode ser Phi29 ou uma variante da mesma. A amplificação do DNA pode ser uma amplificação isotérmica, ou seja, a uma temperatura constante. O um ou mais primers podem ser primers aleatórios. Um par ou conjunto de primers pode ser usado. O DNA sintetizado pode compreender concatêmeros compreendendo unidades em tandem de sequência de DNA amplificada a partir do modelo de

DNA. O modelo de DNA pode ser um DNA linear fechado; de preferência, o modelo de DNA é incubado em condições desnaturantes para formar um DNA de cadeia simples circular fechado.

[0043] A quantidade de DNA que pode ser sintetizada é igual ou superior a 3 g por litro de mistura de reação, nomeadamente 16 g/l ou mais, de preferência até 30 g/l e além.

[0044] A quantidade de DNA que pode ser sintetizada pode exceder 60% do rendimento máximo calculado para a mistura de reação. De preferência, a quantidade de DNA que pode ser sintetizada pode exceder 80% do rendimento máximo calculado. O rendimento máximo calculado é baseado no rendimento teórico caso todos os nucleotídeos sejam incorporados em um produto, e isso pode ser calculado por aqueles versados na técnica.

[0045] A eficiência da síntese de DNA a partir dos nucleotídeos (ou sais de nucleotídeos) pode ser descrita como a porcentagem de nucleotídeos ou seus sais fornecidos à mistura de reação que são incorporados com sucesso em um produto ao longo do curso da reação.

[0046] O processo livre de células requer pelo menos um nucleotídeo. Um ou mais nucleotídeos adicionais podem então ser adicionados. Os nucleotídeos ou outros nucleotídeos são desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs), ou um derivado ou uma versão modificada dos mesmos. Os nucleotídeos ou outros nucleotídeos são um ou mais de desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxiguanosina trifosfato (dGTP), desoxicitidina trifosfato (dCTP), desoxitimidina trifosfato (dTTP) e seus derivados. Os nucleotídeos ou outros nucleotídeos são providos como seus sais. Cada sal de nucleotídeo individual pode compreender até quatro cátions monovalentes para manter a neutralidade elétrica. Os sais de nucleotídeos usados no processo podem incluir um ou mais cátions monovalentes, isto é, uma ou mais espécies de cátions monovalentes, e é preferível que a maioria, senão todos os ditos cátions monovalentes, tenham um raio iônico maior do que o

do íon de sódio. Será reconhecido que estes podem se dissociar em solução e, portanto, contribuir para a presença do cátion no processo.

[0047] É preferencial que a concentração de nucleotídeos ou seus sais no processo, isto é, na mistura de reação, possa ser maior do que 10 mM e até pelo menos 100 mM. Tais concentrações são importantes na produção de rendimentos mais elevados de DNA, que no caso das duas concentrações dadas podem ser tão altas quanto 3 g/l a 30 g/l. É preferencial que a concentração de nucleotídeo ou seus sais declarada esteja no início do processo, isto é, é a concentração inicial ou inicial de nucleotídeos ou seus sais na mistura de reação, que também inclui a enzima necessária para a síntese de DNA. A adição subsequente de outros componentes pode reduzir esta concentração, e seu uso pela enzima de síntese de DNA também reduzirá a concentração da concentração inicial. Os versados na técnica estarão cientes de como calcular a concentração de nucleotídeos/sais de nucleotídeos conforme o processo é preparado, com base no volume dos outros componentes e na solução/pó de sal de nucleotídeo usado.

[0048] Os termos nucleotídeo e sal de nucleotídeo são usados indistintamente na técnica, uma vez que todos os nucleotídeos são inerentemente fornecidos como sais.

[0049] O processo pode ser um processo em lote ou um processo de fluxo contínuo. O lote pode ser um lote fechado (ou seja, todos os componentes da reação são providos no início da síntese de DNA) ou outros componentes podem ser fornecidos à reação conforme necessário durante o processo, tal como descrito no documento WO2016/034849, aqui incorporado a título de referência. Caso sejam necessárias mais adições, isso irá diluir a concentração do nucleotídeo ou dos sais de nucleotídeo, a menos que mais sais de nucleotídeo sejam adicionados para reabastecer a concentração.

[0050] Os presentes inventores descobriram que cada um dos diferentes contraíons pode adicionar uma característica particular à reação de

síntese enzimática de DNA. Por exemplo, o uso de sais de nucleotídeos com íons de céσιο resulta na síntese enzimática de DNA na presença de níveis reduzidos de magnésio. Além disso, o uso de íons de amônio em sais de nucleotídeos resultou no uso de algumas altas concentrações de nucleotídeos, com os Exemplos mostrando a síntese de DNA em concentração de nucleotídeos de 80 mM.

[0051] Os inventores não estão cientes da utilização de vários destes cátions em sais de nucleotídeos anteriormente, sustentados pela falta de sua pronta disponibilidade de uma fonte comercial. Esses sais de nucleotídeos podem ser encomendados de fabricantes de nucleotídeos, se necessário.

[0052] Desta maneira, o uso de sais de nucleotídeos compreendendo qualquer um de céσιο, amônio, derivados de amônio ou cátions de rubídio na síntese enzimática livre de células de DNA faz parte da invenção. Assim, a utilização de sais de nucleotídeos compreendendo estes íons faz parte da invenção.

[0053] A síntese enzimática livre de células de DNA com tais íons pode ser realizada na presença de baixos níveis de cátion divalente, menos do que cerca de 1:1 de preferência em uma razão de 0,2:1 a 0,8:1 cátion divalente para nucleotídeo, de preferência 0,2:1 a 0,5:1. Os íons são o contraíon em um sal de nucleotídeo.

[0054] A síntese enzimática livre de células de DNA com tais íons pode ser realizada em agentes tamponantes mínimos, nos quais não são adicionados sais adicionais que mostraram aprimorar a síntese de DNA ou auxiliar na ligação do iniciador, ou detergentes. Este tampão mínimo pode compreender um agente (um agente tamponante) para estabilizar o pH. O agente tamponante mínimo pode conter uma quantidade muito pequena de cátions providos pela presença de um produto químico usado para desnaturar o modelo, como sódio, potássio ou hidróxido de amônio. Os íons são o contraíon em um sal de nucleotídeo.

[0055] Caso seja desejável um baixo nível de íons de magnésio na síntese enzimática de DNA, os inventores descobriram que um nucleotídeo confiável para tal síntese é um sal de nucleotídeo com íons de céσιο.

[0056] Desta maneira, a presente invenção provê uma síntese enzimática livre de células de DNA em que a manutenção de uma razão de íons divalentes para nucleotídeos de 0,5:1 ou inferior é necessária, compreendendo o uso de sais de nucleotídeos compreendendo íons de céσιο.

[0057] Outras vantagens são descritas abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0058] A presente invenção será descrita adicionalmente abaixo com referência a modalidades exemplificativas e os desenhos anexos, em que:

A Figura 1A a 1E são gráficos que mostram os resultados obtidos com experimentos usando-se concentrações iniciais variadas de sais de nucleotídeos com diferentes contraíons e diferentes concentrações iniciais/iniciativas de íons de magnésio (como $MgCl_2$) em uma reação de síntese de DNA. Cada gráfico mostra o rendimento de DNA em bruto obtido (g/l) versus o rendimento de DNA teórico (g/l) correspondente à concentração total de sal de nucleotídeo inicial/iniciativa (mM). Em todos os gráficos, a linha tracejada mostra 80% de eficiência de conversão dos sais de nucleotídeos em DNA, a linha sólida mostra 100% de eficiência de conversão. A Figura 1A representa os resultados da síntese de DNA obtidos usando lítio-dNTPs; Figura 1B os resultados alcançados com sódio-dNTPs, Figura 1C os resultados obtidos com potássio-dNTPs; Figura 1D os resultados alcançados com amônio-dNTPs e Figura 1E, os resultados quando se utiliza céσιο-dNTPs;

A Figura 2 é um gráfico que mostra dados de experimentos de síntese de DNA e é um gráfico da concentração de sal de dNTP (mM) que gerou rendimento máximo de DNA em bruto em relação a diferentes concentrações de reação de íons de magnésio. São mostrados os resultados

para sais de nucleotídeos usando: lítio, sódio, potássio, amônio e césio como contraíons. O gráfico é dividido em três seções, destacando os resultados em que a razão de íon de magnésio para sal de nucleotídeo é inferior a 0,5, uma seção em que a razão é 0,5 e 1 e uma seção final em que a razão excede 1. Também são mostrados os limites para essas seções - uma linha pontilhada indicando a razão de 0,5:1 e uma linha sólida indicando a razão de 1:1 do íon de magnésio para o nucleotídeo (dNTP);

A Figura 2 é um gráfico que mostra os dados obtidos a partir de experimentos de síntese de DNA. Nos exemplos, o rendimento de DNA foi medido para várias reações de síntese de DNA conduzidas com uma concentração inicial fixa de sais de nucleotídeo usando vários contraíons e concentrações crescentes de cloreto de magnésio. O gráfico mostra o rendimento de DNA em bruto (g/l) plotado contra a concentração de cloreto de magnésio para todos os sais de nucleotídeos testados;

A Figura 3 é um gráfico que mostra dados de reações de síntese de DNA usando amplificação por círculo rolante realizada em tampão mínimo usando concentrações iniciais variáveis de sais de nucleotídeo. O gráfico é o rendimento de DNA em bruto (g/l) versus as concentrações iniciais/iniciativas de sal de dNTP (mM);

A Figura 4 é um gráfico de experimentos de síntese de DNA usando amplificação por círculo rolante de um modelo de DNA, durante o qual foi testado se a presença de cátions monovalentes adicionais na mistura de reação teria um efeito na reação de síntese de DNA. Neste experimento, foram usados sais de nucleotídeo de amônio e sais de cloreto de cátion monovalentes como mostrado também foram incluídos na mistura de reação. A razão inicial entre sais de dNTP de amônio e sal de cloreto monovalente foi de 1:4; uma vez que um cátion monovalente foi provido para cada íon de amônio presente no dNTP (dos quais há quatro). Assim, a razão inicial entre íon de amônio (no sal de dNTP) e cátion monovalente é de 1:1. A

concentração inicial de magnésio também é variada, 5 mM, 10 mM, 20 mM e 40 mM correspondendo respectivamente às concentrações de 17,5 mM, 25 mM, 35 mM e 50 mM de dNTPs de contraíons de amônio mostrados na Figura. Representado graficamente é o rendimento de DNA em bruto para as concentrações indicadas de dNTPs de contraíons de amônio (NH_4 -dNTPs) na presença de sais de cloreto de contraíons de cátions monovalentes, incluindo lítio, sódio, potássio, amônio e césio, sendo o controle não adicional sal.

[0059] As Figuras 5a e 6b são os resultados de várias experiências de determinação de pH comparando o pH de uma mistura de reação sem polimerase, modelo e iniciador em várias concentrações iniciais de sais de nucleotídeo. São utilizadas concentrações iniciais variáveis de cloreto de magnésio (MgCl_2). Os gráficos mostram o pH medido em relação à concentração do sal de nucleotídeo na concentração inicial de cloreto de magnésio indicada. Nenhuma síntese de DNA ocorreu. A Figura 6a mostra um gráfico dos dados para césio-dNTPs e a Figura 6b mostra um gráfico dos dados para amônio-dNTPs; e

A Figura 7 é um mapa de plasmídeo proTL_x-K B5X4 LUX ST (AT) como usado nos Exemplos. São mostrados locais de processamento (TeIRL), gene repórter Luc 2, gene de resistência à canamicina, promotor CMV e pUC ori.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0060] A presente invenção refere-se a processos sem células para a síntese de DNA em grande escala. Os processos da invenção podem permitir uma síntese de alto rendimento de DNA.

[0061] O ácido desoxirribonucleico (DNA) sintetizado de acordo com a presente invenção pode ser qualquer molécula de DNA. O DNA pode ser de filamento simples ou duplo. O DNA pode ser linear. O DNA pode ser processado para formar círculos, particularmente minicírculos, círculos fechados de filamento simples, círculos fechados de filamento duplo, círculos

abertos de filamento duplo ou DNA de filamento duplo linear fechado. O DNA pode ser formado ou processado para formar uma estrutura secundária específica, como, mas não se limitando a laços em gancho (laços de haste), laços em grampo imperfeitos, pseudo-nós ou qualquer um dos vários tipos de hélice dupla (A-DNA, B-DNA ou Z-DNA). O DNA também pode formar grampos de cabelo e estruturas de aptâmeros.

[0062] O DNA sintetizado pode ter qualquer comprimento adequado. Comprimentos de até ou excedendo 77 quilobases podem ser possíveis usando os processos da invenção. Mais particularmente, o comprimento do DNA que pode ser sintetizado de acordo com os processos da invenção pode ser da ordem de até 60 quilobases, ou até 50 quilobases, ou até 40 quilobases, ou até 30 quilobases. De preferência, o DNA sintetizado pode ser de 100 bases a mais de 77 quilobases, 500 bases a 60 quilobases, 200 bases a 20 quilobases, mais preferencialmente 200 bases a 15 quilobases, mais preferencialmente 2 quilobases a 15 quilobases.

[0063] A quantidade de DNA sintetizado de acordo com os processos da presente invenção pode exceder 3 g/l. É preferencial que a quantidade de DNA sintetizado seja maior do que 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 g/l ou mais. Uma quantidade preferencial de DNA sintetizado é 5 g/l. A quantidade de DNA produzida pode ser descrita como quantidades industriais ou comerciais, em larga escala ou em produção em massa. O DNA produzido pelos processos da invenção pode ser uniforme em qualidade, nomeadamente no comprimento e na sequência do DNA. Os processos podem assim ser adequados para a síntese de DNA em grande escala. O processo pode ser uniforme em termos de fidelidade de síntese.

[0064] Alternativamente, a quantidade de DNA produzida na reação de síntese pode ser comparada com o rendimento máximo teórico que seria alcançado se 100% dos nucleotídeos fossem incorporados ao DNA

sintetizado. Os métodos da invenção não só melhoram o rendimento total obtido, mas também a eficiência do processo, o que significa que mais dos nucleotídeos fornecidos são incorporados no produto de DNA sintetizado do que nos métodos anteriores. Os rendimentos obtidos pelos métodos da invenção excedem 50% do máximo teórico, até e excedendo 90% do máximo teórico. Portanto, a razão do rendimento máximo teórico alcançado pelos métodos da invenção incluem 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e 95% ou mais. Convencionalmente, usando sais de nucleotídeos comercialmente disponíveis, os rendimentos alcançados podem ser decepcionantes, devido aos efeitos dos íons que podem ser inibidores do processo.

[0065] O DNA é sintetizado em uma reação enzimática. Esta síntese enzimática pode envolver a utilização de qualquer enzima de síntese de DNA, mais notavelmente uma enzima polimerase ou uma enzima polimerase modificada. Eles são discutidos mais adiante. A síntese de DNA pode ser *de novo* e não requer um modelo. A síntese enzimática também pode exigir o uso de um modelo para a síntese de DNA. Este modelo pode ser qualquer ácido nucleico adequado dependendo da polimerase, mas é preferencialmente um modelo de DNA.

[0066] O modelo pode ser qualquer modelo adequado, meramente provendo as instruções para a síntese do DNA incluindo uma sequência particular. O modelo pode ser de filamento simples (ss) ou duplo (ds). O modelo pode ser linear ou circular. O modelo pode incluir bases naturais, artificiais ou modificadas ou uma mistura das mesmas.

[0067] O modelo pode compreender qualquer sequência, derivada naturalmente ou artificial.

[0068] O modelo pode ter qualquer comprimento adequado. Particularmente, o modelo pode ter até 60 quilobases, ou até 50 quilobases, ou até 40 quilobases, ou até 30 quilobases. Preferencialmente, o modelo de DNA

pode ser de 10 bases a 100 bases, 100 bases a 60 quilobases, 200 bases a 20 quilobases, mais preferencialmente 200 bases a 15 quilobases, mais preferencialmente 2 quilobases a 15 quilobases.

[0069] O modelo pode ser provido em uma quantidade suficiente para uso no processo por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, o modelo pode ser produzido por PCR.

[0070] A totalidade ou uma porção selecionada do modelo pode ser amplificada no processo.

[0071] O modelo pode compreender uma sequência para expressão. O DNA pode ser para expressão em uma célula (ou seja, uma célula transfectada *in vitro* ou *in vivo*), ou pode ser para expressão em um sistema livre de células (ou seja, síntese de proteínas). A sequência para expressão pode ser para fins terapêuticos, isto é, terapia genética de uma vacina de DNA. A sequência de expressão pode ser um gene e o dito gene pode codificar uma vacina de DNA, uma proteína terapêutica e semelhantes. A sequência pode compreender uma sequência que é transcrita em uma forma de RNA ativa, isto é, uma pequena molécula de RNA interferente (siRNA).

[0072] Se necessário, o modelo pode ser contactado com pelo menos uma polimerase, conforme descrito abaixo.

[0073] A reação de síntese enzimática de DNA pode exigir pelo menos uma enzima de síntese de DNA. De preferência, a enzima é uma polimerase. As polimerases unem nucleotídeos para formar um polímero de DNA. Podem ser utilizadas uma, duas, três, quatro ou cinco enzimas e/ou polimerases diferentes. A polimerase pode ser qualquer polimerase adequada de qualquer família de polimerases, de modo que sintetize polímeros de DNA. A polimerase pode ser uma DNA polimerase. Qualquer DNA polimerase pode ser usada, incluindo qualquer DNA polimerase disponível comercialmente. Podem ser utilizadas duas, três, quatro, cinco ou mais DNA polimerases diferentes, por exemplo uma que provê uma função de revisão e

uma ou mais outras que não. As polimerases de DNA com mecanismos diferentes podem ser usadas, por exemplo, polimerases do tipo de deslocamento de filamento e polimerases de DNA que replicam DNA por outros métodos. Um exemplo adequado de uma DNA polimerase que não possui atividade de deslocamento de filamento é a T4 DNA polimerase. Podem ser utilizadas polimerases independentes de modelo, tais como transferases terminais.

[0074] As polimerases modificadas também podem ser usadas. Estes podem ter sido projetados para modificar suas características, como para remover sua dependência de um modelo, para alterar sua dependência de temperatura ou para estabilizar a enzima para uso *in vitro*.

[0075] Uma polimerase pode ser altamente estável, de modo que sua atividade não seja substancialmente reduzida por incubação prolongada sob condições de processo. Portanto, a enzima preferencialmente tem uma longa meia-vida sob uma faixa de condições de processo incluindo, mas não se limitando a temperatura e pH. É também preferencial que uma polimerase tenha uma ou mais características adequadas para um processo de fabricação. A polimerase tem preferencialmente alta fidelidade, por exemplo, por ter atividade de revisão. Além disso, é preferencial que uma polimerase exiba alta processabilidade, alta atividade de deslocamento de filamento e um baixo K_m para dNTPs e DNA. Uma polimerase pode ser capaz de usar DNA circular e/ou linear como modelo. A polimerase pode ser capaz de usar dsDNA ou ssDNA como modelo. É preferencial que uma polimerase não exiba atividade de exonuclease de DNA que não esteja relacionada à sua atividade de revisão.

[0076] O versado na técnica pode determinar se uma determinada polimerase exibe ou não as características definidas acima, por comparação com as propriedades exibidas pelas polimerases disponíveis comercialmente, por exemplo, Phi29 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, US), Deep Vent® (New England Biolabs, Inc.), *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNA

polimerase I (New England Biolabs, Inc.), fragmento Klenow da DNA polimerase I (New England Biolabs, Inc.), transcriptase reversa M-MuLV (New England Biolabs, Inc.), VentR® (exo-minus) DNA polimerase (New England Biolabs, Inc.), VentR® DNA polimerase (New England Biolabs, Inc.), Deep Vent® (exo-) DNA polimerase (New England Biolabs, Inc.) e fragmento grande da polimerase de DNA Bst (New England Biolabs, Inc.). Quando uma alta processabilidade é referida, isso normalmente denota o número médio de nucleotídeos adicionados por uma enzima polimerase por associação/dissociação com o modelo, isto é, o comprimento da extensão nascente obtida a partir de um único evento de associação.

[0077] As polimerases do tipo de deslocamento de cadeia são preferidas. As polimerases de tipo deslocamento de filamento preferidas são Phi29, Deep Vent e Bst DNA polimerase I ou variantes de qualquer uma delas. “Deslocamento de filamento” descreve a capacidade de uma polimerase de deslocar filamentos complementares ao encontrar uma região de DNA de filamento duplo durante a síntese. O modelo é, portanto, amplificado deslocando filamentos complementares e sintetizando uma nova filamento complementar. Assim, durante a replicação de deslocamento de filamento, uma filamento recém-replicada será deslocada para abrir caminho para a polimerase replicar uma outra filamento complementar. A reação de amplificação inicia quando um iniciador ou a extremidade livre 3' de um modelo de filamento simples se emparelha com uma sequência complementar em um modelo (ambos são eventos de iniciação). Quando a síntese de DNA prossegue e se encontra um outro iniciador ou outra filamento hibridizada com o modelo, a polimerase o desloca e continua seu alongamento da filamento. O deslocamento da filamento pode liberar DNA de filamento simples que pode atuar como um modelo para mais eventos de iniciação. O iniciação do DNA recém-liberado pode levar à hiper-ramificação e a um alto rendimento de produtos. Deve ser entendido que os métodos de amplificação

por deslocamento de filamento diferem dos métodos com base em PCR em que os ciclos de desnaturação não são essenciais para a amplificação de DNA eficiente, já que o DNA de filamento duplo não é um obstáculo para a síntese contínua de novos filamentos de DNA. A amplificação por deslocamento de cadeia pode requerer apenas uma rodada inicial de aquecimento, para desnaturar o modelo inicial se for de cadeia dupla, para permitir que o iniciador se emparelhe com o local de ligação do iniciador, se um iniciador for usado. Em seguida, a amplificação pode ser descrita como isotérmica, uma vez que não é necessário mais aquecimento ou resfriamento. Em contraste, os métodos de PCR requerem ciclos de desnaturação (ou seja, elevação da temperatura para 94 graus centígrados ou acima) durante o processo de amplificação para fundir o DNA de filamento duplo e prover novos modelos de filamento simples. Durante o deslocamento da filamento, a polimerase irá deslocar filamentos de DNA já sintetizado. Além disso, ele usará DNA recém-sintetizado como modelo, garantindo a amplificação rápida do DNA.

[0078] Uma polimerase de deslocamento de filamento usada em um processo da invenção preferencialmente tem uma processabilidade de pelo menos 20 kb, mais preferencialmente, pelo menos 30 kb, pelo menos 50 kb, ou pelo menos 70 kb ou mais. Em uma modalidade, a DNA polimerase de deslocamento de filamento tem uma processabilidade que é comparável a, ou maior do que a polimerase de DNA phi29.

[0079] A replicação por deslocamento de cadeia é, portanto, preferencial. Durante a replicação de deslocamento de filamento, o modelo é amplificado pelo deslocamento de filamentos já replicadas, que foram sintetizadas pela ação da polimerase, por sua vez, deslocando outra filamento, que pode ser a filamento complementar original de um modelo de filamento duplo ou um complemento recém-sintetizado filamento, esta última sintetizada pela ação de uma polimerase em um iniciador anterior renaturado

ao modelo. Assim, a amplificação do modelo pode ocorrer pelo deslocamento das filamentos replicadas por meio da replicação do deslocamento da filamento de outra filamento. Este processo pode ser descrito como amplificação por deslocamento de filamento ou replicação por deslocamento de filamento.

[0080] Um processo de replicação de deslocamento de filamento preferencial é a amplificação isotérmica mediada por loop ou LAMP. LAMP, no geral, usa 4 a 6 primers que reconhecem 6 a 8 regiões distintas do DNA modelo. Em resumo, uma DNA polimerase de deslocamento de filamento inicia a síntese e 2 dos iniciadores formam estruturas em alça para facilitar as rodadas subsequentes de amplificação. Um iniciador interno contendo sequências das cadeias com sentido e antissentido do DNA alvo inicia o LAMP. A seguinte síntese de DNA por deslocamento de filamento iniciada por um iniciador externo libera um DNA de filamento simples. Isso serve como modelo para a síntese de DNA iniciada pelos segundos primers internos e externos que hibridizam com a outra extremidade do alvo, que produz uma estrutura de DNA haste-loop. No ciclo LAMP subsequente, um iniciador interno hibridiza com a alça no produto e inicia a síntese de DNA por deslocamento, produzindo o DNA haste-alça original e um novo DNA haste-alça com uma haste duas vezes mais longa. Procedimentos LAMP modificados também podem ser adotados, onde menos primers internos são necessários.

[0081] Um processo de replicação de deslocamento de filamento preferencial é a amplificação por círculo rolante (RCA). O termo RCA descreve a capacidade das polimerases do tipo RCA de progredir continuamente em torno de um filamento de modelo de DNA circular enquanto estende um iniciador hibridizado. Isso leva à formação de produtos lineares de filamento simples com múltiplas repetições de DNA amplificado. A sequência do modelo circular (uma única unidade) é multiplicada

repetidamente dentro de um produto linear. Para um modelo circular, o produto inicial da amplificação por deslocamento de filamento é um concatâmero de filamento simples, que é sentido ou antissentido, dependendo da polaridade do modelo. Estes produtos lineares de filamento simples servem como base para eventos de hibridização múltipla, extensão de iniciador e deslocamento de filamento, resultando na formação de produtos concataméricos de DNA de filamento duplo, novamente compreendendo repetições múltiplas de DNA amplificado. Existem, portanto, várias cópias de cada DNA de “unidade única” amplificado nos produtos de DNA de filamento duplo concatamérica. As polimerases RCA são particularmente preferidas para uso nos processos da presente invenção. Os produtos dos processos de replicação de deslocamento de filamento do tipo RCA podem exigir processamento para liberar DNAs de unidade única. Isso é desejável se unidades únicas de DNA forem necessárias. As condições típicas de deslocamento da filamento usando a polimerase de DNA Phi29 incluem altos níveis de íons de magnésio, por exemplo, magnésio 10 mM (normalmente como um sal de cloreto) em combinação com nucleotídeos de 0,2 a 4 mM.

[0082] A fim de permitir a amplificação, de acordo com alguns aspectos, um ou mais iniciadores também podem ser necessários para a síntese enzimática de DNA. Se nenhum modelo for usado, os primers permitem um ponto de partida para a síntese de DNA e são projetados para iniciar a reação de síntese. Se um modelo for usado, os primers podem ser não específicos (ou seja, aleatórios em sequência) ou podem ser específicos para uma ou mais sequências compreendidas no modelo. Alternativamente, uma enzima primase pode ser fornecida para gerar o iniciador *de novo*. Se os primers forem de sequência aleatória, os mesmos permitem a iniciação não específica em qualquer local do modelo. Isso permite alta eficiência de amplificação por meio de múltiplas reações de iniciação de cada filamento modelo. Exemplos de iniciadores aleatórios são hexâmeros, heptâmeros,

octâmeros, nonâmeros, decâmeros ou sequências maiores em comprimento, por exemplo de 12, 15, 18, 20 ou 30 nucleotídeos de comprimento. Um iniciador aleatório pode ter de 6 a 30, 8 a 30 ou 12 a 30 nucleotídeos de comprimento. Os iniciadores aleatórios são tipicamente providos como uma mistura de oligonucleotídeos que são representativos de todas as combinações potenciais de, por exemplo, hexâmeros, heptâmeros, octâmeros ou nonâmeros no modelo.

[0083] Em uma modalidade, os primers ou um ou mais dos primers são específicos. Isso significa que os mesmos têm uma sequência que é complementar a uma sequência no modelo a partir da qual a iniciação da amplificação é desejada. Nesta forma de realização, um par de iniciadores pode ser usado para amplificar especificamente uma porção do modelo de DNA que é interno aos dois locais de ligação do iniciador. Alternativamente, um único iniciador específico pode ser usado. Um conjunto de primers pode ser empregado.

[0084] Os iniciadores podem ser qualquer composição de ácido nucleico. Os iniciadores podem não estar marcados ou podem compreender um ou mais marcadores, por exemplo, radionuclídeos ou corantes fluorescentes. Os iniciadores também podem compreender nucleotídeos modificados quimicamente. Por exemplo, o iniciador pode ser terminado para prevenir o início da síntese de DNA até que a terminação seja removida, isto é, por meios químicos ou físicos. Os comprimentos/sequências do iniciador podem ser tipicamente selecionados com base em considerações de temperatura, isto é, como sendo capaz de se ligar ao modelo na temperatura usada na etapa de amplificação.

[0085] Em certos aspectos, o contato do modelo com a polimerase e um ou mais iniciadores pode ocorrer sob condições que promovem a renaturação dos iniciadores ao modelo. As condições incluem a presença de ácido nucleico de filamento simples permitindo a hibridização dos

iniciadores. As condições convencionalmente também incluem uma temperatura e tampão permitindo a renaturação do iniciador ao modelo. As condições de emparelhamento/hibridação adequadas podem ser selecionadas dependendo da natureza do iniciador. Um exemplo de condições de desnaturação convencionais, que podem ser utilizadas na presente invenção, incluem um tampão compreendendo Tris-HCl a 30 mM pH 7,5, KCl a 20 mM, MgCl₂ a 8 mM. No entanto, os presentes inventores descreveram condições aqui com tampão reduzido e componentes de íons metálicos divalentes que ainda permitem a ligação do iniciador e estes são discutidos mais adiante. A renaturação pode ser realizada após desnaturação usando calor seguido de resfriamento gradual até a temperatura de reação desejada.

[0086] No entanto, a amplificação usando replicação de deslocamento de filamento também pode ocorrer sem um iniciador e, portanto, não requer hibridização e extensão do iniciador para ocorrer. Em vez disso, o modelo de filamento único se autoinicia formando grampos de cabelo, que têm uma extremidade 3' livre disponível para extensão. As etapas restantes da amplificação permanecem as mesmas.

[0087] O modelo e/ou polimerase também são colocados em contato com nucleotídeos, como sais de nucleotídeos. A combinação de modelo de DNA, polimerase e sais de nucleotídeo pode ser descrita como formando uma mistura de reação. A mistura de reação também pode compreender um ou mais primers ou um primase. A mistura de reação pode também incluir independentemente um ou mais cátions de metal divalente. A mistura de reação pode compreender ainda um desnaturante químico. Esses desnaturantes podem ser potássio, amônio ou hidróxido de sódio. A mistura de reação pode compreender ainda enzimas adicionais, tais como uma helicase ou uma pirofosfatase. A mistura de reação pode conter agentes tamponantes de pH e, em alguns aspectos, não contém agentes tamponantes de pH.

[0088] Um nucleotídeo é um monômero, ou unidade única, de ácidos nucleicos, e os nucleotídeos são compostos de uma base nitrogenada, um açúcar de cinco carbonos (ribose ou desoxirribose) e pelo menos um grupo fosfato. Qualquer nucleotídeo adequado pode ser usado.

[0089] Os nucleotídeos estão presentes como sais com cátions monovalentes. Os cátions monovalentes são espécies iônicas com uma única carga positiva e, portanto, no geral, até quatro estarão presentes em um sal de nucleotídeo. É preferencial que o cátion monovalente tenha um raio iônico maior do que o do íon de sódio. O raio iônico é o raio de um íon na estrutura cristalina iônica. Os raios iônicos são normalmente dados em unidades de picômetros (pm) ou angstroms (Å). O raio iônico não é uma propriedade fixa de um determinado íon, mas varia com vários parâmetros, incluindo número de coordenação e estado de spin. No entanto, os valores de raio iônico são suficientemente distintos para permitir que tendências periódicas sejam reconhecidas para íons atômicos, com raios iônicos aumentando ao descer um grupo da tabela periódica. Para o mesmo íon, o raio iônico aumenta com o aumento do número de coordenação, e um íon em um estado de spin baixo será menor do que o mesmo íon em um estado de spin alto. No geral, o raio iônico diminui com o aumento da carga positiva. Assim, quando o raio iônico é referido no presente documento, pode ser qualquer raio iônico possível desse íon. Raios iônicos exemplares são apresentados na Tabela 6.

[0090] Os nucleotídeos podem incluir sais de íons de metal monovalente, incluindo, mas não se limitando a metais alcalinos (grupo 1): lítio (Li^+), sódio (Na^+), potássio (K^+), rubídio (Rb^+), célio (Cs^+) ou frâncio (Fr^+). Alternativamente ou adicionalmente, o íon de metal monovalente pode ser um metal de transição (Grupo 11): cobre (Cu^+), prata (Ag^+), ouro (Au^+) ou roentgênio (Rg^+). Os metais alcalinos são preferenciais e, portanto, o contraíon preferencial pode ser potássio (K^+), rubídio (Rb^+), célio (Cs^+) ou frâncio (Fr^+).

[0091] Os nucleotídeos podem incluir sais de íons monovalentes poliatômicos. Um íon poliatômico é um íon que contém mais de um átomo. Isso diferencia os íons poliatômicos dos íons monoatômicos, que contêm apenas um átomo. Os cátions poliatômicos monovalentes exemplares incluem amônio (NH_4^+) e hidrônio (H_3O^+), em que o amônio é particularmente preferencial. O amônio tem um raio iônico maior do que o sódio em todas as condições. Derivados de amônio também estão incluídos, e uma lista exemplar destes inclui: monoalquilamônio, dialquilamônio, trialquilamônio, colina, amônio quaternário e imidazólio. Os versados na técnica estarão cientes de outros derivados de amônio que carregam uma única carga positiva que são apropriados para uso como um contraíon em um sal de nucleotídeo.

[0092] A base nitrogenada pode ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) e uracila (U). A base nitrogenada também pode ser bases modificadas, como 5-metilcitosina (m5C), pseudouridina (Ψ), dihidrouridina (D), inosina (I) e 7-metilguanossina (m7G). A base nitrogenada pode ainda ser uma base artificial. A concentração de sais de nucleotídeo pode incluir qualquer combinação das várias bases nitrogenadas.

[0093] É preferencial que o açúcar de cinco carbonos seja uma desoxirribose, de modo que o nucleotídeo seja um desoxinucleotídeo.

[0094] Os nucleotídeos podem estar na forma de trifosfato de desoxinucleosídeo, denominado dNTP. Esta é uma forma de realização preferencial da presente invenção. Os dNTPs adequados podem incluir dATP (trifosfato de desoxiadenosina), dGTP (trifosfato de desoxiguanosina), dTTP (trifosfato de desoxitimidina), dUTP (trifosfato de desoxiuridina), dCTP (trifosfato de desoxicitidina), diTP (trifosfato de desoxixinosina), dXTP (trifosfato de desoxiinosina) e suas versões derivadas e modificadas. É preferencial que os dNTPs compreendam um ou mais de dATP, dGTP, dTTP ou dCTP, ou versões modificadas ou seus derivados. É preferencial usar uma mistura de dATP, dGTP, dTTP e dCTP ou uma versão modificada dos

mesmos. Quaisquer razões adequadas desses dNTPs podem ser usadas, de acordo com as necessidades da reação.

[0095] Os nucleotídeos, ou sais de nucleotídeos, podem estar em solução ou podem precisar ser providos como um sólido, por exemplo, como um pó. Os nucleotídeos, ou sais de nucleotídeos, podem compreender nucleotídeos modificados. Os nucleotídeos, ou sais de nucleotídeos, podem ser fornecidos em uma mistura de uma ou mais bases adequadas, de preferência, uma ou mais de adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C). Dois, três ou de preferência todos os quatro nucleotídeos (A, G, T e C) são usados no processo para sintetizar DNA. Estes nucleotídeos, ou sais de nucleotídeos, podem estar todos presentes em quantidades substancialmente iguais, ou mais de um ou dois podem ser providos, dependendo da natureza do DNA a ser sintetizado.

[0096] Os nucleotídeos podem ser todos nucleotídeos naturais (ou seja, não modificados), os mesmos podem ser nucleotídeos modificados que agem como nucleotídeos naturais e são biologicamente ativos (ou seja, nucleotídeos LNA - ácido nucleico bloqueado), os mesmos podem ser modificados e biologicamente inativos ou podem ser uma mistura de nucleotídeos não modificados e modificados e/ou uma mistura de nucleotídeos biologicamente ativos e biologicamente inativos. Cada tipo (ou seja, base) de nucleotídeo pode ser provido em uma ou mais formas, ou seja, não modificado e modificado, ou biologicamente ativo e biologicamente inativo. Todos esses nucleotídeos são capazes de formar sais apropriados.

[0097] Em um aspecto da invenção, os nucleotídeos ou sais de nucleotídeos estão presentes em uma concentração de pelo menos 10 mM. De acordo com este aspecto, os nucleotídeos ou sais de nucleotídeos podem estar presentes na mistura de reação em uma concentração de mais de 10 mM, mais de 15 mM, mais de 20 mM, mais de 25 mM, mais de 30 mM, mais de 35 mM, mais de 40 mM, mais de 45 mM, mais de 50 mM, mais de 55 mM, mais de 60

mM, mais de 65 mM, mais de 70 mM, mais de 75 mM, mais de 80 mM, mais de 85 mM, mais de 90 mM, mais de 95 mM ou mais de 100 mM. Essas concentrações são dadas como a concentração de sal de nucleotídeo no início ou início do processo. A concentração é dada após a adição dos nucleotídeo/sais de nucleotídeo, em que a adição pode ser à mistura de reação. O sal de nucleotídeo pode ser qualquer mistura apropriada de sais de nucleotídeo, com bases nitrogenadas variáveis. A concentração aplica-se à soma total dos sais de nucleotídeos presentes no início do processo, qualquer que seja sua composição. Assim, por exemplo, uma concentração de 10 mM de sais de nucleotídeo pode ser qualquer mistura de dCTP, dATP, dGTP e dTTP contraionizado com cátions monovalentes apropriados.

[0098] Será entendido que os nucleotídeos fornecidos como sais podem se dissociar em água e outros solventes para formar uma entidade nucleotídica aniônica e um cátion.

[0099] É uma parte preferencial de qualquer aspecto da presente invenção que o sal de nucleotídeo seja formado por um contraíon que tem um raio iônico maior do que o do íon de sódio. No entanto, é provável que a polimerase ou enzima de síntese de DNA tolere alguma concentração de sais de nucleotídeo de lítio e/ou sódio. Assim, pode haver uma porção de sais de nucleotídeos incluídos nos processos da invenção em que o contraíon é sódio e/ou lítio. Esta porção é de preferência inferior a 25%, opcionalmente 20%, 15%, 10%, 5%, 1% ou menos. A polimerase ou enzima de síntese de DNA também pode tolerar sódio e/ou lítio de outras fontes, como o agente desnaturante. É preferencial que a concentração total de íons de lítio na mistura de reação não exceda 15 mM, preferencialmente 10 mM, ainda mais preferencialmente 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM ou menos. Uma vez que o lítio parece mais inibidor, é preferível que este íon seja substancialmente excluído da mistura de reação. No caso de íons de sódio, uma vez que o hidróxido de sódio é, no geral, usado como desnaturante, a

presença de íons de sódio pode ser tolerável.

[00100] Os sais de nucleotídeo usados nos processos das invenções podem, portanto, incluir uma mistura de diferentes sais de nucleotídeo, por exemplo, uma mistura de sais de nucleotídeo de potássio e sais de céσιο-nucleotídeo. Inúmeros sais diferentes podem ser usados. É preferencial que pelo menos 75% dos sais tenham contraíons com um raio iônico maior do que o do íon de sódio, opcionalmente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais. Pode ser desejável usar uma mistura de diferentes sais para maximizar o rendimento de DNA e utilizar as diferentes características dos vários contraíons. Alternativamente escrito, é provido um processo livre de células para sintetizar DNA compreendendo o contato de um modelo de DNA com pelo menos uma polimerase na presença de um ou mais nucleotídeos na forma de um sal para formar uma mistura de reação, em que os ditos nucleotídeos estão no forma de dois ou mais sais, cada sal compreendendo diferentes cátions monovalentes, em que pelo menos um dos cátions tem um raio iônico maior do que o do íon de sódio. Assim, dois ou mais sais de nucleotídeos diferentes podem ser usados nos processos da invenção, os ditos sais variando em virtude do uso de um contraíon diferente. Pode ser preferencial que todo o sal requeira o uso de um contraíon com um raio iônico maior do que o do íon de sódio.

[00101] A síntese enzimática de DNA pode ser mantida em condições que promovam a síntese de DNA, e isso dependerá do método particular selecionado.

[00102] A amplificação de um modelo por meio do deslocamento do filamento é preferencial. De preferência, as condições promovem a amplificação do dito modelo por deslocamento de filamentos replicadas através da replicação de deslocamento de filamento de outra filamento. As condições incluem o uso de qualquer temperatura que permita a amplificação do DNA, comumente na faixa de 20 a 90 graus centígrados. Uma faixa de

temperatura preferencial pode ser de cerca de 20 a cerca de 40 ou cerca de 25 a cerca de 35 graus centígrados. Uma temperatura preferencial para a amplificação LAMP é de cerca de 50 a cerca de 70 graus centígrados.

[00103] Normalmente, uma temperatura apropriada para a síntese enzimática de DNA é selecionada com base na temperatura na qual uma polimerase específica tem atividade ótima. Essa informação está comumente disponível e faz parte do conhecimento geral do especialista. Por exemplo, onde a polimerase de DNA phi29 é usada, uma faixa de temperatura adequada seria de cerca de 25 a cerca de 35 graus centígrados, preferencialmente cerca de 30 graus centígrados. No entanto, um phi29 termoestável pode operar a uma temperatura constante mais alta. O especialista seria rotineiramente capaz de identificar uma temperatura adequada para amplificação eficiente de acordo com os processos da invenção. Por exemplo, um processo pode ser realizado em uma faixa de temperaturas, e os rendimentos de DNA amplificado podem ser monitorados para identificar uma faixa de temperatura ideal para uma dada polimerase. A amplificação pode ser realizada a uma temperatura constante e é preferível que o processo seja isotérmico. Uma vez que a amplificação por deslocamento de filamento é preferencial, não há necessidade de alterar a temperatura para separar as filamentos de DNA. Assim, o processo pode ser um processo isotérmico.

[00104] Outras condições que promovem a síntese de DNA são convencionalmente consideradas como compreendendo a presença de agentes tamponantes/pH adequados e outros fatores que são necessários para o desempenho ou estabilidade da enzima. As condições convencionais adequadas incluem quaisquer condições utilizadas para prover atividade de enzimas polimerase conhecidas na técnica.

[00105] Por exemplo, o pH da mistura de reação pode estar dentro da faixa de 3 a 10, de preferência 5 a 8 ou cerca de 7, tal como cerca de 7,5. O pH pode ser mantido nesta faixa pelo uso de um ou mais agentes

tamponantes. Tais buffers incluem, mas não estão restritos a 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 sódio, ácido cítrico-citrato de sódio, acetato de sódio, ácido acético, imidazol e carbonato de sódio-bicarbonato de sódio.

[00106] Um tampão é, no geral, definido por uma mistura de componentes de reação. Normalmente incluído está um agente tamponante para manter um pH estável; um ou mais sais adicionais compostos de uma espécie catiônica e aniônica, isto é, cloreto de sódio, cloreto de potássio; e/ou detergentes como Triton-X-100 para garantir a atividade ou estabilidade ideal das enzimas. Um tampão mínimo é composto por apenas um reagente tampão sem sais ou detergentes adicionais providos, com a condição de que pequenas quantidades de espécies catiônicas podem estar presentes para a síntese de DNA em que a desnaturação química é necessária. Surpreendentemente, a utilização de concentrações mais elevadas de sais de nucleotídeos nos processos da invenção permite a utilização destes tampões mínimos.

[00107] Um sistema “sem tampão” carece de um agente tamponante de pH provido ou definido na mistura de componentes de reação e carece de sais ou detergentes adicionais. Este sistema “sem tampão” contém apenas os componentes de reação necessários para a síntese de DNA sozinho e contém espécies catiônicas providas para desnaturação química ou como contraíons de sal de nucleotídeo apenas. Assim, neste sistema, não há íons adicionais adicionados além daqueles que servem a um propósito específico na reação de síntese de DNA. Os contraíons providos com os nucleotídeos (como um sal) servem para estabilizar o nucleotídeo antes do uso no processo.

[00108] Enquanto a aplicação de calor (exposição a 95 °C por vários minutos) é usada para desnaturar o DNA de filamento duplo, outras

abordagens podem ser usadas, as quais são mais adequadas para a síntese de DNA. O DNA de filamento duplo pode ser facilmente desnaturado pela exposição a um ambiente de pH alto ou baixo ou onde cátions estão ausentes ou presentes em concentrações muito baixas, como em água deionizada. A polimerase requer a ligação de uma sequência de iniciador de oligonucleotídeo curta a uma região de filamento simples do modelo de DNA para iniciar sua replicação. A estabilidade desta interação e, portanto, a eficiência da síntese de DNA pode ser particularmente influenciada pela concentração de cátions metálicos e particularmente cátions divalentes, como íons Mg^{2+} , que podem ser vistos como parte integrante do processo.

[00109] A síntese enzimática de DNA também pode exigir íons metálicos divalentes. O processo pode compreender o uso de sais de íons metálicos divalentes: magnésio (Mg^{2+}), manganês (Mn^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), berílio (Be^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}). Os íons divalentes mais usados na síntese de DNA são o magnésio ou o manganês.

[00110] A síntese enzimática de DNA pode ser realizada em uma concentração mais baixa de íons metálicos divalentes do que se pensava ser possível. É convencionalmente pensado que uma razão de até 2:1 cátions divalentes para nucleotídeos é necessária ou ideal, e como os dados no Exemplo mostram, isso é verdadeiro para sais de nucleotídeos com íons de lítio em particular que são a forma usada principalmente. No entanto, se íons alternativos são usados nestes sais, a necessidade de íons divalentes, magnésio em particular, cai dramaticamente, de modo que a razão de íon para sal de nucleotídeo é da ordem de 1,5:1, ou cerca de 1:1 ou menos. Os resultados foram mesmo obtidos para razões de magnésio para sais de nucleotídeo de 0,2:1, sendo esses resultados obtidos com sais de nucleotídeo com céσιο. Essas razões são particularmente marcadas em concentrações mais altas de sais de nucleotídeos (ou seja, 20 mM ou acima). Portanto, a invenção também é direcionada à síntese de DNA em que a razão de íons de magnésio

para sal de nucleotídeo é de 1:1 ou menos, caracterizado pelo fato de que o sal de nucleotídeo compreende um contraíon que tem um raio iônico maior do que o do sódio íon e a concentração do sal de nucleotídeo é mais de 25 mM, mais de 30 mM, mais de 35 mM, mais de 40 mM, mais de 45 mM, mais de 50 mM, mais de 55 mM, mais de 60 mM, mais de 65 mM, mais de 70 mM, mais do que 75 mM, mais do que 80 mM, mais do que 85 mM, mais do que 90 mM, mais do que 95 mM ou mais do que 100 mM.

[00111] Durante a síntese, as polimerases liberam pirofosfato de nucleotídeos que são incorporados na crescente cadeia de DNA. O pirofosfato tem uma afinidade de ligação para os íons de magnésio semelhante ao trifosfato de nucleosídeo e, portanto, os íons de magnésio livres não são liberados por esse processo. A consequência do uso de altas concentrações iniciais de nucleotídeos durante a síntese será a redução dos níveis de íons de magnésio livres. Uma vez que esses íons podem ser necessários para a atividade catalítica da polimerase, é convencional o pensamento de que níveis subideais causados pela interação com fosfatos ou grupos fosfato são provavelmente prejudiciais para a amplificação eficiente. Considerou-se que concentrações suficientes de íons de magnésio eram suficientes e, conseqüentemente, críticas para o rendimento e amplificação do DNA. Portanto, a capacidade de reduzir o nível de magnésio enquanto mantém o rendimento é uma melhoria interessante em relação à arte.

[00112] Desta maneira, a invenção provê uma síntese de DNA enzimática que é realizada sob condições de uma razão reduzida de cátions divalentes para dNTPs, compreendendo o uso de sais de nucleotídeos com um cátion monovalente ou cátions com um raio iônico maior que o do íon de sódio.

[00113] O efeito é particularmente marcado com sais de nucleotídeos compreendendo amônio e césio, ou suas misturas.

[00114] Detergentes também podem ser incluídos na mistura de reação

em certos aspectos. Exemplos de detergentes adequados incluem Triton X-100™, Tween 20™ e derivados de qualquer um deles. Os agentes de estabilização também podem ser incluídos na mistura de reação. Qualquer agente estabilizador adequado pode ser usado, em particular, albumina de soro bovino (BSA) e outras proteínas estabilizantes. As condições de reação também podem ser melhoradas adicionando agentes que relaxam o DNA e tornam a desnaturação do modelo mais fácil. Esses agentes incluem, por exemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), formamida, glicerol e betaína. Os agentes de condensação de DNA também podem ser incluídos na mistura de reação. Esses agentes incluem, por exemplo, polietilenoglicol ou lipídio catiônico ou polímeros catiônicos.

[00115] No entanto, em certas modalidades, esses componentes podem ser reduzidos ou removidos da mistura de reação, por exemplo, nos sistemas mínimo ou sem tampão.

[00116] Deve ser entendido que o especialista é capaz de modificar e otimizar as condições de síntese para os processos da invenção usando estes componentes e condições adicionais com base em seu conhecimento geral. Da mesma forma, as concentrações específicas de agentes particulares podem ser selecionadas com base em exemplos anteriores na técnica e ainda otimizadas com base no conhecimento geral.

[00117] Como um exemplo, um tampão de reação adequado usado em métodos com base em RCA na técnica é Tris HCl a 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ a 10 mM, (NH₄)₂SO₄ a 20 mM, glicerol a 5%, BSA a 0,2 mM, dNTPs a 1 mM. Um tampão de reação preferencial usado na amplificação RCA da invenção é Tris-HCl a 30 mM pH 7,9, KCl a 30 mM, MgCl₂ a 7,5 mM, (NH₄)₂SO₄ a 10 mM, DTT a 4 mM, dNTPs a 2 mM. Este tampão é particularmente adequado para uso com polimerase de DNA Phi29.

[00118] Um tampão de reação adequado para uso com os sais de nucleotídeo da invenção é Tris HCl a 30 mM, pH 7,9, (NH₄)₂SO₄ a 5 mM e

KCl a 30 mM. Sob certas circunstâncias, a síntese enzimática de DNA pode ser conduzida em água (“sem tampão”).

[00119] A síntese enzimática de DNA também pode compreender o uso de uma ou mais proteínas adicionais. O modelo de DNA pode ser amplificado na presença de pelo menos uma pirofosfatase, como a pirofosfatase inorgânica de levedura. Podem ser usadas duas, três, quatro, cinco ou mais pirofosfatasas diferentes. Essas enzimas são capazes de degradar o pirofosfato gerado pela polimerase a partir dos dNTPs durante a replicação da filamento. O acúmulo de pirofosfato na reação pode causar inibição das DNA polimerases e reduzir a velocidade e a eficiência da amplificação do DNA. As pirofosfatasas podem quebrar o pirofosfato em fosfato não inibitório. Um exemplo de uma pirofosfatase adequada para uso nos processos da presente invenção é a pirofosfatase *Saccharomyces cerevisiae*, disponível comercialmente na New England Biolabs, Inc.

[00120] Qualquer proteína de ligação de filamento simples (SSBP) pode ser usada nos processos da invenção, para estabilizar o DNA de filamento simples. SSBPs são componentes essenciais das células vivas e participam de todos os processos que envolvem o ssDNA, como replicação, reparo e recombinação do DNA. Nestes processos, SSBPs ligam-se ao ssDNA formado transitoriamente e podem ajudar a estabilizar a estrutura do ssDNA. Um exemplo de um SSBP adequado para uso nos processos da presente invenção é a proteína do gene 32 T4, disponível comercialmente na New England Biolabs, Inc.

[00121] O rendimento da reação está relacionado à quantidade de DNA sintetizado. O rendimento esperado de um processo de acordo com a presente invenção pode exceder 3 g/l. É preferencial que a quantidade de DNA sintetizado seja maior do que 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 g/l ou mais. Uma quantidade preferencial de DNA sintetizado é 5 g/l. A presente invenção

melhora o rendimento possível da síntese enzimática de DNA. É um objetivo da presente invenção melhorar o rendimento de um processo de síntese de DNA enzimático livre de células, de modo que o DNA possa ser sintetizado em grande escala de uma forma econômica. A presente invenção permite a fabricação/síntese de DNA economicamente em escala industrial usando um processo enzimático catalisado por uma enzima de síntese de DNA ou polimerase. O presente processo permite a incorporação eficiente de nucleotídeos no produto de DNA. Pensa-se que os processos da invenção permitirão que as misturas de reação sejam escalonadas para vários litros, incluindo dezenas de litros. O rendimento, produtividade ou processabilidade melhorados podem ser comparados a uma mistura de reação idêntica onde todos os nucleotídeos são fornecidos como sais convencionais (sódio e/ou lítio).

[00122] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um processo para intensificar a síntese de DNA. Esse aprimoramento pode ser comparado a uma mistura de reação idêntica, com a exceção de que todos os sais de nucleotídeos usados são exclusivamente de sódio ou lítio, ou uma mistura dos mesmos.

[00123] Em um aspecto, a invenção provê um processo livre de células para sintetizar DNA compreendendo o contato de um modelo de DNA com pelo menos uma polimerase na presença de um ou mais nucleotídeos na forma de um sal com um cátion ou cátions monovalentes para formar uma mistura de reação, em que os ditos nucleotídeos estão presentes em uma concentração de pelo menos 10 mM e os ditos cátions não são exclusivamente de sódio ou de lítio.

[00124] Alternativamente, um processo livre de células para sintetizar DNA compreendendo o contato de um modelo de DNA com pelo menos uma polimerase na presença de um ou mais nucleotídeos na forma de um sal para formar uma mistura de reação, em que os ditos nucleotídeos estão presentes

em uma concentração de pelo menos 10 mM e estão:

(a) na forma de um sal com um único cátion monovalente cujo raio iônico é maior do que aquele do íon de sódio, ou

(b) na forma de sais com 2 ou mais cátions monovalentes diferentes, em que pelo menos um dos cátions tem um raio iônico maior do que aquele do íon de sódio.

[00125] É preferencial que a concentração de nucleotídeos aqui referida seja a concentração inicial de nucleotídeos no início do processo, a concentração inicial quando a mistura de reação é formada.

[00126] A invenção também pode se referir a um processo livre de células para sintetizar DNA compreendendo o contato de um modelo de DNA com pelo menos uma polimerase na presença de um ou mais nucleotídeos na forma de um sal com íons de sódio em uma concentração entre 10 e 20 mM, ou até 30 mM. A invenção provê um processo livre de células para a síntese enzimática de DNA compreendendo o uso de nucleotídeos fornecidos como sais, em que os ditos sais compreendem um cátion monovalente com um raio iônico que é maior do que o do íon de sódio, de preferência em que os sais de nucleotídeos são fornecidos ou estão presentes em uma concentração superior a 10 mM.

[00127] A invenção provê ainda uma síntese enzimática de DNA que é realizada sob condições de cátions divalentes reduzidos, preferencialmente magnésio, compreendendo o uso de sais de nucleotídeos com um cátion monovalente ou cátions com um raio iônico maior do que o do íon de sódio.

[00128] A invenção pode, alternativamente, ser realizada usando sais de nucleotídeo com um contraíon que tem um raio iônico maior do que o do íon de potássio, opcionalmente em que a concentração do dito sal de nucleotídeo é mais do que 25 mM, mais do que 30 mM, mais do que 35 mM, mais do que 40 mM, mais de 45 mM, mais de 50 mM, mais de 55 mM, mais de 60 mM, mais de 65 mM, mais de 70 mM, mais de 75 mM, mais de 80 mM,

mais de 85 mM, mais de 90 mM, mais de 95 mM ou mais de 100 mM.

[00129] Os nucleotídeos na forma de sais também são referidos aqui como sais de nucleotídeos.

[00130] A invenção será descrita agora com referência a vários exemplos não limitadores.

EXEMPLOS

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES

[00131] Os seguintes reagentes foram usados nos exemplos apresentados:

Sais de dNTP, sal de lítio, concentração de estoque A 100 mM
(Biolina)

Sais de dNTP, sódio, potássio, célio, amônio, sais, concentração de estoque a 100 mM (síntese de contrato)

DNA polimerase Phi29, concentração de estoque a 2,4 g/l
(produzida internamente)

Pirofosfatase termoestável, concentração de estoque a 2.000 U/ml (Enzimática)

Iniciador de DNA, concentração de estoque a 5 mM
(Oligofactory)

Modelo de plasmídeo: *ProTLx-K B5X4 LUX 15-0-15-10-15 AT-STEM*, concentração de estoque 0,1 g/l (produzido internamente)

Água livre de nuclease (Sigma Aldrich)

Cloreto de magnésio, concentração de estoque a 2 M (Sigma Aldrich)

Tris-base (Thermo Fisher Scientific)

Tris-HCl (Sigma Aldrich)

NaCl (Sigma Aldrich)

EDTA, concentração de estoque a 0,5 M (Sigma Aldrich)

PEG 8000 (Applichem)

Etanol (Thermo Fisher Scientific)

GeneRuler 1 kb + escada de DNA (Thermo Fisher Scientific)

Tampão TAE de estoque 20x (Thermo Fisher Scientific)

Cloreto de potássio (Sigma Aldrich)

Cloreto de lítio (Sigma Aldrich)

Cloreto de céσιο (Sigma Aldrich)

Cloreto de amônio (Sigma Aldrich)

Sulfato de amônio (Thermo Fisher Scientific)

EXEMPLO 1

REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR CÍRCULO ROLANTE (RCA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS DE MAGNÉSIO E SAIS DE NUCLEOTÍDEO (SAIS DE dNTP) (CONTRAIONIZADOS COM CÁTIOS DE LÍTIO, SÓDIO, POTÁSSIO, CÉSIO E AMÔNIO); EFEITO SOBRE O RENDIMENTO DE DNA.

INTRODUÇÃO

[00132] A concentração de íons de magnésio em um tampão de reação é crítica para a síntese ideal de DNA por uma DNA polimerase. Foi relatado que baixas concentrações de íon de magnésio podem resultar na síntese de pouco ou nenhum DNA, enquanto altas concentrações, no geral, resultam na produção de produtos não específicos, bem como causando incorporação incorreta de dNTPs e subsequente aumento de erros de replicação. Visto que o magnésio se liga às porções químicas de fosfato de cada dNTP, a prática comum é usar uma concentração de íons de magnésio equivalente ou superior à concentração de dNTPs usada (Dean, FB, Nelson, JR, Giesler, TL, & Lasken, RS (2001). Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. Genome Research, 11 (6), 1.095 a 1.099. <http://doi.org/10.1101/gr.180501>). Magnésio-dNTP é um requisito absoluto para a síntese de DNA de alta

fidelidade pela DNA polimerase. O magnésio também se liga ao DNA e pode efetuar mudanças estruturais e formar reticulações entre filamentos separados em concentrações maiores do que as necessárias para a síntese de DNA.

[00133] Para a produção enzimática de DNA em quantidades industrialmente relevantes, é necessário maximizar a concentração de dNTPs usada em uma reação a fim de alcançar os maiores rendimentos de DNA. Além disso, a reação precisa ser tanto eficiente quanto precisa. Os dNTPs disponíveis comercialmente são sais de sódio ou de lítio, tipicamente com 4 cátions monovalentes de metal por molécula. A maioria das publicações sobre síntese de DNA ignora a natureza do contraíon e sua possível influência na formação de magnésio-dNTPs. Se as concentrações de dNTPs aumentam em uma reação, a concentração dos contraíons monovalentes pode aumentar por um fator de 4, então os mesmos têm um impacto potencial sobre a reação de amplificação do DNA.

[00134] Compreender a dinâmica do contraíon monovalente de magnésio na síntese de DNA é, portanto, fundamental para maximizar o rendimento do DNA na concentração de magnésio mais baixa possível para permitir a maior precisão do produto de DNA.

[00135] O seguinte conjunto de experimentos avaliou o impacto do aumento das concentrações iniciais de magnésio (5 mM, 10 mM, 20 mM e 40 mM) e diferentes sais de dNTPs sobre os rendimentos de DNA amplificado por RCA (Amplificação por Círculo Rolante).

CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO

[00136] As reações foram configuradas na escala de 100 pl como a seguir: Uma mistura de desnaturação foi preparada e deixada à temperatura ambiente enquanto a mistura de reação era montada. Estes foram então misturados e a DNA polimerase e a pirofosfatase adicionadas. A Tabela 1 mostra o protocolo experimental.

[00137] As reações de RCA foram incubadas a 30 °C por um mínimo

de 48 horas antes do processamento.

TABELA 1 - COMPONENTES DE REAÇÃO de RCA

	Reagente	Concentração de estoque	Volume	Concentração de reação
Mistura de desnaturação	Modelo de plasmídeo	0,1 g/l	0,5 μ l	0,5 ng/ μ l
	NaOH	1 M	0,5 μ l	5 mM
	Iniciador de DNA	5 mM	1 μ l	50 μ M
	H ₂ O		3 μ l	a 5 μ l
Mistura de reação	Tampão Tris 10x: Tris a 300 mM, pH 7,9 KCl a 300 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ a 50 mM		10 μ l	30 mM 5 mM
	MgCl ₂	2 M	Variável	Variável - consultar dados
	Sais de dNTP	100 mM	Variável	Variável - consultar dados
	H ₂ O		Variável	a 100 μ l no total
Enzima 1	DNA polimerase Phi29	2,4 g/l	0,2 μ l	4,8 μ g/ml
Enzima 2	Pirofosfatase	2.000 U/ml	0,1 μ l	0,2 U

PROCEDIMENTO DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRA

[00138] Um excesso molar de 1,5x de EDTA para MgCl₂ foi adicionado após 48 horas de RCA e as reações foram levadas a 800 μ l de volume com água. Os mesmos foram agitados vigorosamente por 15 minutos e colocados em um rotador até que a reação estivesse totalmente misturada. As reações foram então levadas a 1 ml em NaCl a 1 M por adição de 200 μ l de NaCl a 5 M. O DNA concatemérico foi, então, precipitado por adição adicional de 100 μ l de PEG 8000 a 50% (p/v). As misturas foram agitadas vigorosamente por 15 minutos para garantir a precipitação total e, em seguida, giradas a 13.000 rpm em uma centrífuga de topo de bancada por 10 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente decantados e os péletes lavados com 500 μ l de etanol a 100%. Os péletes foram centrifugados novamente a 13.000 rpm em uma centrífuga de topo de bancada por 10 minutos e o sobrenadante de etanol cuidadosamente decantado. Os péletes foram deixados a secar durante 5 minutos para evaporar o etanol residual, ressuspensos em 1 ml de

água e colocados em um rotador de um dia para o outro.

[00139] As concentrações de DNA de reação foram quantificadas a partir de medições de absorção de UV usando um nanofotômetro Implen NP80. Os dados são corrigidos para o aumento de 10x no volume da reação e as concentrações são expressas em g/l do volume original versus as concentrações de dNTP usadas.

RESULTADOS

[00140] As Tabelas 2 a 5 e as Figuras 1 e 2 mostram que as concentrações iniciais de magnésio e as concentrações iniciais de diferentes sais de dNTP afetam os rendimentos de DNA em bruto. Os valores entre parênteses denotam a razão entre magnésio/dNTP no maior rendimento de DNA alcançado para cada tipo de sal de dNTP.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE REAÇÃO DE $MgCl_2$ A 5 mM. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO, E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO A RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)				
	lítio-dNTPs	sódio-dNTPs	potássio-dNTPs	amônio-dNTPs	césio-dNTPs
2,5	0,469	0,678	0,072	0,451	-
5	0,914 (1,0)	1,312	1,392	1,328	0,166
7,5	0,096	1,482	1,52	1,432	-
10	0	2,16	1,852	1,768	1,733
12,5	0,098	2,728 (0,40)	3,24	2,971	-
15	0,047	1,084	4,172 (0,33)	3,98	3,719
17,5	0,057	0,056	3,056	5,096 (0,29)	-
20	0,033	0,647	1,58	4,536	4,953
25	-	-	-	-	5,719 (0,20)
30	-	-	-	-	5,425
35	-	-	-	-	3,689

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE REAÇÃO DE $MgCl_2$ a 10 mM. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO, E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO A RAZÃO ENTRE

MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)				
	lítio-dNTPs	sódio-dNTPs	potássio-dNTPs	amônio-dNTPs	césio-dNTPs
5	1,405	1,820	1,900	1,740	1,450
10	1,661 (1,0)	3,201	3,310	3,210	2,981
15	0,604	4,010	4,571	4,366	4,340
20	0,487	4,407 (0,50)	5,777	5,730	5,320
25	-	0,200	7,071 (0,40)	6,872 (0,40)	6,529
30	-	-	0,488	6,448	8,262 (0,33)
35	-	-	0,232	5,164	1,160
40	-	-	-	1,441	0,301

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE REAÇÃO DE MgCl₂ a 20 mM. RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)				
	lítio-dNTPs	sódio-dNTPs	potássio-dNTPs	amônio-dNTPs	césio-dNTPs
5	1,501	1,66	1,8165	1,773	1,243
10	2,529	3,011	3,114	2,955	2,384
15	3,488 (1,33)	4,1	4,6275	4,364	3,775
20	2,02	5,892	6,3015	5,569	4,178
25	1,062	7,105 (0,80)	7,5735	6,566	6,225
30	0,475	0,168	9,285 (0,67)	8,495	6,973
35	0,491	0,318	3,6015	10,11 (0,57)	6,278
40	0,683	0,35	0,588	7,131	7,803 (0,50)
45	0,385	0,541	0,6255	1,921	-
50	0,655	0,494	0,639	0,449	0,978
55	0,466	0,718	0,723	0,576	-
60	0,54	0,638	0,5955	0,549	1,799
70	-	-	-	-	2,762
80	-	-	-	-	2,224

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DE REAÇÃO DE MgCl₂ a 40 mM. RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)				
	lítio-dNTPs	sódio-dNTPs	potássio-dNTPs	amônio-dNTPs	césio-dNTPs
5	0,791	1,346	1,4895	1,341	0,978
10	2,178	2,338	2,7938	2,533	2,053
15	3,386	3,847	4,35	4,035	3,218
20	4,328 (2-0)	4,992	5,64	5,245	4,725
25	2,565	6,881	7,389	6,961	4,449
30	2,458	6,897 (1,3)	9,063	8,275	7,887
35	0,231	4,145	10,647	9,865	8,669
40	0,326	0,475	7,3365	11,549	9,500 (1,0)
50	0,604	0,315	11,60 (0,80)	13,44 (0,80)	7,659
60	0,691	0,519	1,743	11,35	1,375
70	0,8075	0,617	1,032	5,119	4,013
80	1,075	0,962	0,93	1,071	2,986

[00141] Os dados nas Tabelas 2 a 5 demonstram que os rendimentos mais elevados de DNA são alcançados com sais de dNTP de potássio, amônio e césio não disponíveis comercialmente. Usando essas concentrações de sal de dNTP e aumentando a concentração de magnésio para 40 mM, é possível usar concentrações iniciais de até 50 mM de dNTPs e alcançar uma conversão eficiente em DNA pela DNA polimerase Phi29.

[00142] Os lítio-dNTPs eram substratos insatisfatórios para a síntese de DNA, exigindo níveis muito mais elevados de magnésio do que os outros cátions monovalentes. De fato, o pico de rendimento de DNA em magnésio 40 mM (4,328 g/l) ocorreu em uma concentração de apenas 20 mM de dNTPs. Os sódio-dNTPs tiveram um desempenho melhor do que os equivalentes de lítio com um rendimento máximo de DNA (6,897 g/l) em magnésio a 40 mM alcançado com dNTPs a 30 mM.

[00143] O amônio foi o melhor contraíon de dNTP para alcançar o maior rendimento de DNA (13,44 g/l) nas maiores concentrações iniciais de dNTPs (dNTPs a 50 mM e MgCl₂ a 40 mM), mantendo uma razão entre magnésio/dNTP de 0,8. A tendência nos dados indica que deveria ser possível aumentar adicionalmente a concentração inicial de amônio-dNTPs e sua incorporação ao DNA aumentando adicionalmente a concentração de MgCl₂.

[00144] Os potássio-dNTPs também foram superiores às suas contrapartes de lítio e sódio tanto no rendimento de DNA alcançado em alta concentração de dNTP (MgCl_2 a 50 mM e 40 mM) quanto na razão entre magnésio/dNTP de 0,80. Sob as condições de reação, o potássio-dNTPs teve um desempenho quase comparável ao amônio-dNTPs.

[00145] Com MgCl_2 a 5 mM e 10 mM no processo, os maiores rendimentos de DNA (5,719 g/l e 8,262 g/l) são alcançados com césio-dNTPs a uma concentração inicial de 25 mM e 30 mM, respectivamente. A razão entre magnésio/dNTP em MgCl_2 a 5 mM e dNTP a 25 mM foi de 0,2 e o mais baixo registrado para todos os dados apresentados. O uso de césio-dNTPs é, portanto, vantajoso sob condições em que é benéfico (para o resultado do processo de amplificação do DNA) usar as concentrações mais baixas possíveis de íons de magnésio, enquanto ainda produz altos rendimentos.

[00146] O íon de amônio é único dentre os outros monocátions investigados por ser poliatômico e totalmente não metálico. O mesmo atuar como um tampão de pH e com seu pK_a de 9,24 existe como 50% de amônia (NH_3) em água. A volatilidade do NH_3 permite o uso de técnicas de processamento de DNA, como a evaporação sob baixa pressão, impossíveis com monocátions metálicos.

[00147] A Figura 1 é uma representação gráfica dos dados mostrados nas Tabelas 2 a 5 e mostra gráficos do rendimento de DNA em bruto obtido (g/l) versus o rendimento de DNA teórico (g/l) correspondente à concentração total inicial/iniciativo de sal de nucleotídeo (mM) em diferentes concentrações de cloreto de magnésio.

[00148] A Figura 2 é um gráfico da concentração de sal de dNTP (mM) que gerou rendimento máximo de DNA em bruto em relação a diferentes concentrações de reação de íons de magnésio. Isso mostra claramente que a dependência de magnésio é maior para lítio-dNTPs e sódio-dNTPs, mas é reduzida para os outros contraíons.

[00149] A Tabela 6 inclui os raios iônicos dos contraíons monovalentes em diferentes números de coordenação.

[00150] Existe uma relação clara entre o tamanho do contraíon (em relação ao magnésio) e a concentração de magnésio necessária para a utilização de altos níveis de dNTPs. Os cátions maiores, como potássio, céσιο e amônio, são muito superiores ao sódio e particularmente ao lítio.

TABELA 6 - RAIOS ATÔMICOS DE CONTRAÍONS:

Número de coordenação	Lítio	Sódio	Potássio	Rubídio	Césio	Amônio	Magnésio
	Raios iônicos (pm)						
4	59	99	137			140	57
5		100					66
6	76	102	138	152	167	148	72
7		112	146	156			
8	92	118	151	161	174	154	89
9		124	155	163	178		
10			159	166	181		
11				169	185		
12		139	164	172	188	167	
13							
14				183			
Média	76	113	150	165	179	152	71
% de aumento no tamanho em relação a Magnésio	7	60	111	133	152	114	-

Referências: <http://abulafia.mt.ic.ac.uk/shannon/ptable.php>, Shriver & Atkins

[00151] Assim, pelo uso seletivo de contraíons de sal de dNTP, os rendimentos de DNA em processos industriais podem ser aumentados. Isto pode ser mediado pela afinidade diferencial dos contraíons para dNTPs, DNA e 10 ânions de fosfato liberado (PO_4^{3-}) e a dinâmica competitiva com cátions divalentes de magnésio, como demonstrado no Exemplo 6.

EXEMPLO 2

REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR CÍRCULO ROLANTE (RCA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS DE MAGNÉSIO E UMA CONCENTRAÇÃO FIXA DE SAIS DE dNTP (CONTRAIONIZADOS COM CÁTIONS DE LÍTIO, SÓDIO, POTÁSSIO, CÉSIO E AMÔNIO); EFEITO SOBRE O RENDIMENTO DE DNA.

INTRODUÇÃO E CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO

[00152] Este experimento foi projetado para determinar a concentração mínima de íons de magnésio necessária para a incorporação de uma quantidade fixa de dNTPs (10 mM) no processo no início. As reações e processamento de RCA foram realizados conforme descrito no Exemplo 1. As concentrações de dNTPs (como sais de lítio, sódio, potássio, cézio e amônio) foram fixadas em 10 mM no processo no início e as reações foram realizadas em tampão de RCA padrão usado para o Exemplo 1 suplementado com $MgCl_2$ a 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM e 10 mM.

RESULTADOS

[00153] Os resultados mostram que, em contraste com a visão ampla de que uma razão de pelo menos 1:1 de magnésio/dNTP é necessária para a incorporação eficiente de dNTP, ao mudar para dNTPs com contraíons diferentes do lítio, é possível diminuir o níveis de magnésio na reação RCA bem abaixo desta razão, enquanto melhora adicionalmente o rendimento de DNA.

[00154] Como pode ser visto na Figura 3, os rendimentos para sódio-dNTPs e lítio-dNTPs têm uma forte dependência dos níveis de magnésio. Embora haja uma ligeira redução no DNA produzido em $MgCl_2$ a 2 mM para potássio-dNTPs, esta forma de sal de dNTP, juntamente com cézio-dNTPs e amônio-dNTPs, mostra uma menor dependência da concentração de íons de magnésio. Isso sugere que a suposição geral de uma razão ideal de magnésio/dNTP de 1:1 é enganosa sem considerar tipo de contraíon de dNTP. Os dados mostram que o uso de contraíons alternativos ao lítio e ao sódio pode reduzir essa razão para até 0,2:1.

EXEMPLO 3

REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR CÍRCULO ROLANTE (RCA) EM UM TAMPÃO MÍNIMO A UM NÍVEL FIXO DE ÍONS DE MAGNÉSIO E CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SAIS DE dNTP (CONTRAIONIZADAS COM CÁTIOS DE LÍTIO, SÓDIO, POTÁSSIO E

AMÔNIO); EFEITO SOBRE O RENDIMENTO DE DNA.INTRODUÇÃO E CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO

[00155] A fim de remover possíveis efeitos de contraíons dos componentes do tampão, os experimentos foram realizados a seguir um tampão mínimo que consiste apenas em Tris HCl a 30 mM (pH 7,9) suplementado com MgCl₂ a 5 mM. Estas reações examinaram os efeitos do aumento das concentrações iniciais de sal de dNTP (de 2,5 mM a 20 mM de dNTPs fornecidos como sais de lítio, sódio, potássio ou amônio) em reações contendo MgCl₂ a 5 mM.

TABELA 7 - COMPONENTES DE REAÇÃO DE RCA COM TAMPÃO MÍNIMO:

	Reagente	Concentração de estoque	Volume	Concentração de reação final
Mistura de desnaturação	Modelo de plasmídeo	0,1 g/l	0,5 pl	0,5 ng/pl
	NaOH)	1 M	0,5 pl	5 mM
	Iniciador de DNA	5 mM	1 pl	50 pM
	H ₂ O		3 pl	a 5 pl
Mistura de reação	Tampão Tris 10x: Tris a 300 mM, pH 7,9		10 pl	30 mM
	MgCl ₂	2 M	0,25 pl	5 mM
	Sais de dNTP	100 mM	Variável	Variável - como mostrado
	H ₂ O		Variável	a 100 pl no total
Enzima 1	DNA polimerase Phi29	2,4 g/l	0,2 pl	4,8 pg/ml
Enzima 2	Pirofosfatase	2.000 U/ml	0,2 pl	0,2 U

[00156] Quantificação e processamento de DNA foi realizado conforme descrito no Exemplo 1.

[00157] Os resultados são mostrados na Figura 4.

[00158] Os dados mostram que a RCA prossegue sem a presença de KCl a 30 mM e (NH₄)₂SO₄ a 5 mM presentes no tampão de reação padrão. A tendência observada no aumento do rendimento versus concentração de sal de dNTP com contraíons variáveis é consistente com os dados apresentados no Exemplo 1, identificando amônio-dNTPs com desempenho melhor do que os outros sais de dNTP contraionizados.

[00159] A Figura 4 valida que a alteração do contraíon de sal dNTP permite que a RCA prossiga em concentrações mais altas de dNTPs, com um

aumento correspondente no rendimento.

TABELA 8 - RENDIMENTO DE DNA EM BRUTO DE VÁRIOS dNTPS DE CONTRAIONIZADOS REALIZADOS EM TAMPÃO MÍNIMO EM $MgCl_2$ A 5 mM. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO E A RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTPS É MOSTRADA EM COLCHETES:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)			
	lítio-dNTPs	sódio-dNTPs	potássio-dNTPs	amônio-dNTPs
2,5	0,448	0,608	0,655	0,69
5	0,975 (1,0)	1,326	1,472	1,487
7,5	0,164	1,79	2,112	2,176
10	0,145	2,403 (0,50)	2,697	2,793
12,5	0,031	1,961	3,393 (0,40)	3,496
15	0,072	1,266	3,355	4,094
17,5	0,036	0,242	2,362	4,755
20	0,019	0,181	1,071	5,473 (0,25)

EXEMPLO 4

REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR CÍRCULO DE ROLANTE (RCA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS DE MAGNÉSIO E AMÔNIO-dNTPS PARA DETERMINAR O MAIOR RENDIMENTO DE DNA EM BRUTO

INTRODUÇÃO E CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO

[00160] Essas reações tinham como objetivo estender os dados experimentais mostrados no Exemplo 3 (Figura 4), e encontrar os limites de rendimento de DNA aumentando-se a concentração de amônio-dNTPs na presença de diferentes concentrações de magnésio. As reações de RCA e o processamento de DNA foram realizados em um tampão mínimo, essencialmente como descrito no Exemplo 3.

RESULTADOS

TABELA 9 - RENDIMENTO DE DNA EM BRUTO DE AMÔNIO-dNTPS REALIZADO EM TAMPÃO MÍNIMO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $MgCl_2$. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO, E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES

CONSISTEM NA RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de amônio-dNTPs (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)			
	MgCl ₂ a 5 mM (primeiro ciclo)	MgCl ₂ a 5 mM (segundo ciclo)	MgCl ₂ a 40 mM	MgCl ₂ a 80 mM
2,5	0,69	-	-	-
5	1,487	-	-	-
7,5	2,176	-	-	-
10	2,793	2,671	-	-
12,5	3,496	-	-	-
15	4,094	4,146	-	-
17,5	4,755	-	-	-
20	5,473 (0,25)	5,585	-	-
25	-	6,001 (0,20)	-	-
30	-	2,826	-	-
35	-	2,111	-	-
40	-	-	10,083	9,125
50	-	-	14,23 (0,80)	11,342
60	-	-	13,247	14,716
70	-	-	0,267	15,473
80	-	-	1,229	16,34 (1,0)

[00161] Os dados demonstram que, usando dNTPs contraionizados com amônio, é possível aumentar ainda mais a concentração inicial de dNTPs em uma reação (até 80 mM) e produzir níveis muito altos de DNA. Isto é alcançado aumentando-se significativamente as concentrações de MgCl₂ para 80 mM em um tampão mínimo. Mesmo a MgCl₂ a 80 mM e amônio-dNTP a 80 mM, é evidente que o rendimento de pico de DNA não foi atingido. Adicionar mais dNTPs deve aumentar ainda mais o rendimento de DNA. Maiores concentrações (além de 80 mM) de MgCl₂ e amônio-dNTPs devem render níveis ainda maiores de DNA sob condições em que as razões entre magnésio/dNTP seriam <1.

EXEMPLO 5**DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE PRODUTIVIDADE DE RCA EM MISTURA DE ÁGUA-CLORETO DE MAGNÉSIO.****INTRODUÇÃO E CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO**

[00162] Os experimentos de amplificação de DNA foram então realizados em concentrações de 10 mM, 20 mM e 40 mM de MgCl₂ com uma faixa de potássio, césio e amônio-dNTPs em um meio de reação sem agente tamponante Tris ou outros sais convencionalmente necessários para a

amplificação ideal de DNA. Os lítio e sódio-dNTPs foram omitidos nesse ponto, pois ambos foram superados pelos outros cátions no teste. Além do magnésio e dos contraíons de dNTP, os únicos outros cátions na reação compreendiam íons de sódio a 5 mM do NaOH usado para a desnaturação do modelo. O experimento foi realizado para determinar se os próprios dNTPs e o subproduto de fosfato da reação tinham capacidade para manter o pH em um nível que facilitasse a atividade da DNA polimerase Phi29 e as condições físico-químicas necessárias para o iniciação eficaz do DNA.

RESULTADOS

TABELA 10 - COMPONENTES DE REAÇÃO DE RCA SEM AGENTE TAMPONANTE TRIS:

	Reagente	Concentração de estoque	Volume	Concentração de reação final
Mistura de desnaturação	Modelo de plasmídeo	0,1 g/l	0,5 μ l	0,5 ng/ μ l
	NaOH)	1 M	0,5 μ l	5 mM
	Iniciador de DNA	5 mM	1 μ l	50 μ M
	H ₂ O		3 μ l	a 5 μ l
Mistura de reação	MgCl ₂	2 M	Variável	Variável
	Sais de dNTP	100 mM	Variável	Variável - como mostrado
	H ₂ O		Variável	a 100 μ l no total
Enzima 1	DNA polimerase Phi29	2,4 g/l	0,2 μ l	4,8 μ g/ml
Enzima 2	Pirofosfatase	2.000 U/ml	0,2 μ l	0,2 U

[00163] O processamento e a quantificação de DNA foram realizados essencialmente como descrito no Exemplo 1.

TABELA 11 - MEIO SEM TAMPÃO COM MGCl₂ A 10 mM. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO, E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO A RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)		
	potássio-dNTPs	césio-dNTPs	amônio-dNTPs
5	0,113	0,067	1,575
10	0,271	0,16	3,111
15	0,284	1,456	4,618
20	0,577	1,64	5,691
25	0,682 (0,40)	3,220 (0,40)	6,356 (0,40)
30	0,579	1,966	6,333
35	0,545	0,738	5,671
40	0,617	0,698	3,561

TABELA 12 - MEIO SEM TAMPÃO COM MgCl₂ A 20 mM. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO, E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO A RAZÃO ENTRE MAGNÉSIO/dNTP:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)	
	césio-dNTPs	amônio-dNTPs
5	0,128	1,362
10	2,62	2,941
15	4,18	4,575
20	5,79	6,153
25	7,710 (0,28)	8,019
30	7,428	9,391
35	7,438	11,60 (0,60)
40	6,53	11,592
50	2,211	5,042

TABELA 13 - MEIO SEM TAMPÃO COM MgCl₂ A 40 mM. OS RENDIMENTOS DE PICO SÃO DESTACADOS EM NEGRITO, E OS NÚMEROS ENTRE COLCHETES SÃO A RAZÃO DE [MG]/[dNTPS]:

Concentração inicial de sais de dNTP (mM)	Rendimento de DNA em bruto (g/l)		
	potássio-dNTPs	césio-dNTPs	amônio-dNTPs
5	0,095	0,126	1,013
10	0,103	2,25	2,338
15	3,6	2,962	3,078
20	0,858	4,994	5,137
25	3,325	6,117	6,843
30	7,31 (1,33)	7,321	8,56
35	2,296	6,663	10,205
40	0,369	7,47	11,454
50	-	11,21 (0,80)	10,684
60	-	10,925	11,76 (0,67)
70	-	2,539	1,478

[00164] Os dados experimentais mostram que as reações realizadas com potássio-dNTPs geraram resultados variáveis na ausência de tampão Tris. Por outro lado, tanto os césius-dNTPs quanto os amônios-dNTPs geraram rendimentos de DNA progressivamente maiores com concentrações crescentes de íons de magnésio e dNTPs. Os céσιο-dNTPs tiveram um desempenho significativamente melhor sob essas condições sem tamponamento em comparação ao ambiente tamponado padrão (consulte a Tabela 5). Rendimentos de DNA elevados foram registrados em $MgCl_2$ a 40 mM e céσιο-dNTPs a 50 mM (razão entre magnésio/dNTP de 0,80). Não houve diferença significativa entre o rendimento de DNA usando amônio-dNTPs em condições tamponadas ou não tamponadas. Um rendimento alto do DNA foi observado em $MgCl_2$ a 40 mM com de amônio-dNTP a 60 mM (razão entre magnésio/dNTP de 0,67).

EXEMPLO 6

EFEITO DE OUTROS SAIS DE CONTRAÍÓN NA AMPLIFICAÇÃO DE DNA USANDO AMÔNIO-dNTPS

INTRODUÇÃO E CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO

[00165] Este experimento foi realizado para demonstrar o efeito dos cátions de lítio, sódio e potássio no rendimento de DNA obtido por RCA usando-se amônio-dNTPs.

TABELA 14 - COMPONENTES DE REAÇÃO:

	Reagente	Concentração de estoque	Volume	Concentração de reação final
Mistura de desnaturação	Modelo de plasmídeo	0,1 g/l	0,5 μ l	0,5 ng/ μ l
	NaOH	1 M	0,5 μ l	5 mM
	Iniciador de DNA	5 mM	1 μ l	50 μ M
	H ₂ O		3 μ l	a 5 μ l
Mistura de reação	Tampão Tris	10x (Tris a 300 mM)	10 μ l	30 mM
	$MgCl_2$	2 M	Variável	Variável - como mostrado
	amônio-dNTPs	100 mM	Variável	Variável - como mostrado

	Reagente	Concentração de estoque	Volume	Concentração de reação final
	Sais de contraíons (LiCl, NaCl, KCl ou NH ₄ Cl)	1 M	Variável	Variável, na razão de 1:1 com contraíons derivados de dNTP
	h ₂ O		Variável	a 100 μ l no total
Enzima 1	DNA polimerase Phi29	2,4 g/l	0,2 μ l	4,8 μ g/ml
Enzima 2	Pirofosfatase	2.000 U/ml	0,2 μ l	0,4 U

[00166] As reações foram configuradas como indicado na Tabela 14. Quatro grupos de experiências foram conduzidas contendo concentrações a partir de 17,5 mM, 25 mM, 35 mM e 50 mM de amônio-dNTPs com 5 mM, 10 mM, 20 mM e 40 mM de MgCl₂, respectivamente. A cada grupo adicionou-se LiCl, NaCl, KCl ou NH₄Cl em concentrações totais de 70 mM, 100 mM, 140 mM e 200 mM, respectivamente. Isso resultou em uma concentração de cátion adicional em competição com as concentrações de contraíons de amônio-dNTP. Além disso, a concentração de amônio foi duplicada ao adicionar NH₄Cl. A razão entre magnésio/dNTP para cada grupo de experimentos é inferior a 1,0.

[00167] O processamento e a quantificação de DNA foram realizados essencialmente como descrito para o Exemplo 1.

[00168] Os resultados são mostrados na Figura 5.

[00169] A Figura 5 mostra que os íons de césio, amônio e potássio não são inibidores da síntese de DNA ao usar amônio-dNTPs. Além disso, a concentração de amônio pode até mesmo ser duplicada sem afetar o rendimento do DNA.

[00170] Pelo contrário, o lítio e o sódio são inibidores, sendo o lítio mais inibidor do que o sódio. Com base nisso, a presença de lítio e sódio deve ser evitada em processos industriais de produção de DNA que requerem altas concentrações de dNTPs para altos rendimentos de DNA.

EXEMPLO 7

INVESTIGAÇÃO DO TAMPONAMENTO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE

DE DNA POR dNTPSINTRODUÇÃO E CONFIGURAÇÃO DE REAÇÃO

[00171] Esse experimento foi realizado para verificar a capacidade dos sais de dNTP de tamponar uma mistura de reação na ausência de quaisquer agentes tamponantes específicos.

TABELA 15 - CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL PARA MEDIÇÕESDE PH EM MgCl₂ a 10 mM

[dNTP] (mM) componentes	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
NaOH a 5 mM (μ l)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H ₂ O (μ l)	47	44,5	42	39,5	37	34,5	32	29,5	24,5	19,5
MgCl ₂ a 10 mM (μ l)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
dNTPs a 100 mM (μ l)	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	30

TABELA 16- CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL PARA MEDIÇÕESDE PH EM MgCl₂ a 20 mM

[dNTP] (mM) componentes	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
NaOH a 5 mM (μ l)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H ₂ O (μ l)	46,75	44,25	41,75	39,25	36,75	34,25	31,75	29,25	24,25	19,25
MgCl ₂ a 10 mM (μ l)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
dNTPs a 100 mM (μ l)	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	30

TABELA 17 - CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL PARA MEDIÇÕESDE PH EM MgCl₂ a 30 mM

[dNTP] (mM) componentes	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
NaOH a 5 mM (μ l)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H ₂ O (μ l)	46,25	43,75	41,25	38,75	36,25	33,75	31,25	28,75	23,75	18,75
MgCl ₂ a 10 mM (μ l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dNTPs a 100 mM (μ l)	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	30

[00172] Os componentes da reação foram misturados nas razões

mostradas nas tabelas acima para gerar um volume final de 50 μ l. O pH das misturas foi, então, medido usando-se um medidor de pH Mettler Toledo SevenCompact™ S220 equipado com um eletrodo de pH InLab®Micro.

[00173] A Figura 6 mostra os pHs medidos de uma faixa de concentrações de dNTP (sais de céσιο e de amônio) na presença de MgCl₂ a 10 mM, 20 mM e 40 mM. A concentração de NaOH é aquela usada para desnaturar o DNA modelo usado na reação de síntese de DNA. Para os fins desta experiência, todos os outros componentes da reação de síntese de DNA foram omitidos, uma vez que não influenciam o pH inicial. Em todos os casos, nenhum tampão de estabilização de pH específico (por exemplo, Tris) foi adicionado. A maior capacidade de tamponamento dos amônio-dNTPs em relação aos céσιο-dNTPs nas concentrações de sal de dNTP de menos que 30 mM é evidente e esperada. Curiosamente, em concentrações de sais de dNTP superiores a 30 mM, o pH médio para as reações de dNTP de céσιο e as reações de dNTP de amônio são semelhantes a cerca de 7 e 7,5, respectivamente. Os dados sugerem que os grupos fosfato dos próprios dNTPs atuam para regular o pH em cerca de 7 quando presentes em uma concentração suficiente. Uma vez que a enzima DNA polimerase pode operar eficientemente em cerca de pH 7, esta é uma vantagem para reações de síntese em escala industrial que requerem o uso de altas concentrações de sais de dNTP. É importante ressaltar que isso mostra que para reações em escala industrial, a síntese de DNA pode ser realizada com nenhuma ou baixas concentrações de um tampão específico para alcançar produtividades altas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo livre de células para a síntese enzimática de DNA, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de sais de nucleotídeos em uma concentração superior a 10 mM, em que os ditos sais compreendem um cátion monovalente com um raio iônico maior que aquele do íon de sódio.

2. Processo livre de células para a síntese enzimática de DNA, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de sais de nucleotídeos, em que os ditos sais de nucleotídeos estão presentes em uma concentração de pelo menos 10 mM e são:

(a) um sal de nucleotídeo que compreende um cátion monovalente cujo raio iônico é maior do que aquele do íon de sódio, ou

(b) dois ou mais sais de nucleotídeos, em que cada sal compreende diferentes cátions monovalentes, em que pelo menos um dos cátions tem um raio iônico maior do que aquele do íon de sódio.

3. Processo livre de células de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que os ditos sais de nucleotídeo estão presentes em uma concentração de pelo menos 15 mM, pelo menos 20 mM, pelo menos 25 mM, pelo menos 30 mM, pelo menos 35 mM ou pelo menos 40 mM.

4. Processo livre de células de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o dito cátion ou cátions monovalentes são independentemente selecionados de um metal alcalino terroso, um metal de transição ou um íon poliatômico.

5. Processo livre de células de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o dito cátion ou cátions monovalentes são independentemente selecionados a partir da lista que compreende potássio, amônio, derivados de amônio, rubídio, cézio ou frâncio.

6. Processo livre de células de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o dito processo livre

de células compreende adicionalmente a utilização de um ou mais iniciadores ou uma primase.

7. Processo livre de células de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que o dito processo livre de células compreende adicionalmente a utilização de um modelo.

8. Processo livre de células para sintetizar DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o processo livre de células compreende adicionalmente o uso de um ou mais cátions de metal divalente, preferencialmente selecionados a partir da lista que compreende magnésio, manganês, cálcio, berílio, zinco e estrôncio.

9. Processo livre de células de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a razão entre os ditos cátions metálicos divalentes e os nucleotídeos é igual ou menor do que 1:1 na mistura de reação, de preferência menor do que 1:1.

10. Processo livre de células de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o processo utiliza uma concentração máxima de 10 mM de sais de nucleotídeo de sódio e/ou lítio.

11. Processo livre de células de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que o processo compreende adicionalmente a utilização de um agente químico desnaturante, de preferência hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de amônio e uma pirofosfatase.

12. Processo livre de células de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que não são adicionados agentes tamponantes de pH ao processo e, de preferência, não são adicionados sais ou detergentes adicionais.

13. Processo livre de células de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que os sais de nucleotídeos compreendem íons

de césio.

14. Processo livre de células de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que são adicionados agentes tamponantes de pH, mas não são adicionados sais ou detergentes adicionais.

15. Processo livre de células de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que os sais de nucleotídeos compreendem íons de amônio.

16. Processo livre de células de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o processo é para a síntese de DNA em grande escala, de preferência pelo menos 3 g/l.

17. Uso de sais de nucleotídeos, caracterizado pelo fato de que compreende cátions de césio na síntese enzimática livre de células de DNA.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a síntese enzimática livre de células de DNA ocorre na presença de baixos níveis de cátion divalente, opcionalmente em uma razão de 0,2:1 a 0,8:1 cátion divalente para nucleotídeo, de preferência 0,2:1 a 0,5:1.

19. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a síntese livre de células de DNA ocorre em agentes tamponantes mínimos, opcionalmente compreendendo um tampão de pH sozinho, sem detergente ou sais adicionais.

20. Método para amplificar um modelo de DNA, caracterizado pelo fato de que usa uma DNA polimerase em que é necessário manter uma razão entre cátions divalentes e nucleotídeos na mistura de reação de 0,5:1 ou abaixo, compreendendo o uso de sais de nucleotídeos que compreendem íons de césio.

21. Uso de sais de nucleotídeos, caracterizado pelo fato de que compreende cátions de rubídio na síntese enzimática livre de células de DNA.

22. Método livre de células para amplificar um modelo de DNA, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende o contato do

dito modelo e uma DNA polimerase com nucleotídeos na forma de um sal em uma quantidade igual ou maior do que 40 mM, de preferência maior do que 60 mM ou opcionalmente maior do que 80 mM, em que o dito o sal compreende íons de amônio.

23. Síntese enzimática de DNA, caracterizada pelo fato de que é realizada em condições de concentrações reduzidas de cátions divalentes, preferencialmente magnésio, compreendendo o uso de nucleotídeos na forma de sais compreendendo um cátion monovalente com um raio iônico maior que o do íon de sódio.

24. Processo livre de células, uso, método, método livre de células ou síntese enzimática de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizados pelo fato de que a enzima é uma DNA polimerase, opcionalmente uma polimerase do tipo de deslocamento de filamento.

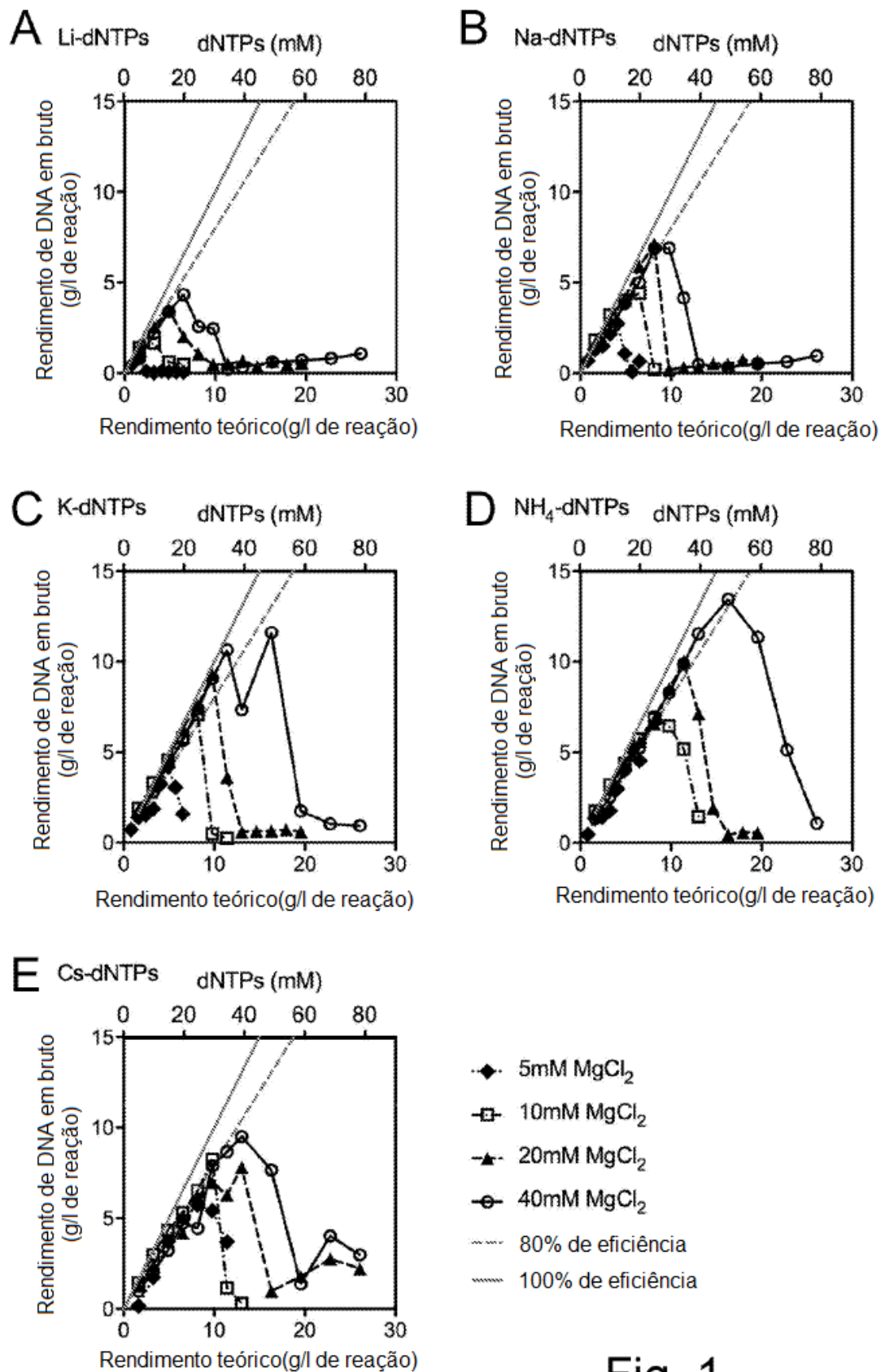


Fig. 1

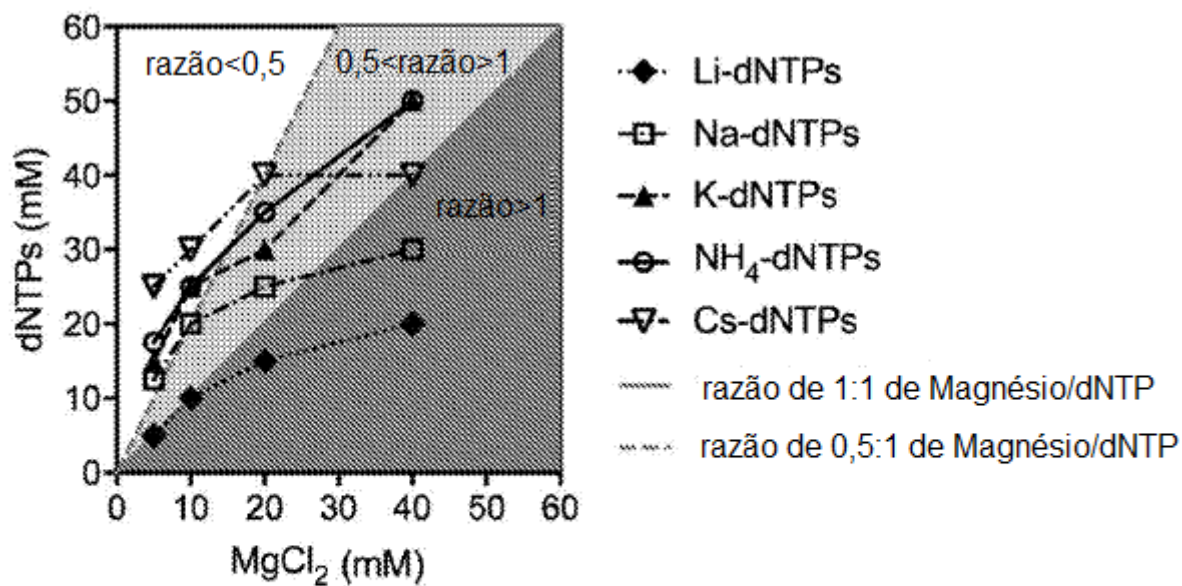


Fig. 2

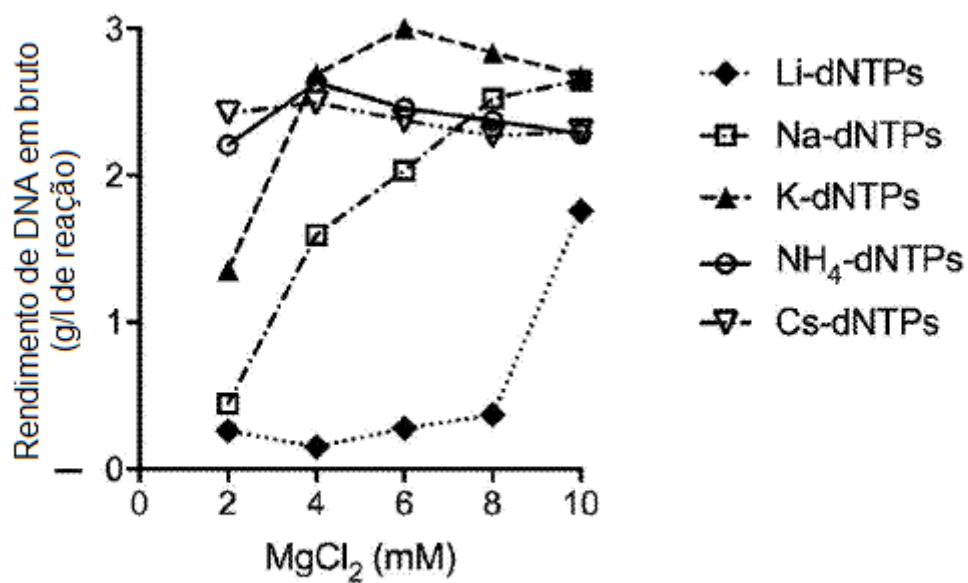


Fig. 3

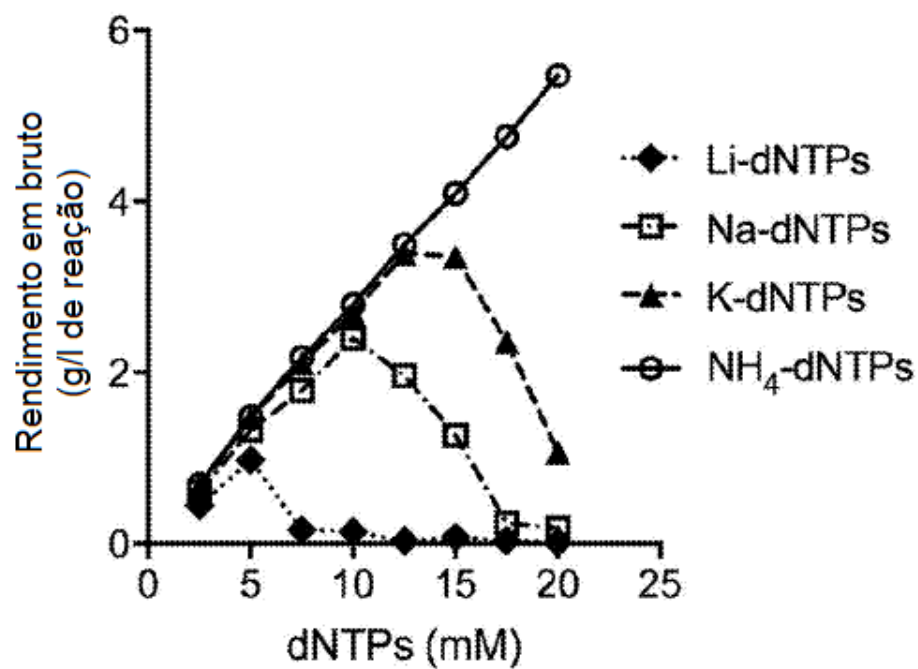


Fig. 4

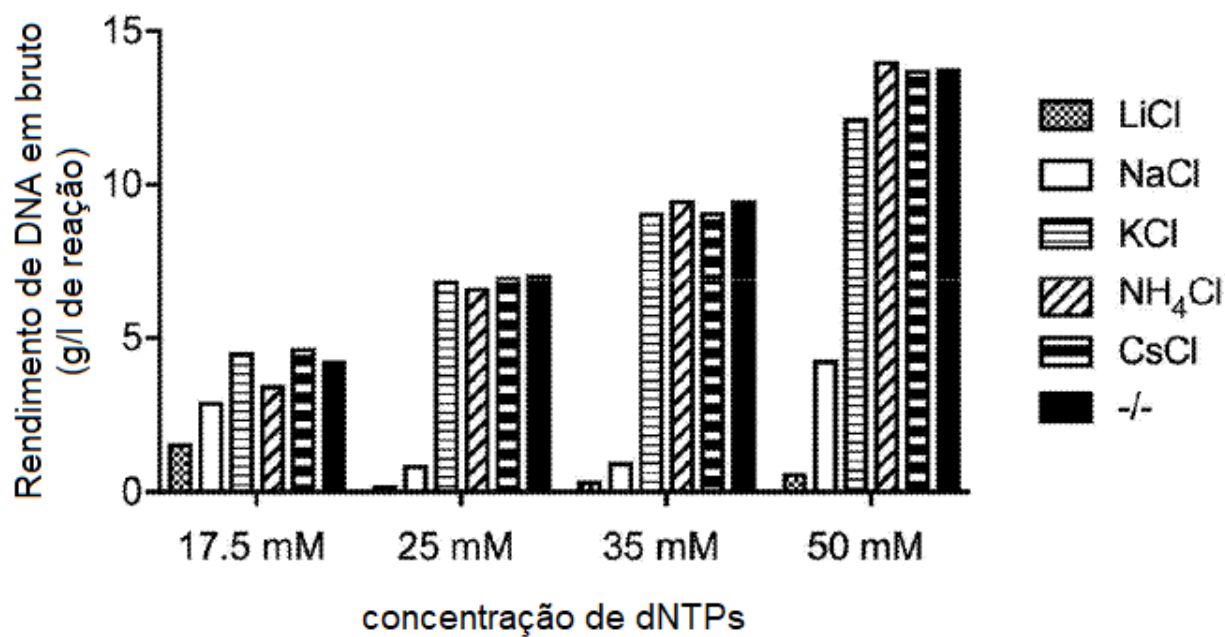


Fig. 5

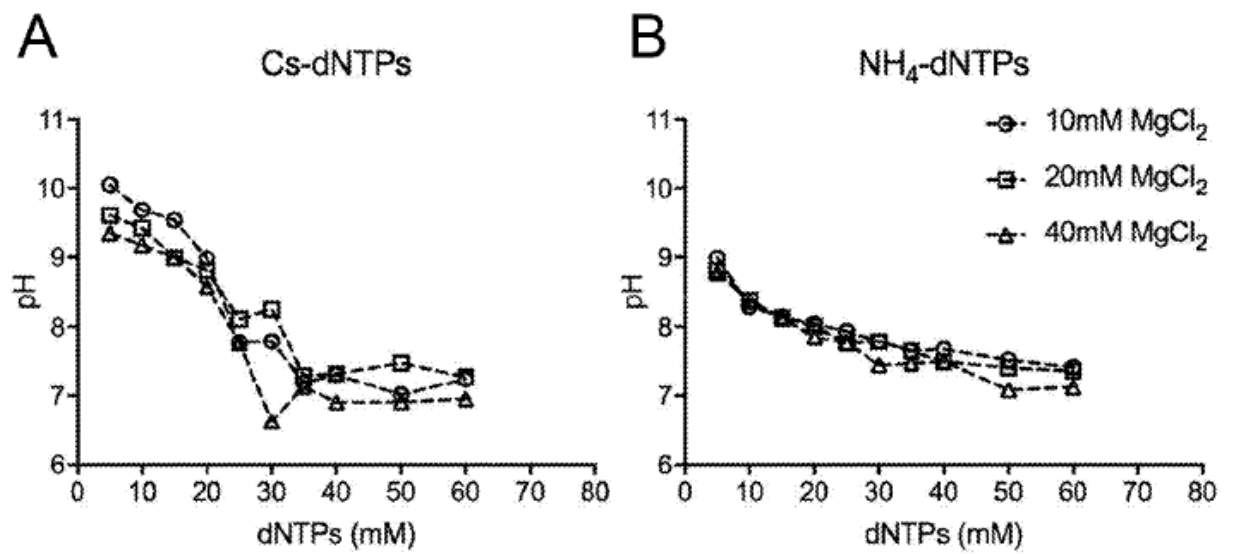


Fig. 6

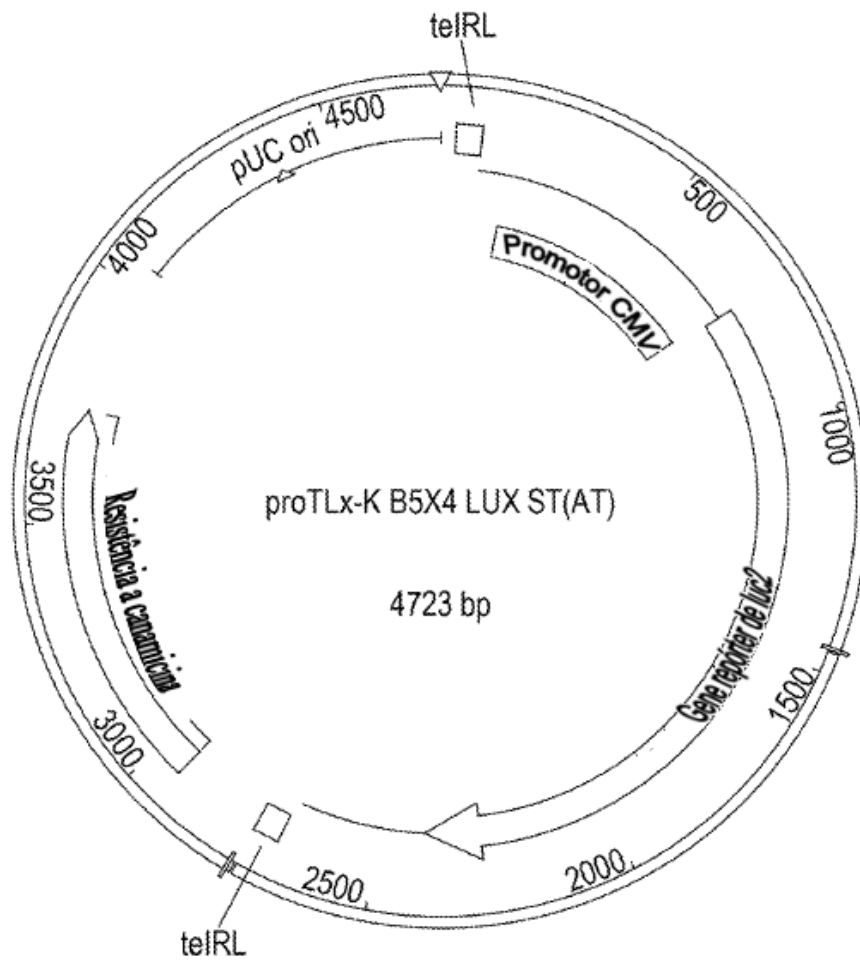


Fig. 7

RESUMO

PROCESSO LIVRE DE CÉLULAS PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA, USO DE SAIS DE NUCLEOTÍDEOS, MÉTODO E MÉTODO LIVRE DE CÉLULAS PARA AMPLIFICAR UM MODELO DE DNA, E, SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DNA

A presente invenção se refere a um processo melhorado para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), em particular a síntese enzimática de DNA livre de células, de preferência em grande escala, com um rendimento melhorado e/ou com uma eficiência melhorada. A espécie do cátion presente no sal de nucleotídeo como o contraíon é crítica para o rendimento, eficiência e fidelidade da reação de síntese enzimática de DNA de alto rendimento. Os processos no presente documento usam cátions alternativos como contraíons para os nucleotídeos iônicos, permitindo o uso de concentrações maiores de nucleotídeos na síntese de DNA e, ainda, permitindo que condições de reação mais favoráveis sejam usadas.