

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 910**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06790343 .5**

96 Fecha de presentación: **06.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1948822**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEICO MULTICOMPONENTES Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO.**

30 Prioridad:
07.10.2005 US 724567 P
13.10.2005 US 726291 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2011

73 Titular/es:
JOHNSON & JOHNSON RESEARCH PTY LIMITED
LEVEL 4 1 CENTRAL AVENUE
EVELEIGH, NSW 1430, AU

72 Inventor/es:
MOKANY, Elisa;
BIRKETT, Donald, John;
TODD, Alison, Velyian y
DOAN, Tram, Bich

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 910 T3

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

DESCRIPCIÓN

Enzimas de ácido nucleico multicomponentes y procedimientos para su uso.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las Solicitudes de Patente Provisionales de Estados Unidos Nº 60/726.291 presentada el 13 de octubre de 2005 y 60/724.567 presentada el 7 de octubre de 2005, respectivamente.

Campo técnico

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos catalíticos multicomponentes y procedimientos para su uso. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones que comprenden enzimas de ácido nucleico multicomponentes autoensamblables, procedimientos para preparar tales composiciones y procedimientos para usar tales composiciones, incluyendo para detectar, identificar y/o cuantificar dianas tales como facilitadores de ensamblaje y otras entidades detectando modificación catalítica de sustratos por dichas enzimas de ácido nucleico multicomponentes.

Antecedentes de la invención

Las moléculas de ácido nucleico pueden adoptar configuraciones estructurales secundarias que pueden conferir actividad catalítica o enzimática. La tecnología de evolución *in vitro* ha facilitado el descubrimiento y desarrollo de tales ácidos nucleicos catalíticos, con frecuencia denominados "ADNzimas" o "ribozimas", que son capaces de catalizar una amplia serie de reacciones incluyendo escisión de ácidos nucleicos (Carmi y col., 1996; Raillard y Joyce, 1996; Breaker, 1997; Santoro y Joyce, 1998), ligación de ácidos nucleicos (Cuenoud y Szostak, 1995), metalación de porfirina (Li y Sen, 1996), y la formación de enlaces carbono-carbono (Tarasow y col., 1997), enlaces éster (Illangasekare y col., 1995) o enlaces amida (Lohse y Szostak, 1996).

En particular, se han caracterizado ADNzimas y ribozimas que escinden específicamente secuencias de ácido nucleico definidas después de hibridar mediante formación de pares de bases de Watson Crick. Las ADNzimas son capaces de escindir moléculas de ARN (Breaker y Joyce, 1994; Santoro y Joyce, 1997) o ADN (Carmi y col., 1996). Las moléculas de ARN catalíticas (ribozimas) también son capaces de escindir secuencias tanto de ARN (Haseloff y Gerlach, 1988) como de ADN (Raillard y Joyce, 1996). La tasa de escisión catalítica de la mayoría de enzimas de ácido nucleico depende de la presencia y concentración de iones metálicos divalentes tales como Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} (Santoro, y Joyce, 1998; Brown y col., 2003).

Los ácidos nucleicos catalíticos, tales como la ribozima cabeza de martillo y las ADNzimas 10:23 y 8:17, tienen múltiples dominios. Tienen un dominio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dos dominios de unión de sustrato no conservados ("ramas de hibridación"), que son regiones de secuencia que se unen específicamente al sustrato. Haseloff y Gerlach obtuvieron por ingeniería genética la ribozima cabeza de martillo, que se denominó así por la estructura en tallo de bucle que junta los dos dominios conservados formando el núcleo catalítico (Haseloff y Gerlach, 1988). Las ADNzimas "10:23" y "8:17" son capaces de escindir sustratos de ácido nucleico en enlaces fosfodiéster de ARN específicos (Santoro y Joyce, 1997). La ADNzima 10:23 tiene un dominio catalítico de 15 desoxinucleótidos flanqueados por dos ramas de reconocimiento de sustrato. La ADNzima 8:17 tiene un dominio catalítico de 14 desoxinucleótidos que también está flanqueado por dos ramas de reconocimiento de sustrato.

Un ácido nucleico catalítico puede escindir un sustrato de ácido nucleico con una secuencia diana que cumple los requisitos mínimos. La secuencia sustrato debe ser sustancialmente complementaria a las ramas de hibridación del ácido nucleico catalítico y el sustrato debe contener una secuencia específica en el sitio de escisión. Los requisitos de la secuencia específica en el sitio de escisión incluyen, por ejemplo, una secuencia de ribonucleótido purina:pirimidina para escisión por la ADNzima 10:23 (Santoro y Joyce, 1997) y la secuencia uridina:X para las ribozimas cabeza de martillo (Perriman y col., 1992), en la que X puede equivaler a A, C, o U, pero no G.

Se ha mostrado que los ácidos nucleicos catalíticos tuvieran solamente ciertas modificaciones en el área que forma el núcleo catalítico (Perreault y col., 1990; Perreault y col., 1991; Zaborowska y col., 2002; Cruz y col., 2004; Silverman, 2004)). Se enumeran ejemplos de secuencias responsables de actividad catalítica de ADNzimas en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias ejemplares para algunas ADNzimas activas y sus sustratos

Tipo de ADNzima	Secuencia de ADNzima	Secuencia de sustrato
8:17	(N) _x TNNNAGCNNNWCGK(N) _x	(N') _x (rN) _x G (N') _x
10:23	(N) _x GGMTMGHNDNNMGMG(N) _x	(N') _x rR rY (N') _x
N = A, C, T, G o cualquier análogo; N' = cualquier nucleótido complementario a N; (N) _x o (N') _x = cualquier número de nucleótidos; W = A o T; K = A, G o AA; rN = cualquier base ribonucleotídica; (rN) _x = cualquier número de ribonucleótidos; rR = A o G; rY = C o U; M = A o C; H = A, C o T; D = G, A o T		

La sustitución de ciertos desoxirribonucleótidos para ciertos ribonucleótidos en ribozimas conocidas se ha intentado en ciertas condiciones (McCall y col., 1992). Las ribozimas que se han convertido completamente a ADN no tienen actividad debido a las diferencias conformacionales de ARN y ADN (Perreault y col., 1990). Estos estudios demuestran que las enzimas de ARN no pueden modificarse en enzimas de ADN funcionales simplemente reemplazando los ribonucleótidos con desoxirribonucleótidos.

Ha habido algunos estudios que han intentado desarrollar ciertas ribozimas homodiméricas o heterodiméricas para aplicaciones terapéuticas (Kuwabara y col., 1999; Kuwabara y col., 2000; Oshima y col., 2003). En estos estudios, el núcleo catalítico de la ribozima comprendía solamente ribonucleótidos. Además, la capacidad de las ADNzimas para actuar en formatos diméricos o multiméricos no se ha considerado, ni se ha proporcionado ninguna información sobre como extrapolar de una ribozima dimérica a una ADNzima dimérica en lo que respecta a una posible estructura de una ADNzima dimérica y actividad resultante.

Se han usado ácidos nucleicos catalíticos en combinación con protocolos de amplificación *in vitro* como un medio para generar una señal detectable, permitiendo de este modo el control en tiempo real de secuencias diana de ácido nucleico amplificadas (Todd y col., 2000) (documentos US 6.140.055; US 6.201.113; WO 99/45146; PCT/IB99/00848; WO 99/50452). La detección de zimógeno (documentos US 6.140.055; US 6.201.113; WO 99/45146; PCT/IB99/00848; WO 99/50452), también conocido en la técnica como detección de DzyNA (Todd y col., 2000), da como resultado amplificación de señal y diana simultánea. Esto se produce debido a que las ADNzimas catalíticas o ribozimas se coamplifican junto con secuencias diana para producir amplicones que actúan como verdaderas enzimas capaces de renovación múltiple. Como tal, cada amplicón de ácido nucleico catalítico escinde múltiples sustratos indicadores. Las ADNzimas y ribozimas se introducen en los amplicones usando cebadores con marcadores 5' que están inactivos, secuencias antisentido de ácidos nucleicos catalíticos. Cuando estas secuencias se copian durante la amplificación *in vitro* las secuencias sentido catalíticamente activas se coamplifican junto con la secuencia diana. El enfoque de zimógeno/DzyNA es muy flexible puesto que la amplificación de señal catalítica puede ligarse a procedimientos de amplificación de diana incluyendo PCR (reacción en cadena de la polimerasa), amplificación de desplazamiento de cadena ("SDA") o amplificación de círculo rodante ("RCA"), que producen amplicones de ADNzima; y procedimientos de amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos ("NASBA"), replicación de secuencia autosostenida ("3SR") o amplificación mediada por transcripción ("TMA") que producen amplicones de ribozima. Además, puesto que se han descubierto o han evolucionado numerosas moléculas de ácido nucleico catalítico con una amplia serie de actividades catalíticas, el enfoque de zimógeno puede usar un sustrato indicador distinto de un ácido nucleico en el que la lectura del ensayo depende de una modificación química distinta de escisión de un sustrato de ácido nucleico. El enfoque de zimógeno/DzyNA (Todd y col., 2000) o NASBA/ribozima (documento WO 00/58505) puede considerarse sensible y útil pero existe potencial de ruido debido a amplificación de secuencias de cebadores.

Se ha usado NASBA para producir amplicones de ARN que contienen ácido nucleico diana y una sección del núcleo catalítico de la ribozima cabeza de martillo (GAArA), introducida como secuencia antisentido marcada con un cebador y después copiada (documento WO 00/58505). La secuencia adicional requerida para actividad catalítica (CUGANrGrA) se introdujo como secuencia sentido en una segunda molécula, que se marcó con un fluoróforo e interruptor y que también sirvió como el sustrato indicador. Ciertas de las bases ribonucleotídicas (rN anterior) deben permanecer como ribonucleótidos o se pierde la actividad de ribozima catalítica. Dos moléculas que consistían completamente en ADN se consideraron incapaces de formar enzimas heterodiméricas catalíticamente activas (documento WO 00/58505).

También se han usado ácidos nucleicos catalíticos para la detección de polimorfismos de nucleótido sencillo ("SNP"). El requisito estricto de la formación de pares de bases de Watson Crick entre las ramas de unión a ácido nucleico catalítico y el sustrato ha permitido el desarrollo de procedimientos que permiten la diferenciación de secuencias cortas cercanamente relacionadas. Se ha mostrado que las ADNzimas y ribozimas diferencian entre dos secuencias que difieren en tan poco como una base sencilla (Cairns y col., 2000) (documento WO 99/50452). Xiao, Y. y col. Chem. Biochem, 2004, 5, (3), 374-379 desvela ADNzimas que se autoensamblan en presencia de hemina, peróxido de hidrógeno y luminol para generar quimioluminiscencia. El documento WO 2005/073405 A2 desvela polinucleótidos catalíticos y su uso en la determinación de un analito en un medio líquido. El documento WO 03/089650 A2 desvela moléculas sensoras de ácido nucleico y procedimientos para la detección y amplificación de agentes de señalización usando construcciones de ácido nucleico enzimáticas, incluyendo semizimas y moléculas sensoras de ácido nucleico multicomponentes. Kossen, K. y col. Chemistry & Biology 2004, 11, 807-815 desvela ensayos basados en ribozimas de alto rendimiento para la detección de ácidos nucleicos virales que implican la activación de ligasas de "semi" ribozimas. Kossen, K. y col. RNA 2003, 9, 1058-1072 desvela detección ultrasensible de ácidos nucleicos usando "semi" ribozimas que están desprovistas de actividad catalítica a no ser que se completen por un ácido nucleico de acción en trans.

Xiao, Y. y col. Chem. Biochem, 2004, 5, (3), 374-379 desvela ADNzimas que se autoensamblan en presencia de hemina, peróxido de hidrógeno y luminol para generar quimioluminiscencia.

El documento WO 2005/073405 A2 desvela polinucleótidos catalíticos y su uso en la determinación de un analito en un medio líquido.

El documento WO 03/089650 A2 desvela moléculas sensoras de ácido nucleico y procedimientos para la detección y amplificación de agentes de señalización usando construcciones de ácido nucleico enzimáticas, incluyendo Semizimas y moléculas sensoras de ácido nucleico multicomponentes.

5 Kossen, K. y col. Chemistry & Biology 2004, 11, 807-815 desvela ensayos basados en ribozimas de alto rendimiento para la detección de ácidos nucleicos virales que implican la activación de ligasas de "semi" ribozimas.

Kossen, K. y col. RNA 2003, 9, 1058-1072 desvela detección ultrasensible de ácidos nucleicos usando "semi" ribozimas que están desprovistas de actividad catalítica a no ser que se completen por un ácido nucleico de acción en trans.

10 Las ADNzimas tienen propiedades que proporcionan ventajas sobre las ribozimas para ciertas aplicaciones *in vitro*. El ADN es inherentemente más estable que el ARN y por lo tanto es más robusto con un mayor periodo de caducidad. El ADN puede almacenarse durante largos periodos a temperatura ambiente en solución o en una forma liofilizada. Las ADNzimas también son preferibles sobre la mayoría de enzimas proteicas en ciertas aplicaciones debido a que, por ejemplo, no se desnaturalizan de forma irreversible por exposición a altas temperaturas durante la amplificación.

15 Por lo tanto, existe una necesidad en curso en la técnica de procedimientos sencillos, rápidos y rentables para detectar, identificar y cuantificar secuencias de ácido nucleico y otras entidades, que preferentemente proporcionan ácidos nucleicos catalíticos basándose en ADNzimas y/o ribozimas.

Sumario de la invención

20 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en la que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador de ensamblaje de MNAzima para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente catalíticamente activa (MNAzima), en la que cada uno de dicho al menos primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprenden una parte de rama de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora;

25 en la que tras el autoensamblaje, la parte de rama sensora de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como ramas sensoras de la MNAzima, la parte de rama de sustrato de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como ramas de sustrato de la MNAzima y la parte de núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como un núcleo catalítico de la MNAzima;

30 y en la que las ramas sensoras de la MNAzima interactúan con dicho facilitador de ensamblaje de MNAzima para mantener los primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para asociación de sus partes de núcleo catalítico respectivas para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, siendo capaz dicho núcleo catalítico de modificar al menos un sustrato y en la que dichas ramas de sustrato de dicha MNAzima interactúan con un sustrato de modo que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima pueda modificar dicho sustrato.

35 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o sustrato puede comprender ADN o un análogo del mismo.

40 El facilitador de ensamblaje puede ser una diana a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNip, ARNhp, ARNt, ARNm, ARNnop, ARNtp, ARNmp, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos. El ARN ribosómico puede ser ARN ribosómico 16S.

La fuente del ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, de arquea o cualquier combinación de las mismas.

45 El ácido nucleico puede amplificarse. La amplificación puede comprender uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

La composición puede comprender adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico que actúa para estabilizar al menos una de dichas partes de rama de sustrato o partes de rama sensora.

50 Al menos uno de dicho facilitador de ensamblaje, dichos componentes oligonucleotídicos o sustrato o una combinación de los mismos puede estar comprendido por más de una molécula.

Las partes del núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico pueden seleccionarse del grupo que comprende SEC ID N°: 149 -153, 155 - 157, 159 y 161, y las partes del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico pueden seleccionarse del grupo que comprende SEC ID N°: 166 -170 y 172.

La composición puede comprender adicionalmente al menos un inhibidor de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador de ensamblaje, sustrato o una combinación de los mismos puede comprender adicionalmente al menos un aptámero o parte del mismo. El aptámero o parte del mismo puede estar comprendido por al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.

La composición puede comprender adicionalmente al menos un inhibidor de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima.

Al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho facilitador de ensamblaje o dicho sustrato puede comprender adicionalmente al menos una parte de secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura de horquilla. La estructura de horquilla puede inhibir el autoensamblaje de dicha MNAzima. La inhibición del autoensamblaje puede retirarse al contactar un aptámero con una diana. El aptámero, o parte del mismo, puede unirse a una diana seleccionada del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinaciones de los mismos.

El sustrato puede comprender un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede comprender al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido péptido nucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido nucleico-péptido o cualquier combinación de los mismos. La proteína puede comprender al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína o cualquier combinación de los mismos. El sustrato puede comprender adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula, o combinaciones de las mismas. El sustrato puede unirse a un soporte insoluble o estar libre en solución. El sustrato puede comprender una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce.

Las ramas de sustrato pueden interaccionar con dicho sustrato a través de la formación de pares de bases complementarias.

La modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima puede proporcionar un efecto detectable. La modificación de dicho sustrato puede seleccionarse del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida o cualquier combinación de los mismos. El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos. Puede medirse el efecto detectable, en el que la magnitud de dicha medición es indicativa de la cantidad de una diana.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador de ensamblaje o dicho sustrato pueden seleccionarse del grupo que comprende ADN, ARN, análogos de ácido nucleico, ácidos péptido nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico-péptido o una combinación de los mismos. El facilitador de ensamblaje y dicho sustrato pueden comprender ácidos nucleicos que son completa o parcialmente complementarios a al menos una parte de dichos primer o segundo componentes oligonucleotídicos. Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador de ensamblaje o dicho sustrato pueden comprender al menos una sustitución o adición de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil tiouridina, dihidouridina, 2'-O-metilpseudouridina, beta D-galactosilqueosina, 2'-O-metilguanosina, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, beta D-manosilmetiluridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metilpurin-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, metiléster de ácido uridin-5-oxiacético, ácido uridin-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurin-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, beta D-arabinosil uridina, beta D-arabinosil timidina.

La composición puede comprender adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un facilitador de ensamblaje adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, en la que cada uno de dichos al menos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos comprenden una parte de rama de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora;

en la que el autoensamblaje de al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente

oligonucleotídico, la parte de rama sensora de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman ramas sensoras de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, la parte de rama de sustrato de dicho al menos tercero y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman ramas de sustrato de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional y la parte de núcleo catalítico de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional;

y en la que las ramas sensoras de dicha al menos una MNAzima adicional interaccionan con dicho al menos un facilitador de ensamblaje adicional para mantener dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos en proximidad para asociación de sus respectivas de núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional, siendo capaz dicho núcleo catalítico de actuar en al menos un sustrato adicional y en la que las ramas de sustrato de dicha al menos una MNAzima adicional interaccionan con al menos un sustrato adicional de modo que el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional puede actuar en dicho al menos un sustrato adicional.

Cada uno de los sustratos adicionales pueden ser el mismo, diferente o una combinación de los mismos.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos un facilitador de ensamblaje que comprende

(a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, autoensamblándose al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico en presencia de un facilitador de ensamblaje para formar al menos una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;

(b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene potencialmente el facilitador de ensamblaje en condiciones que permiten:

- (1) el auto ensamblaje de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa y
- (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima; y

(c) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha al menos una MNAzima, siendo la presencia de la actividad catalítica indicativa de la presencia de dicho al menos un facilitador de ensamblaje.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador de ensamblaje puede estar comprendido por ADN o un análogo del mismo.

El facilitador de ensamblaje puede ser una diana a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNip, ARNhp, ARNm, ARNt, ARNnop, ARNtp, ARNmp, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos. El ANR ribosómico puede ser ARN ribosómico 16S.

La fuente del ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, de arquea o cualquier combinación de las mismas.

El procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa de amplificar el facilitador de ensamblaje. La etapa de amplificar puede comprender uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Al menos uno de dicho facilitador de ensamblaje, dichos componentes oligonucleotídicos o sustrato o una combinación de los mismos puede estar comprendido por más de una molécula.

El procedimiento puede comprender adicionalmente la determinación de la presencia de dicha actividad catalítica durante o después de dicha amplificación.

El autoensamblaje de la MNAzima puede requerir contacto del facilitador de ensamblaje con uno o ambos de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos.

El procedimiento puede comprender adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico que entra en contacto con al menos una parte de uno o ambos de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos para autoensamblar la MNAzima. El tercer componente oligonucleotídico puede estar comprendido por más de una molécula.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos un facilitador de ensamblaje que comprende

- (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, autoensamblando al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico en presencia de al menos un primer facilitador de ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;
- 5 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, siendo capaz dicho primer sustrato de modificarse por dicha primera MNAzima, proporcionando dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima un efecto detectable;
- (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene potencialmente dicho al menos primer facilitador de ensamblaje en condiciones que permiten:
- 10 (1) el auto ensamblaje de dicha al menos primera MNAzima y
(2) la actividad catalítica de dicha al menos primera MNAzima; y
- (d) detectar dicho efecto detectable.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o sustrato pueden estar comprendidos por ADN o un análogo del mismo.

- 15 El facilitador de ensamblaje puede ser una diana a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNip, ARNhp, ARNm, ARNt, ARNnop, ARNtp, ARNmp, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos. El ARN ribosómico puede ser ARN ribosómico 16S.

- 20 La fuente del ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, de arqueas o cualquier combinación de las mismas.

- El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de amplificar el ácido nucleico. La etapa de amplificar puede comprender uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de círculo rodante (RCA),
25 amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Al menos uno de dicho facilitador de ensamblaje o dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o sustrato o combinación de los mismos puede estar comprendido por más de una molécula.

- 30 El procedimiento comprender adicionalmente detectar dicho efecto detectable durante o después de dicha amplificación. El efecto detectable puede ser indicativo de la presencia de dicho facilitador de ensamblaje. El efecto detectable puede medirse cuantitativa o cualitativamente.

- El sustrato puede ser un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede comprender al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido péptido nucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido nucleico-péptido o cualquier combinación de los mismos. La proteína comprende al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína o cualquier combinación de los mismos. El sustrato puede comprender adicionalmente al menos uno de una nanopartícula o micropartícula o combinación de las mismas. El sustrato puede unirse a un soporte insoluble o estar libre en solución.
- 35

El sustrato puede comprender un ácido nucleico y dichas ramas de sustrato pueden interaccionar con dicho sustrato a través de la formación de pares de bases complementarios.

- 40 El sustrato puede comprender una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación del sustrato por la MNAzima, un efecto detectable proporcionado por la parte detectable aumenta o se reduce. El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
- 45

- El procedimiento puede comprender adicionalmente amplificar el efecto detectable mediante el uso de una cascada de amplificación del efecto detectable. La cascada de amplificación del efecto detectable puede comprender uno o más de una cascada de ribozima/ligasa, una cascada de enzima de ácido nucleico circular, una cascada de enzima proteica o una o más enzimas unidas a un soporte, o cualquier combinación de los mismos.
- 50

La modificación de dicho sustrato puede seleccionarse del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

El procedimiento puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, siendo capaces dichos al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos de

autoensamblarse en presencia de al menos un facilitador de ensamblaje adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional y

en el que al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, siendo capaz dicho sustrato adicional de modificarse por la MNAzima adicional, en el que dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.

5 El al menos un efecto detectable adicional puede ser detectable de forma independiente.

El al menos uno de cada sustrato adicional puede unirse a un soporte insoluble de modo que solamente uno de una parte detectable y una parte interruptora del sustrato adicional permanezcan unidos al soporte cuando dicho sustrato adicional se modifica por dicha MNAzima adicional.

10 Un sustrato adicional puede unirse a al menos un soporte insoluble de modo que se produce un efecto detectable cuando el sustrato se modifica por su MNAzima respectiva.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

15 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, siendo capaces al menos un primer componente oligonucleotídico y al menos un segundo componente oligonucleotídico de autoensamblarse en presencia de dicha diana para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa; y comprendiendo al menos uno de dicho primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos al menos una parte de aptámero;

20 (b) poner en contacto dichos componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene dicha al menos una diana en condiciones que permiten:

- (1) la unión de dicha diana con dichas partes de aptámero y
- (2) la actividad catalítica de la MNAzima; y

(c) determinar la presencia de la actividad catalítica de la MNAzima, siendo la presencia de la actividad catalítica indicativa de la presencia de dicha diana.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos puede estar unido a un soporte sólido.

25 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos puede estar comprendido por ADN o un análogo del mismo.

La diana puede identificarse, detectarse o cuantificarse.

30 El procedimiento puede comprender adicionalmente al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, siendo capaces dicho a menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos de autoensamblarse en presencia de al menos una diana adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional.

y en el que al menos uno de dicho tercer o cuarto componentes oligonucleotídicos comprende al menos una parte de aptámero adicional que se une a dicha al menos una diana adicional.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

35 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, siendo capaces al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico de autoensamblarse en presencia de al menos un facilitador de ensamblaje y dicha al menos una diana para formar al menos una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa; y en el que al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un facilitador de ensamblaje comprende adicionalmente al menos un aptámero o parte del mismo y en el que dicha diana es capaz de unirse a dicho al menos un aptámero o parte del mismo;

40 (b) proporcionar al menos un inhibidor de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima

(c) poner en contacto dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje de dicho inhibidor con una muestra que potencialmente contiene dicha al menos una diana en condiciones que permiten:

45 (1) la unión de dicha diana con dicho al menos un aptámero o parte del mismo,

(2) la actividad catalítica de dicha al menos una MNAzima; y

(3) la retirada de dicha inhibición de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa; y

50 (d) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha MNAzima, siendo la presencia de dicha actividad catalítica indicativa de la presencia de dicha diana.

La al menos una diana puede seleccionarse del grupo que comprende proteínas, glucoproteínas, lípidos,

lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquier derivado, parte o combinaciones de los mismos.

5 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o inhibidor puede estar unido a un soporte insoluble.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje, aptámero o parte de aptámero puede comprender adicionalmente dicho inhibidor.

10 Al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o facilitador de ensamblaje puede comprender adicionalmente una parte de secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura en horquilla. La estructura de horquilla puede inhibir el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa.

El aptámero o parte del mismo puede estar comprendido por al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.

La inhibición de autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa puede retirarse tras el contacto de dicho aptámero o parte de aptámero con la diana.

15 El inhibidor puede ser capaz de unirse al menos a uno del grupo que comprende dicho aptámero o parte del mismo.

El inhibidor puede seleccionarse del grupo que comprende ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos péptido nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico-péptido o una combinación de los mismos.

20 El procedimiento puede comprender adicionalmente proporciona un sustrato que puede modificarse por dicha MNAzima para proporcionar un efecto detectable. La modificación puede seleccionarse del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida. El sustrato puede no modificarse por dicho primer o segundo componentes oligonucleotídicos individualmente o por tanto dicho primer como segundo componentes oligonucleotídicos en ausencia de dicho facilitador de ensamblaje y dicha diana.

25 El sustrato puede comprender un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico comprende al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido péptido nucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido nucleico-péptido o cualquier combinación de los mismos. La proteína puede comprender al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína o cualquier combinación de los mismos.

El sustrato puede comprender adicionalmente al menos de una nanopartícula o micropartícula o combinación de las mismas.

30 La detección del efecto detectable puede ser indicativa de dicha actividad catalítica de dicha MNAzima catalíticamente activa y siendo dicha actividad catalítica indicativa de dicha diana. El efecto detectable puede medirse cuantitativa o cualitativamente. El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

El sustrato puede comprender una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce.

40 De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

(a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos siendo capaces al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico de autoensamblarse en presencia de al menos un primer facilitador de ensamblaje y dicha al menos una primera diana para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;

45 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, siendo capaz dicho primer sustrato de modificarse por dicha al menos primera MNAzima, proporcionando dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima un efecto detectable;

50 (c) en el que al menos uno de dichos primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un primer facilitador de ensamblaje o dicho al menos un primer sustrato comprende adicionalmente un aptámero y en el que dicha diana es capaz de unirse al menos a una parte de dicho aptámero, proporcionando al menos una primer inhibidor que es capaz de inhibir dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa en ausencia de dicha diana;

(d) poner en contacto dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador de ensamblaje, dicho sustrato y dicho inhibidor con una muestra que potencialmente contiene dicha diana en condiciones que

permiten:

- (1) la unión de dicha diana con dicho aptámero,
- (2) la retirada de dicha inhibición de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa; y
- (3) la actividad catalítica de la MNAzima; y

5

(e) determinar la presencia de dicho efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicha diana.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador de ensamblaje puede estar comprendido por ADN o un análogo del mismo.

10 El aptámero, o parte del mismo, puede unirse a una diana seleccionada del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinaciones de los mismos.

15 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje, sustrato o inhibidor puede unirse a un soporte insoluble.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje, aptámero o parte de aptámero puede comprender adicionalmente dicho inhibidor.

El aptámero o parte del mismo puede estar comprendido por al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.

20 Al menos uno de dicho primer o segundo componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o sustrato puede comprender adicionalmente una parte de secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura en horquilla. La estructura de horquilla puede inhibir el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa. La inhibición del autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa puede retirarse tras el contacto de dicho aptámero o parte de aptámero con la diana.

25 El inhibidor puede ser capaz de unirse al menos a uno del grupo que comprende dicho aptámero o parte del mismo. El inhibidor puede seleccionarse del grupo que comprende ARN, ADN, análogos de ácido nucleico, ácidos péptido nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico-péptido o una combinación de los mismos.

30 El sustrato puede comprender un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede comprender al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido péptido nucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido nucleico-péptido o cualquier combinación de los mismos. La proteína puede comprender al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína o cualquier combinación de los mismos.

El sustrato puede comprender adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula o combinación de las mismas.

35 La detección de dicho efecto detectable puede detectar la presencia de dicha diana. El efecto detectable puede medirse cuantitativa o cualitativamente. El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia, de polarización, difracción, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

40

El sustrato puede comprender una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce. La modificación puede seleccionarse del grupo que comprende, escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

45 El procedimiento puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercero y cuarto componentes oligonucleotídicos, siendo capaces dicho al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos de autoensamblarse en presencia de al menos un facilitador de ensamblaje adicional y al menos una diana adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional y

50 en el que al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, siendo capaz dicho sustrato adicional de modificarse por la MNAzima adicional, proporcionando dicha modificación un efecto detectable adicional;

y en el que al menos uno de dicho tercer o cuarto componente oligonucleotídico o dichos facilitador de ensamblaje adicional o dicho sustrato adicional comprende adicionalmente al menos un aptámero adicional que se une a dicha al menos una diana adicional;

en el que al menos una molécula inhibidora adicional entra en contacto con una parte de dicho aptámero adicional, inhibiendo de este modo dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa adicional en ausencia de dicha diana adicional; y

5 en el que dicho al menos un facilitador de ensamblaje adicional entra en contacto con al menos una parte de dichos componentes oligonucleotídicos adicionales.

El al menos un efecto detectable adicional puede ser detectable de forma independiente.

Cada uno de los sustratos adicionales puede ser el mismo, diferente o una combinación de los mismos.

10 Al menos uno de cada sustrato adicional puede unirse a un soporte insoluble de modo que solamente uno de una parte detectable y una parte interruptora del sustrato adicional permanecen unidos al soporte cuando dicho sustrato adicional se modifica por dicha MNAzima adicional.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos una variante de secuencia de ácido nucleico que comprende

15 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en el que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de una secuencia variante de un ácido nucleico para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;

(b) proporcionar al menos un sustrato, siendo capaz dicho sustrato de modificarse por dicha primera MNAzima, en el que dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

20 (c) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene dicha variante de secuencia en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa y

(2) la actividad catalítica de dicha MNAzima; y

25 (d) determinar la presencia de dicho efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicha al menos una secuencia variante.

La variante de secuencia puede seleccionarse del grupo que comprende polimorfismos de nucleótido sencillo, polimorfismos de múltiples nucleótidos, inserciones, deleciones, duplicaciones, traslocaciones, variantes de secuencia de desplazamiento de fase, variantes de secuencia sin sentido o cualquier combinación de las mismas. La variante de secuencia puede estar presente en ADN o ARN.

30 Uno o ambos de dicho primer componente oligonucleotídico y dicho segundo componente oligonucleotídico pueden estar comprendidos por más de una molécula,

La muestra que contiene dicha variante de secuencia puede seleccionarse del grupo que comprende ADN no metilado o metilado modificado con bisulfito, ARN metilado o no metilado modificado con bisulfito, al menos un amplicón de ADN metilado o no metilado modificado con un bisulfito, al menos un amplicón de ARN metilado o no metilado modificado con bisulfito o una combinación de los mismos.

35 El auto ensamblaje de la enzima de ácido nucleico multicomponente puede requerir contacto de al menos una parte de uno o ambos del primer y segundo componente oligonucleotídicos con el ácido nucleico que comprende dicha variante de secuencia.

40 El procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa de amplificar el ácido nucleico que contiene dichas variantes de secuencia. La etapa de amplificación puede comprender uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). El procedimiento puede comprender adicionalmente la determinación de la presencia de dicha variante de secuencia de ácido nucleico durante o después de dicha amplificación.

45 El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

50 El sustrato puede comprender una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce.

El sustrato puede estar unido a un soporte insoluble o libre en solución.

La modificación puede seleccionarse del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces estéricos o enlaces de amida.

El procedimiento puede comprender adicionalmente

- 5 (a) proporcionar al menos un tercer componente oligonucleotídico y al menos un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensambla en presencia de al menos una variante de secuencia de ácido nucleico adicional para formar al menos una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa adicional;
- 10 (b) poner en contacto dicho al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene al menos una variante de secuencia de ácido nucleico adicional en presencia de al menos un sustrato adicional capaz de modificarse por dicha al menos una MNAzima adicional, en el que dicha modificación de dicho al menos un sustrato adicional proporciona al menos un efecto detectable adicional en condiciones que permiten:
- 15 (1) el autoensamblaje de al menos una MNAzima y
(2) la actividad catalítica de al menos una MNAzima; y
- (c) detectar dicho al menos un efecto detectable adicional, detectando de este modo la presencia de dicha al menos una variante de secuencia adicional.

El al menos un efecto detectable adicional puede ser detectable de forma independiente.

Cada uno de los sustratos adicionales pueden ser el mismo, diferente o una combinación de los mismos.

- 20 El procedimiento puede comprender adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene dicho sustrato unido al mismo.

Al menos uno de cada sustrato adicional puede unirse a un soporte insoluble de modo que solamente uno de una parte detectable y una parte interruptora del sustrato adicional permanecen unidos al soporte cuando dicho sustrato adicional se modifica por dicha MNAzima adicional.

- 25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una variante de secuencia de un ácido nucleico que comprende

- 30 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos que comprenden al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico capaz de autoensamblarse en presencia de un ácido nucleico para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;
- (b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene potencialmente el ácido nucleico, en presencia de al menos un primer sustrato modificable por dicha al menos una primera MNAzima, comprendiendo el sustrato una parte detectable capaz de proporcionar al menos un primer efecto detectable tras la modificación del sustrato por dicha al menos una primera MNAzima en condiciones que permiten:
- 35 (1) el autoensamblaje de la MNAzima y
(2) la actividad catalítica de la MNAzima; y
- (c) en el que la ausencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de una variante de secuencia en dicho ácido nucleico.

- 40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de al menos un ácido nucleico metilado que comprende

- 45 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en el que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de ácido nucleico metilado para formar al menos una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;
- (b) proporcionar al menos un primer sustrato, siendo capaz dicho primer sustrato de modificarse por dicha primera MNAzima, en el que dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona al menos una primer efecto detectable;
- 50 (c) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene el ácido nucleico metilado en condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de la MNAzima catalíticamente activa y
(2) la actividad catalítica de la MNAzima; y

(d) determinar la presencia de dicho al menos un efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicho al menos un ácido nucleico metilado.

Las condiciones pueden comprender adicionalmente una temperatura que facilita la hibridación de dicha MNAzima con dicho ácido nucleico metilado pero no con ácido nucleico no metilado.

5 El procedimiento puede comprender adicionalmente amplificar el efecto detectable mediante el uso de una cascada de amplificación del efecto detectable. La cascada de amplificación del efecto detectable puede comprender uno o más de una cascada de ribozima/ligasa, una cascada de enzima de ácido nucleico circular, una cascada de enzima proteica o una o más enzimas unidas a un soporte, o cualquier combinación de las mismas.

10 La fuente de dicho ácido nucleico metilado puede seleccionarse del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, de arqueas o cualquier combinación de las mismas.

El ácido nucleico metilado puede seleccionarse del grupo que comprende ARN metilado o ADN metilado.

El autoensamblaje de la enzima de ácido nucleico multicomponente puede requerir contacto del ácido nucleico metilado con uno o ambos de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos.

15 El procedimiento puede comprender adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos uno de dicho sustrato o dicho primer o segundo componentes oligonucleotídicos o una combinación de los mismos unidos al mismo.

20 El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

El sustrato puede comprender una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce.

25 La modificación puede seleccionarse del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces estéricos o enlaces de amida.

El procedimiento puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, siendo capaces dicho al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos de autoensamblarse en presencia de al menos un ácido nucleico metilado adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional y

30 en el que al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, siendo capaz dicho sustrato adicional de modificarse por dicha MNAzima adicional, en el que dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.

El al menos un efecto detectable adicional puede ser detectable de forma independiente.

Cada uno de los sustratos adicionales pueden ser el mismo, diferente o una combinación de los mismos.

35 Al menos uno de dicho sustrato adicional puede estar unido a un soporte insoluble de modo que solamente uno de una parte detectable adicional y una parte interruptora adicional del sustrato adicional permanece unido al soporte cuando dicho sustrato adicional se modifica por dicha MNAzima adicional.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar al menos un facilitador de ensamblaje usando una cascada de amplificación que comprende

40 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos que comprenden al menos un primer componente oligonucleotídico y al menos un segundo componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador de ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;

45 (b) proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un primer sustrato unido al mismo, siendo capaz dicho primer sustrato de modificarse por dicha MNAzima, en el que dicho primer sustrato comprende al menos una tercera molécula que comprende al menos una primera enzima catalíticamente activa que se libera tras la modificación de un sustrato por dicha primera MNAzima;

50 (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene dicho facilitador de ensamblaje, en presencia de dicho soporte insoluble que tiene dicho primer sustrato unido al mismo en condiciones que permiten:

- (1) el autoensamblaje de dicha MNAzima y
- (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima; y

- (d) proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un segundo sustrato unido al mismo, siendo dicho segundo sustrato escindible por dicha primera enzima catalíticamente activa en el que dicho segundo sustrato comprende al menos una cuarta molécula que comprende al menos un resto detectable que se libera tras la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima; y
- (e) en el que dicha primera enzima catalíticamente activa modifica una pluralidad de dicho segundo sustrato liberando de este modo una pluralidad de restos detectables
- (f) en el que dichos restos detectables son detectables después de la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima catalíticamente activa y
- (g) en el que la detección de dichos restos detectables es indicativa de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje.

Los restos detectables pueden comprender adicionalmente una segunda enzima catalíticamente activa adicional capaz de modificar dicho primer sustrato liberando de este modo enzima catalíticamente activa adicional. Al menos una de dicha primera o dicha segunda enzima catalíticamente activa puede seleccionarse del grupo que comprende MNAzimas, ADNzimas, ribozimas, enzimas hidrolíticas, endonucleasas de restricción, exonucleasas, proteasas, proteinasas, hidrolasas, liticasas, peptidasas, dipeptidasas, esterasas, caspasas, catepsinas, desulfhidrasas, amidasas, glucosidasas.

El facilitador de ensamblaje puede comprender una diana a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede seleccionarse del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos. El ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNip, ARNhp, ARNm, ARNt, ARNnop, ARNtp, ARNmp, pre- y pri-microARN y otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar una diana usando una cascada de amplificación de señal mediada por MNAzima que comprende

- (a) proporcionar un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de dicha diana para formar una primera enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;
- (b) proporcionar un soporte insoluble que tiene un primer y un segundo sustrato unido al mismo, siendo capaces dicho primer y segundo sustrato de modificarse por dicha primera MNAzima, en el que dicho primer y segundo sustratos comprenden al menos un tercer y un cuarto componentes oligonucleotídicos respectivamente, capaces de formar una segunda MNAzima catalíticamente activa, en el que dicho tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos se liberan tras la modificación de dicho primer y segundo sustratos por dicha primera MNAzima;
- (c) proporcionar dicho soporte insoluble que tiene un tercer y un cuarto sustrato unido al mismo, siendo capaces dicho tercer y cuartos sustratos de modificarse por dicha segunda MNAzima, comprendiendo dicho tercer y cuarto sustratos al menos un quinto y un sexto componentes oligonucleotídicos respectivamente, capaces de formar una tercera MNAzima catalíticamente activa, en el que dicho quinto y dicho sexto componentes oligonucleotídicos se liberan tras la modificación de dicho tercer y cuarto sustratos por dicha segunda MNAzima y
- (d) proporcionar un facilitador de ensamblaje capaz de facilitar el ensamblaje de dicha segunda y dicha tercera MNAzima;
- (e) proporcionar un quinto sustrato que es capaz de modificarse por dicha segunda MNAzima para proporcionar un efecto detectable;
- (f) poner en contacto dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene dicha diana, en presencia de dicho facilitador de ensamblaje y en presencia de dicho soporte insoluble que tiene dichos primer, segundo, tercer y cuartos sustratos unidos al mismo en condiciones que permiten:

- (1) el autoensamblaje de dicha primera, segunda y tercera MNAzimas y
- (2) la actividad catalítica de dicha primera, segunda y tercera MNAzimas;

- (g) en el que dicha tercera MNAzima modifica dichos primer y segundo sustratos proporcionando de este modo adicionalmente dicha segunda MNAzima modificando dicha segunda MNAzima adicionalmente al menos uno de dichos tercer, cuarto y quinto sustratos proporcionando de este modo adicionalmente dicha tercera MNAzima, proporcionando de este modo adicionalmente dicho efecto detectable y
- (h) en el que la detección de dicho efecto detectable es indicativa de la presencia de dicha diana.

La diana puede identificarse, detectarse o cuantificarse. La diana puede seleccionarse del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos. El

ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNip, ARNhp, ARNm, ARNt, ARNnop, ARNtp, ARNmp, pre- y pri-microARN y otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

- 5 El quinto sustrato puede ser el mismo que o diferente de uno cualquiera de dichos primer, segundo, tercer o cuarto sustratos.

Cada uno de dichos primer, segundo, tercer o cuarto sustratos puede estar presente en el mismo soporte sólido o diferentes soportes sólidos o cualquiera combinación de los mismos.

- 10 La modificación de al menos uno de dichos primer, segundo, tercero o cuarto sustratos puede proporcionar adicionalmente un efecto detectable.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar una pluralidad de enzimas de ácido nucleico multicomponentes (MNAzima) que reconocen cada una al menos un facilitador de ensamblaje y modifican un sustrato comprendiendo el método:

(a) proporcionar una pluralidad de facilitadores de ensamblaje para identificar, detectar o cuantificar,

- 15 (b) diseñar dos o más componentes oligonucleotídicos en los que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador de ensamblaje para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa en el que cada uno de los al menos primer y segundo componentes oligonucleotídicos comprenden una parte de rama de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora,

- 20 en el que tras el autoensamblaje, la parte de rama sensora de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman ramas sensoras de la MNAzima, la parte de rama de sustrato de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman ramas de sustrato de la MNAzima y la parte de núcleo catalítico de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos forma un núcleo catalítico de la MNAzima;

- 25 y en el que las ramas sensoras de la MNAzima interaccionan con un facilitador de ensamblaje para mantener los primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para asociación de sus partes de núcleo catalítico respectivas para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, siendo capaz dicho núcleo catalítico de actuar en al menos un sustrato y en el que las ramas de sustrato de la MNAzima interaccionan con un sustrato de modo que el núcleo catalítico de la MNAzima puede modificar dicho sustrato;

- 30 (c) alterar dichos dos o más componentes oligonucleotídicos de modo que la parte de rama de sustrato y la parte de núcleo catalítico de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos es constante y la parte de rama sensora de al menos uno de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos se adapta para reconocer otro de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje, y

(d) repetir la etapa de alteración para cada uno de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje.

- 35 De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un kit para detectar la presencia de una pluralidad de dianas que comprenden una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una pluralidad de MNAzimas correspondiendo cada una a al menos una de una pluralidad de dianas y al menos un sustrato.

- 40 De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un kit para ensamblar una pluralidad de MNAzimas que comprenden una pluralidad de facilitadores de ensamblaje, una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una pluralidad de MNAzimas correspondiendo cada una a cada uno de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje y al menos un sustrato.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un kit para detectar una diana que comprende una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una MNAzima que corresponde a la diana y un sustrato.

Breve descripción de los dibujos

- 45 Se describirá ahora una realización preferida de la presente invención, solamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 50 **Figura 1: Diseño para una MNAzima:** se muestra una representación de un diseño ejemplar para una MNAzima, en la que las partes de rama de sustrato (A) de las partezimas A y B se unen a un sustrato indicador, al que se une un marcador fluorescente (izquierda) y un interruptor (derecha). Las partes del núcleo catalítico (C) se localizan entre las partes de rama de sustrato (A) y las partes de rama sensora (B). Tras la unión de las partes de ramas sensoras (B) a una diana, el sustrato indicador se escinde en el Sitio de Escisión de MNAzima, aumentando de este modo la fluorescencia.

Figura 2: Estrategias para detección de diana mediada por MNAzima: se muestra un diagrama de flujo que muestra las aplicaciones ejemplares de procedimientos para la detección de diana usando MNAzimas. Las MNAzimas pueden usarse para (1) detección directa; (2) detectar amplicones generados, por ejemplo por, PCR, SDA, LAMP, RCA, TMA, 3SR o NASBA durante, o después de, la amplificación; y (3) iniciar una cascada de amplificación de señal.

Figura 3: Procedimientos para detección de dianas usando una NdMNAzima y sustrato genéricos anclados: se muestra una representación de MNAzimas ejemplares y un procedimiento para detección de diana usando MNAzimas que escinden sustratos ligados a un soporte. En esta realización, la MNAzima se forma solamente en presencia de un facilitador de ensamblaje (diana). Cuando la MNAzima escinde el sustrato unido entre un fluoróforo e interruptor, se genera una señal. Como se muestra aquí, tras la escisión entre el fluoróforo F y el interruptor Q, hay un aumento resultante de fluorescencia. En general, el procedimiento puede diseñarse de modo que el fluoróforo F o interruptor Q puedan permanecer unidos al soporte una vez que se produce la escisión. **Panel (i):** El soporte mostrado tiene solamente un sustrato unido al mismo. **Panel (ii):** Puede haber múltiples sustratos ligados en diferentes posiciones. Cada sustrato puede escindirse solamente por una MNAzima formada en presencia de una molécula facilitadora de ensamblaje de MNAzima específica. Aquí, las dianas 1 y 2 facilitan el autoensamblaje de las MNAzimas 1 y 2 respectivamente. Por lo tanto, en este ejemplo la MNAzima 1 solamente se autoensambla en presencia de la diana 1 y solamente escinde el sustrato 1. De forma similar, la MNAzima 2 solamente se autoensambla en presencia de la diana 2 y solamente escinde el sustrato 2. La señal puede localizarse posicionando el sustrato en la superficie, permitiendo de este modo la detección específica de diferentes facilitadores de ensamblaje.

Figura 4: Procedimientos ejemplares para detección de diana: se muestran ejemplos de procedimientos que usan una MNAzima para detectar un analito diana (An), por ejemplo, incluyendo pero sin limitación una proteína o molécula pequeña. Este ejemplo muestra la generación de una señal por escisión de MNAzima de un sustrato marcado con un fluoróforo (F) y un interruptor (Q). Los diseños generales podrían usarse en otros formatos, por lo que la señal se genera por una modificación distinta de escisión y/o cuando la lectura no es fluorescente, pero, por ejemplo, es colorimétrica, radiactiva, etc. Se ilustran tres estrategias generales en esta figura. (i) Un aptámero para unión de un analito diana se liga a una partezima (una apta-partezima). Esta molécula tiene autocomplementariedad y no puede contribuir al ensamblaje de MNAzima activa en ausencia del analito diana. También se proporciona una segunda partezima, un sustrato y un facilitador de ensamblaje. Cuando un analito diana específico se une al dominio de aptámero, las bases complementarias dentro de la apta-partezima se separan permitiendo que la apta-partezima adopte una conformación por la que contribuye a activar el ensamblaje de MNAzima. La MNAzima activa puede escindir el sustrato y generar fluorescencia. (ii) Un aptámero para unión de un analito diana está ligado a un facilitador de ensamblaje. Esta molécula tiene autocomplementariedad y no puede dirigir las partezimas para que se alineen y ensamblen una MNAzima activa en ausencia de analito diana. También se proporcionan dos partezimas y un sustrato. Cuando un analito diana específico se une al dominio de aptámero, las bases complementarias dentro del facilitador de ensamblaje se separan, permitiendo que el facilitador de ensamblaje adopte una conformación por la que puede dirigir el ensamblaje de MNAzimas activas. Las MNAzimas activas pueden escindir el sustrato y generar fluorescencia. (iii) Dos apta-partezimas, cada una de las cuales contiene una parte de un aptámero, se incuban en presencia de un sustrato. En ausencia del analito diana, las dos apta-partezimas no pueden ensamblarse para formar una MNAzima activa. Cuando está presente un analito diana específico y se une a ambos dominios que contienen una parte del aptámero, las dos apta-partezimas se llevan a proximidad cercana y pueden ensamblarse en una MNAzima activa. La MNAzima activa puede escindir el sustrato y generar fluorescencia.

Figura 5: amplificación por PCR de microARN y detección usando MNAzimas: se muestra una representación de una estrategia de MNAzima para amplificación y detección de secuencias cortas tales como especies de microARN (miR). El procedimiento usa un cebador 3' que se une al miR en el extremo 3' y que tiene una secuencia de extensión no relacionada (mostrada en cajas discontinuas) que puede (partes (i) y (ii), Cebador en Bucle, izquierda) o no (partes (iii) e (iv), cebador Marcado, derecha), formar una estructura en tallo de bucle en el extremo 5'. El cebador de miR 3' se extiende en presencia de transcriptasa inversa (partes (i) y (iii)), seguido de amplificación mediante PCR usando los cebadores 5' y 3' con secuencia específica de miR en los extremos 3' y secuencia de extensión no relacionada en los extremos 5' (partes (ii) y (iv)). Los amplicones pueden detectarse por MNAzimas que hibridan con el amplicón, incluyendo la región entre los cebadores 5' y 3'. Un requisito para la complementariedad estricta de las ramas sensoras de MNAzima y el ácido nucleico diana permite la diferenciación de secuencias cercanamente relacionadas. F: fluoróforo; Q: interruptor.

Figura 6: detección de MNAzima acoplada a amplificación de señal mediada por enzima: se muestra una representación de una MNAzima para iniciar una cascada de amplificación de señal. En esta realización las MNAzimas desencadenan una cascada corriente abajo de generación de señal, en la que (de izquierda a derecha, panel superior) una MNAzima se forma solamente en presencia de una diana y después libera una enzima a partir de una posición ligada a un soporte. Como se muestra en el panel inferior, la enzima liberada escinde después una molécula de sustrato fluorescente. El sustrato fluorescente se detecta fácilmente. F: fluoróforo; Q: interruptor.

Figura 7: Detección de analitos usando MNAzimas y amplificación de señal: Una MNAzima puede desencadenar una cascada generada usando ADNzimas separadas espacialmente. Como se muestra en las etapas numeradas secuencialmente, un acontecimiento de escisión de MNAzima inicial, que se produce solamente en

presencia de diana, puede escindir el sustrato inmovilizado, liberando de este modo una primera ADNzima A ligada ("A") (etapas 1-3). La ADNzima A, una vez liberada, escinde después y libera la segunda ADNzima B ligada ("B") (marcada con fluoróforo) (etapas 4-6) que, a su vez escinde y libera la ADNzima A adicional (etapa 7-8), dando como resultado el inicio de una cascada. La amplificación de señal exponencial hace la medición fácil a medida que se libera ADNzima B con fluoróforo en la cascada consiguiente. F: fluoróforo; Q: interruptor.

Figura 8: diseño de MNAzima para diana de RPLPO: Panel (i): Secuencias ejemplares para diseños 1 (panel superior) y 2 (panel inferior) para MNAzimas **Panel (ii):** Resultados de escisión dependiente de diana de un sustrato indicador por diseños de MNAzima 1 (panel superior) y 2 (panel inferior). N=A, G, C, T o cualquier análogo; N' = cualquier nucleótido complementario a N; (N o N')_x=cualquier número de nucleótidos o análogos; K=A, G o AA; W=A o T; rN=cualquier ribonucleótido y/o cualquier número de ribonucleótidos; *=base oscilante.

Figura 9: diseño de MNAzima para diana de RPLPO: Panel (i): Secuencia ejemplar para el diseño 3 para una MNAzima; **Panel (ii):** Resultados de escisión dependiente de diana de un sustrato indicador. Las reacciones de control mostradas incluyen control de hibridación sin diana, dos controles fuera de la diana y reacciones que contienen oligonucleótidos de partezima A o partezima B, pero no ambos. N=A, G, C, T o cualquier análogo; N'=cualquier nucleótido complementario a N; (N o N')_x=cualquier número de nucleótidos o análogos; K=A, G o AA; W=A o T; rN=cualquier ribonucleótido y/o cualquier número de ribonucleótidos; *=base oscilante.

Figura 10: diseño de MNAzima para diana de RPLPO: Panel (i): Secuencia ejemplar para el diseño 4 de una MNAzima; **Panel (ii):** La eficacia de la escisión dependiente de diana para los diseños 3 y 4. Se muestran resultados para reacciones que contienen los oligonucleótidos de RPLPO diana y controles sin diana. N=A, G, C, T o cualquier análogo; N'=cualquier nucleótido complementario a N; (N o N')_x=cualquier número de nucleótidos o análogos; K=A, G o AA; W=A o T; rN=cualquier ribonucleótido y/o cualquier número de ribonucleótidos; *=base oscilante.

Figura 11: Uso de MNAzimas para diferenciar entre secuencias cercanamente relacionadas: Panel (i): Se ilustran secuencias de ADN homólogas a la hsa-miR-20 y secuencias de miR relacionadas, usadas como secuencia diana en los experimentos en las Figuras 11 y 12. Las diferencias de secuencia entre D-20 y D-miR relacionados están subrayadas. La línea discontinua en negrita vertical separa las regiones de los oligonucleótidos reconocidos por las dos ramas sensoras. **Panel (ii):** Representa las secuencias ejemplares para una MNAzima de diseño 4 para la detección de miR-20. **Panel (iii):** Resultados de escisión dependiente de diana de MNAzima D-20 de un sustrato indicador. Reacciones de control mostradas: oligonucleótidos "fuera de diana" (D-17-5p, D-106a, D-106b, D-93) y reacciones de control "sin diana" (dH₂O).

Figura 12: optimización de MgCl₂ del sistema de MNAzima de MiR-20: Resultados obtenidos usando un sistema de MNAzima de diseño ejemplar 4 para detección de miR-20. Escisión dependiente de diana (D-20) de un sustrato indicador. Se muestran reacciones de control que contienen secuencias "fuera de diana" (D-17-5p, D-106a, D-106b, D-93) o "sin diana" (dH₂O), para reacciones que contienen MgCl₂ (i) 5 mM, (ii) 25 mM o (iii) 100 mM, respectivamente.

Figura 13: diseño de MNAzima para diana de RPLPO: Panel (i): Secuencias ejemplares para los diseños 5 y 6 para MNAzimas. **Panel (ii):** Resultados para escisión dependiente de diana de un sustrato indicador usando los diseños 5 y 6 y sus controles "sin diana". N=A, G, C, T o cualquier análogo; N'=cualquier nucleótido complementario a N; (N o N')_x=cualquier número de nucleótidos o análogos; R=A o G; Y=C o U; rN= base ribonucleotídica.

Figura 14: Detección de RPLPO amplificado por PCR: Resultados para escisión dependiente de diana de un sustrato indicador y diversas reacciones de control por el sistema de MNAzima de diseño 4 que se dirige al gen de RPLPO humano. La reacción de MNAzima de RPLPO contenía (i) oligonucleótidos de RPLPO de control, (ii) amplicones por PCR de RPLPO (5 µl) producidos por amplificación de ADN genómico humano (100 ng) usando cebadores complementarios al gen de RPLPO, (iii) reacciones de PCR de RPLPO "sin diana" que carecen de ADN genómico o (iv) ADN genómico humano no amplificado (500 ng).

Figura 15: Detección de secuencias cortas amplificadas (22mer): Panel (i): Resultados para escisión dependiente de diana de un sustrato indicador por un sistema de MNAzima de diseño 4 que se dirige a la secuencia de miR-20 humana. Las reacciones de MNAzima de miR-20 se realizaron con (i) 10¹² (1 E+12) copias del oligonucleótido diana D-20 de control (no amplificado); (ii) amplicones de PCR (5 µl) producidos por amplificación de 2 x 10⁷ (2 E+7) copias del oligonucleótido diana D-20 usando cebadores complementarios para las secuencias de miR-20; (iii) reacciones de PCR "sin diana" que carecen del oligonucleótido diana D-20; (iv) 10⁸ (1 E+8) copias de oligonucleótido diana D-20 (no amplificado); y (v) una diana D-17-5p de control "fuera de diana" (2 x 10⁷ (2 E+7) copias amplificadas por PCR). **Panel (ii):** Comparación de la secuencia diana D-20 y secuencia fuera de diana, D-17-5p. El oligonucleótido D-17-5p tiene un emparejamiento erróneo dentro de la región de unión del cebador de PCR en relación con la secuencia diana D-20 y un emparejamiento erróneo dentro de la región (localizada entre los cebadores) que interacciona con las ramas sensoras de las MNAzimas.

Figura 16: Detección de amplicones de miR-20 amplificados: Ejemplo de detección de punto final de amplicones usando MNAzimas después de amplificación por PCR. Se usó PCR para amplificar microARN miR-20 presente en ARN total de células del timo humanas y se detectó usando metodología de MNAzima. Las muestras amplificadas y

los controles son como se muestra.

Figura 17: Análisis de PCR en tiempo real cuantitativa de exón 5 de RPLPO por diseño de MNAzima 6: Ejemplo de detección a tiempo real y cuantificación usando metodología de MNAzima, en el que el gen de RPLPO se detectó usando MNAzimas para controlar la acumulación de exón 5 de RPLPO. **Panel (i):** diseño de MNAzima 6; **Panel (ii):** señal de fluorescencia que indica PCR en tiempo real para diferentes cantidades de molde como se muestra; **Panel (iii):** curva patrón y cuantificación de material amplificado. Los resultados muestran aumento dependiente del tiempo de la fluorescencia para detección de MNAzima de ADN genómico humano amplificado mediante PCR. $R^2=0,995$; pendiente = -3,698

Figura 18: Representación esquemática de un análisis múltiple ejemplar de dianas múltiples: Pueden detectarse simultáneamente dos o más dianas usando dos o más sustratos, cada uno específico para una MNAzima. Los sustratos se marcan preferentemente con diferentes fluoróforos. En este ejemplo, la diana 1 puede detectarse controlando el aumento de fluorescencia de FAM y la diana 2 puede detectarse controlando el aumento de fluorescencia de JOE. Q: interruptor; FAM, JOE: fluoróforos.

Figura 19: Detección múltiple y sencilla de secuencias de RPLPO y D-20: La detección de RPLPO se controló usando un sustrato marcado con JOE y la detección de la secuencia diana D-20 se controló usando un sustrato marcado con FAM. **Panel (i):** la MNAzima de diseño 6 comprende partezimas para solamente un sistema de MNAzima, para RPLPO (panel superior) o D-20 (panel inferior); **Panel (ii):** el diseño de MNAzima 6 contiene partezimas para MNAzimas que se dirigen tanto a RPLPO como a D-20.

Figura 20: detección de MNAzima de dianas usando un aptámero: Se representa una estrategia ejemplar para la detección de una diana. En esta estrategia, se incorpora una secuencia de aptámero en el extremo de una partezima (apta-partezima) en una configuración por la que una MNAzima activa solamente se forma en presencia de la diana. Los componentes oligonucleotídicos requeridos para la estrategia de detección de MNAzima ilustrada incluye: (a) una partezima convencional; (b) una apta-partezima que es una partezima con un aptámero incorporado en uno de sus extremos; (c) un facilitador de ensamblaje que se une a tanto la partezima como a la partezima que permite el ensamblaje de una MNAzima activa (en presencia de diana); (d) un sustrato sonda indicador y (e) un inhibidor de ensamblaje que hibrida con la aptapartezima en una región que abarca al menos parte de la secuencia del aptámero y parte de la rama de unión al sustrato de la secuencia de la partezima. En ausencia de un analito diana (**panel (i)**), el inhibidor de ensamblaje se une a la apta-partezima bloqueando de este modo la unión (y escisión) del sustrato sonda indicador. En presencia de un analito diana (**panel (ii)**), la diana se une a la secuencia del aptámero de la apta-partezima, evitando la unión del inhibidor de ensamblaje y permitiendo la unión y escisión del sustrato sonda indicador. Como tal, las MNAzimas sólo se pueden formar y provocar generación de señal de fluorescencia en presencia de diana.

Figura 21: detección de MNAzima de moléculas pequeñas usando un aptámero: Se representa un ejemplo de uso de MNAzimas para la detección de dianas, específicamente ATP. La estrategia ilustrada en la Figura 20 se demostró usando el ejemplo de detección de una molécula pequeña, ATP. El **Panel (i)** ilustra las secuencias de los componentes oligonucleotídicos que se usaron para la detección de ATP. Estos comprenden una partezima, una aptapartezima (que incorpora un aptámero para la unión de ATP), un inhibidor de ensamblaje de aptámero/MNAzima, un sustrato indicador y un facilitador de ensamblaje. El análisis de escisión de SubBi-1-FB del **panel (ii)** muestra los resultados obtenidos después de la incubación de los componentes oligonucleotídicos en presencia, o ausencia, de ATP y otros nucleótidos. Se observó un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo en presencia de ATP, y dATP, pero no en presencia de GTP o CTP. Además, no se observó aumento de fluorescencia en ausencia de ninguna diana (control solamente con agua).

Figura 22: Detección de emparejamientos erróneos de base sencilla usando MNAzimas: Se representa un ejemplo de uso de MNAzimas para detección de emparejamientos erróneos de base sencilla. El panel (i) ilustra las secuencias de los componentes oligonucleotídicos que se usaron para la detección de emparejamientos erróneos de base sencilla en una secuencia diana del exón 5 de RPLPO. El oligonucleótido ilustrado comprendía dos partezimas (A5 y B6) que se basan en el diseño de MNAzima 7 (por ejemplo Ejemplo 20) y un sustrato indicador. La tercera base (X) en la rama sensora de partezima B es coincidente o está emparejada de forma errónea con la secuencia diana. Cuando X = G la partezima y diana son completamente coincidentes. Cuando X = C existe un emparejamiento erróneo entre la rama sensora y la RPLPO diana. El **panel (ii)** muestra los resultados obtenidos después de amplificación por PCR y detección en tiempo real en reacciones que contienen una partezima B que es completamente coincidente o está emparejada de forma errónea con respecto a la diana de RPLPO.

Figura 23: La estrategia de MNAzima y resultados para detección de SNP: El procedimiento usa una rama sensora de partezima B truncada que se empareja completamente con una versión de la SNP y oligonucleótido estabilizador que facilita el ensamblaje de MNAzima en presencia de la diana completamente coincidente. El requisito de complementariedad estricta de la rama sensora de partezima B y el ácido nucleico diana permite la diferenciación de secuencias cercanamente relacionadas. **Panel (i):** Rama sensora de 5 bases completamente coincidentes más oligonucleótido estabilizador; **Panel (ii):** Rama sensora de 5 bases emparejada erróneamente más oligonucleótido estabilizador; **Panel (iii):** Control sin estabilizador; **Panel (iv):** Control sin diana; **Panel (v):** Resultados de detección de SNP por MNAzima con diana completamente coincidente, diana emparejada

erróneamente, control sin estabilizador y control sin diana.

Figura 24: Adaptación de detección de MNAzima para producir una reacción de cambio de color: El procedimiento usa partículas de oro a nanoescala con oligonucleótidos unidos, que, cuando se enlazan por oligonucleótidos puente, forman un agregado azul (panel i). Los oligonucleótidos puente incorporan una secuencia de sustrato. En presencia de diana (panel ii) la MNAzima se ensambla y escinde la secuencia sustrato, liberando partículas de oro individuales y dando como resultado un cambio de color de azul a rojo que es visible al ojo desnudo.

Figura 25: Ejemplo de una cascada de MNAzima usando partezimas unidas: Las MNAzimas pueden usarse para iniciar cascadas de amplificación de señal como se ilustra en este diagrama. La reacción contiene los siguientes elementos: (i) partezimas para MNAzima 1 que están libres en solución; (ii) un facilitador de ensamblaje para MNAzimas 2 y 3 (que tienen las mismas ramas sensoras) que está libre en solución (como se ilustra) o ligado a un soporte insoluble por sustrato, Sub1; (iii) partezimas para MNAzima 2 que están ligadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 1. Sub 1 puede escindirse por MNAzima 1 (en presencia de una diana) o MNAzima 3 (en presencia de un facilitador de ensamblaje) y la escisión da como resultado la liberación de las partezimas para MNAzima 2 en solución; (iv) partezimas para MNAzima 3 que se ligan a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 2. Sub 2 puede escindirse por MNAzima 2 (en presencia de un facilitador de ensamblaje) y la escisión da como resultado la liberación de las partezimas para MNAzima 3 en solución; (v) Sub 2-FQ, que tiene la misma secuencia que Sub 2, pero está libre en solución y está marcado de forma dual con un fluoróforo (F) y un interruptor (Q). Sub 2-FQ puede escindirse por MNAzima 2 para generar una señal fluorescente. En presencia de la diana, la MNAzima 1 activa se forma a partir de partezimas que están libres en solución. La MNAzima 1 escinde su Sub 1 liberando de este modo partezimas para MNAzima 2. Una vez libres, estas partezimas hibridan con el facilitador de ensamblaje y forman MNAzima 2, que escinde Sub 2-FQ libre (generando una señal fluorescente) o Sub 2 ligado (liberando partezimas para MNAzima 3). Puesto que la MNAzima 3 comparte las mismas ramas de sustrato que la MNAzima 1, también puede escindir Sub 1 unido, liberando de este modo más partezimas para MNAzima 2. Esto da como resultado una cascada de generación enzimática de los componentes (partezimas) para más enzimas (MNAzimas) y una cascada de amplificación de señal conjunta.

Definiciones

Se usan en el presente documento ciertos términos que tendrán los significados expuestos como sigue.

El término “comprendiendo” significa “incluyendo principalmente, pero no necesariamente solamente”. Además, variaciones de la palabra “comprendiendo”, tales como “comprender” y “comprende”, tienen significados variados correspondientes.

Las expresiones “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” pueden usarse de forma intercambiable y se refieren a un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas o análogos, derivados, variantes, fragmentos o combinaciones de los mismos, incluyendo pero sin limitación ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNip, ARNhp, ARNm, ARNt, ARNnop, ARNtp, ARNmp, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Como ejemplo no limitante, la fuente de un ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, de arqueas o cualquier combinación de las mismas.

Los términos “oligonucleótido” y “cebador” típicamente indican un segmento de ADN o una molécula de ácido nucleico que contiene ADN o ARN o molécula que contiene ARN o una combinación de las mismas. Los ejemplos de oligonucleótidos incluyen dianas de ácido nucleico; sustratos, por ejemplo, los que pueden modificarse por una MNAzima; cebadores tales como los usados para amplificación de la diana *in vitro* por procedimientos tales como PCR; y componentes de MNAzimas. Los facilitadores de ensamblaje de MNAzima, en ciertas realizaciones, pueden comprender oligonucleótidos como se han definido en el presente documento. Las partezimas como se usan en el presente documento también pueden comprender oligonucleótidos.

Las expresiones “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” incluyen referencia a cualquier secuencia especificada así como la secuencia complementaria de la misma, a no ser que se indique de otro modo. Los oligonucleótidos pueden comprender al menos una adición o sustitución, incluyendo pero sin limitación el grupo que comprende 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroxi)metiluridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil tiouridina, dihidouridina, 2'-O-metilpseudouridina, beta D-galactosilqueosina, 2'-O-metilguanosina, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, beta D-manosilmetiluridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurin-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurin-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, metiléster de ácido uridin-5-oxiacético, ácido uridin-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurin-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, beta D-arabinosil uridina, beta D-

arabinosil timidina.

Las expresiones “molécula de ácido nucleico catalítica”, “ácido nucleico catalítico”, “enzima de ácido nucleico” y “secuencia de ácido nucleico catalítico” se usan en el presente documento de forma intercambiable y significarán una molécula de ADN o molécula que contiene ADN (también conocida en la técnica como una “enzima de ADN”, “desoxirribosima” o “ADNzima”) o ARN o molécula que contiene ARN (conocido en la técnica como una “enzima de ARN” o “ribosima”) o una combinación de las mismas, que es una molécula híbrida de ADN-ARN, que puede reconocer un sustrato y catalizar una modificación de un sustrato. Los restos nucleotídicos en los ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir las bases A, C, G, T y U, así como derivados y análogos de las mismas.

El término “derivado” cuando se usa en relación con un ácido nucleico o nucleótido de la presente invención incluye cualquier ácido nucleico o nucleótido funcionalmente equivalente, incluyendo cualquier molécula de fusión producida de forma integral, (por ejemplo, por medio recombinante) o añadida después de la síntesis (por ejemplo, por medios químicos). Tales fusiones pueden comprender oligonucleótidos de la invención con ARN o ADN añadido a los mismos o conjugados con un polipéptido (por ejemplo, puromicina u otro polipéptido), una molécula pequeña (por ejemplo soraleno) o un anticuerpo.

El término “análogo” cuando se usa en relación con un ácido nucleico o nucleótido incluye un compuesto que tiene una estructura física que está relacionada con una molécula o resto de ADN o ARN y puede ser capaz de formar un enlace de hidrógeno con un resto de ADN o ARN o un análogo del mismo (es decir, es capaz de hibridar con un resto de ADN o ARN o un análogo del mismo para formar un par de bases), pero dicho enlace no se requiere para que dicho compuesto esté abarcado dentro del término “análogo”. Tales análogos pueden poseer propiedades químicas y biológicas diferentes para el resto ribonucleotídico o desoxirribonucleotídico con el que se relacionan estructuralmente. Son ejemplos de análogos los restos metilados, yodados, bromados o biotinilados. Se han descrito ADNzimas activas que contienen análogos nucleotídicos, incluyendo desoxiinosina, C-5-imidazol desoxiuridina, 3-(aminopropil)-7-desaza-dATP, 2'-O-metil ARN, protección de 2' O-metilo (Warashina y col., 1999; Cairns y col., 2003; Schubert y col., 2004; Sidorov y col., 2004). Otros análogos son compatibles con la actividad catalítica de las ADNzimas. La alteración de una secuencia de ácido nucleico catalítico, por ejemplo por sustitución de una base por otra, por sustitución con un análogo de una base o alteración del componente de azúcar o cadena principal de fosfodiéster, puede ser sencilla para el experto en la materia. Por ejemplo, pueden realizarse alteraciones durante la síntesis o por modificación de bases específicas después de la síntesis. Los ensayos empíricos de ácidos nucleicos catalíticos que incorporan alteraciones tales como cambios de base o análogos de base posibilitan la evaluación del impacto de las secuencias alteradas, o análogos específicos, en la actividad catalítica. Se conocen en la técnica análogos de las bases A, C, G, T y U y se enumera un subconjunto en la Tabla 2.

Tabla 2: Ejemplo de análogos de nucleótidos útiles en el presente documento

Abreviatura	Nombre
ac4c	4-acetilcitidina
chm5u	5-(carboxihidroximetil)uridina
Cm	2'-O-metilcitidina
Cmm5s2u	5-carboximetilaminometil tiouridina
D	Dihidrouridina
Fm	2'-O-metilseudouridina
Galq	beta, D-galactosilqueosina
Gm	2'-O-metilguanosina
1	Inosina
i6a	N6-isopenteniladenosina
m1a	1-metiladenosina
m1f	1-metilseudouridina
m1g	1-metilguanosina
M11	1-metilinosina
m22g	2,2-dimetilguanosina

(cont)	
Abreviatura	Nombre
m2a	2-metiladenosina
m2g	2-metilguanosina
m3c	3-metilcitidina
m5c	5-metilcitidina
m6a	N6-metiladenosina
m7g	7-metilguanosina
mam5u	5-metilaminometiluridina
mam5s2u	5-metoxiaminometil-2-tiouridina
Manq	beta, D-manosilmetiluridina
mcm5s2u	5-metoxicarbonilmetiluridina
Mo5u	5-metoxiuridina
Ms2i6a	2-metiltio-N6-isopenteniladenosina
Ms2t6a	N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurina-6-il)carbamoil)treonina
Mt6a	N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metil-carbamoil)treonina
Mv	Metiléster de ácido uridin-5-oxiacético
o5u	Ácido uridin-5-oxiacético (v)
Osyw	Wibutoxosina
P	Seudouridina
Q	Queosina
s2c	2-tiocitidina
s2t	5-metil-2-tiouridina
s2u	2-tiouridina
s4u	4-tiouridina
T	5-metiluridina
t6a	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurin-6-il)carbamoil)treonina
Tm	2'-O-metil-5-metiluridina
Um	2'-O-metiluridina
Yw	Wibutosina
X	3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, (acp3)u
AraU	beta D-arabinosiluridina
AraT	beta D-arabinosilimidina

El término “fragmento” cuando se usa en relación con un ácido nucleico se refiere a un constituyente de ese ácido nucleico. Típicamente el fragmento posee actividad biológica cualitativa en común con el ácido nucleico, aunque

este no tiene que ser necesariamente el caso. Los fragmentos de un ácido nucleico no tienen que codificar necesariamente polipéptidos que conservan actividad biológica. Más bien, un fragmento de ácido nucleico puede, por ejemplo, ser útil como una sonda de hibridación u oligonucleótido de PCR. El fragmento puede derivarse de un ácido nucleico de la invención o como alternativa puede sintetizarse por algún otro medio, por ejemplo síntesis química.

El término "variante" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de ácido nucleico o polipéptido sustancialmente similares. Generalmente, las variantes de secuencia poseen actividad biológica cualitativa en común. Además, tales variantes de secuencia pueden compartir al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. También se incluye dentro del significado del término "variante" homólogos, que son típicamente un polipéptido o ácido nucleico de una especie diferente pero que comparte sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido correspondiente o ácido nucleico desvelado en el presente documento.

La expresión "alta rigurosidad" como se usa en el presente documento se refiere a las condiciones en las que dos ácidos nucleicos pueden hibridar y puede incluir, por ejemplo, la concentración de sales y/o detergentes en una solución, la temperatura de una solución que se usa durante la hibridación de los dos ácidos nucleicos y el periodo de tiempo de la hibridación. En consecuencia, la expresión "alta rigurosidad" como se usa en el presente documento se refiere a condiciones en una solución que son propiciadoras de hibridación de dos ácidos nucleicos solamente cuando tales ácidos nucleicos comparten un alto grado de complementariedad. El grado de complementariedad puede incluir, pero sin limitación, un intervalo de aproximadamente 50 % a 99 %. Por lo tanto, las condiciones de "alta rigurosidad" pueden implicar, pero sin limitación, el uso de una temperatura variante y un tampón que comprende diversas concentraciones de detergentes, sales y cationes divalentes.

Las expresiones "molécula facilitadora del ensamblaje", "facilitador del ensamblaje", "molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima", "facilitador" y "facilitador del ensamblaje de MNAzima" como se usan en el presente documento se refieren a entidades que pueden facilitar el autoensamblaje de partezimas componentes para formar una MNAzima catalíticamente activa. Se requiere un facilitador del ensamblaje para el autoensamblaje de una MNAzima. Un facilitador del ensamblaje en algunas realizaciones comprende una diana tal como un analito de ácido nucleico o no de ácido nucleico. Las moléculas facilitadoras del ensamblaje pueden comprender una o más regiones o moléculas que pueden emparejarse con, o unirse a, una o más "partezimas" oligonucleotídicas, que constituyen componentes o partes de una "MNAzima". No se requiere que el facilitador de ensamblaje interaccione con, se empareje con, o se una a, cada partezima componente u oligonucleótido proporcionado con el que interacciona, se empareja o se une, al menos una de las partezimas componentes de una MNAzima. Como se usa en el presente documento, se pretende que las moléculas facilitadoras de ensamblaje de MNAzima abarquen el intervalo más amplio de constituyentes que pueda facilitar autoensamblaje de una MNAzima. En algunas realizaciones, un facilitador de ensamblaje puede comprender un ácido nucleico. En otras realizaciones, un facilitador de ensamblaje puede comprender cualquier célula o cualquier parte de la misma, por ejemplo, cualquier célula eucariota o procariota, un virus, prión, levadura, hongo, o cualquier otra molécula, por ejemplo, incluyendo pero sin limitación una proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico. En otras realizaciones, un facilitador de ensamblaje puede comprender un virus, prión, levadura u hongo, o cualquier otra molécula, por ejemplo, incluyendo pero sin limitación glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos.

El término "diana" como se usa en el presente documento incluye cualquier entidad natural o sintética, constituyente o analito que se busca detectar, identificar o cuantificar por una MNAzima o MNAzimas particulares. Las dianas abarcan por lo tanto el intervalo más amplio de entidades detectables, constituyentes o analitos para los que los procedimientos de detección sensible, identificación y/o cuantificación son deseables. En algunas realizaciones, una diana comprende un facilitador de ensamblaje. Algunas dianas ejemplares incluyen, pero sin limitación, proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, levaduras, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos. También se contemplan otras dianas para su uso en el presente documento.

Las expresiones "sustrato", "molécula sustrato" y "sustrato químico" como se usan en el presente documento incluyen cualquier molécula que sea capaz de reconocerse y sobre la que actúe o se modifique químicamente por una molécula catalítica. En realizaciones particulares, puede reconocerse un sustrato y modificarse por una enzima. En otras realizaciones, puede reconocerse un sustrato y modificarse por una molécula de ácido nucleico catalítica. La modificación química de un sustrato puede medirse por la aparición de, o aumento en, un producto de la reacción de modificación o por la desaparición de, o reducción en, un sustrato de la reacción o reacciones de modificación. Una molécula catalítica particular puede reconocer una o más moléculas de sustrato diferentes siempre que cada molécula sustrato tenga al menos una estructura mínima que sea reconocible para actividad catalítica por la molécula catalítica.

Un "sustrato indicador", "sonda indicadora" o "sustrato sonda indicador" como se usa en el presente documento es un sustrato que se adapta particularmente para facilitar la medición de la desaparición de un sustrato o la aparición

de un producto en relación con una reacción catalizada. Los sustratos indicadores pueden estar libres en solución o unidos (o “ligados”), por ejemplo, a una superficie o a otra molécula. Un sustrato indicador puede marcarse por cualquiera de una gran diversidad de medios incluyendo, por ejemplo, fluoróforos (con o sin uno o más componentes adicionales, tales como interruptores), marcadores radiactivos, marcaje con biotina (por ejemplo biotinilación) o marcadores quimioluminiscentes. Los sustratos indicadores para ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir también enzimas de ácido nucleico o proteicas, por ejemplo, unidas covalentemente a sus extremos.

Como se usan en el presente documento, los sustratos “genéricos” o “universales” son sustratos, por ejemplo sustratos indicadores, que se reconocen por y sobre los que actúan catalíticamente una pluralidad de MNAzimas, cada una de las cuales puede reconocer una diana diferente. El uso de tales sustratos facilita el desarrollo de ensayos separados para detección, identificación o cuantificación de una amplia diversidad de dianas usando MNAzimas estructuralmente relacionadas todas las cuales reconocen un sustrato universal. Estos sustratos universales pueden marcarse cada uno independientemente con uno o más marcadores. En realizaciones preferidas, se usan marcadores detectables de forma independiente para marcar uno o más sustratos genéricos para permitir la creación de un sistema conveniente para detectar independiente o simultáneamente una diversidad de dianas usando MNAzimas.

Como se usan en el presente documento, los términos “partezima”, “partezima componente” y “oligonucleótido componente” se refieren a un oligonucleótido que contiene ADN, que contiene ARN o que contiene ADN-ARN, dos o más de los cuales, solamente en presencia de una molécula facilitadora de ensamblaje de MNAzima, pueden formar juntas una “MNAzima”. En ciertas realizaciones preferidas, una o más partezimas componentes, y preferentemente al menos dos, pueden comprender tres regiones o dominios: un dominio “catalítico”, que forma parte del núcleo catalítico de la MNAzima que cataliza una modificación química; un dominio de “rama sensora”, que puede asociarse con y/o unirse a un facilitador de ensamblaje (por ejemplo una diana); y un dominio de “rama de sustrato”, que puede asociarse con y/o unirse a un sustrato. Puede verse una representación de estas regiones o dominios, por ejemplo, en la Figura 1. Una partezima puede comprender una o más moléculas. Las partezimas pueden comprender al menos un componente adicional incluyendo pero sin limitación un aptámero, denominado en el presente documento “aptapartezima”. Una partezima también puede incluir un sustrato, como puede verse, por ejemplo, en la Figura 25.

El término “MNAzima” como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más secuencias oligonucleotídicas (por ejemplo partezimas) que, solamente en presencia de molécula facilitadora de ensamblaje de MNAzima (por ejemplo, una diana), forman una enzima de ácido nucleico activa que es capaz de modificar de forma catalítica un sustrato. Una MNAzima ejemplar que comprende partezima A y partezima B se representa en la Figura 1. En referencia a la Figura 1, las partezimas de ADN A y B se unen cada una a una diana (por ejemplo a través de formación de pares de bases de Watson-Crick con una diana de ácido nucleico). La MNAzima solamente se forma cuando las ramas sensoras de las partezimas A y B hibridan adyacentes entre sí en la diana. Las ramas de sustrato de la MNAzima interaccionan con el sustrato indicador, la escisión del cual se cataliza por el núcleo catalítico de la MNAzima, formado por la interacción de los dominios catalíticos de las partezimas A y B. La MNAzima escinde el sustrato entre un par de fluoróforo y un colorante interruptor, generando de este modo señal. La escisión de una quimera de ADN/ARN (sustrato indicador) se ejemplifica en el dibujo. Las expresiones “enzima de ácido nucleico multicomponente” y “MNAzima” se usa en el presente documento de forma intercambiable y comprenden estructuras bipartitas, compuestas de dos moléculas, estructuras tripartitas, compuestas de tres moléculas de ácido nucleico u otras estructuras multipartitas, por ejemplo las formadas por cuatro o más moléculas de ácido nucleico. Una MNAzima también puede comprender un oligonucleótido estabilizador que proporciona estabilidad de la MNAzima interaccionando con un facilitador de ensamblaje o sustrato. Resulta evidente que la formación de una MNAzima requiere el ensamblaje de al menos los componentes de partezima con el facilitador de ensamblaje, así como la unión de un sustrato, para que la actividad catalítica sea detectable y que la ausencia de cualquiera de estos componentes de cómo resultado una falta de actividad catalítica.

Como se usa en el presente documento un “aptámero” puede comprender una estructura que tiene la capacidad de reconocer uno o más ligandos. Por ejemplo, el reconocimiento puede tener un alto grado de especificidad debido a estructura de mayor nivel del aptámero, tal como, un dominio o bolsillo de unión tridimensional. Los aptámeros pueden por lo tanto unirse a proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos o cualquier otra entidad. Los aptámeros preferidos en el presente documento pueden comprender ADN monocatenario corto u oligómeros de ARN que pueden aislarse de librerías complejas de ácido nucleico sintético por un procedimiento por iteraciones de adsorción, recuperación y reamplificación. Los aptámeros pueden por lo tanto generarse contra casi cualquier diana, variando desde moléculas pequeñas tales como aminoácidos o antibióticos a proteínas y estructuras de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término “cascada” se refiere a cualquier sucesión de procesos u operaciones que se producen en etapas sucesivas, en las que la aparición de cada etapa depende típicamente de aparición de una etapa precedente. Una cascada puede por lo tanto incluir, pero sin limitación, una cascada enzimática, o cualquier otra cascada de transducción de señal. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender amplificación de una señal resultante de actividad catalítica de una MNAzima. En realizaciones

preferidas, una cascada de amplificación tal puede implicar amplificación repetida y por lo tanto cíclica de una señal, en la que la actividad catalítica de una primera MNAzima facilita una molécula requerida para la actividad catalítica de una segunda MNAzima, que a su vez facilita una molécula requerida para la actividad catalítica de la primera MNAzima. En algunas realizaciones, la molécula requerida puede comprender una partezima, una enzima, un

- 5 facilitador de ensamblaje, un sustrato, una diana, una parte o fragmento de los mismos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una cascada puede por lo tanto implicar producción de un efecto acumulativo y por lo tanto detectar una diana de baja abundancia generando una señal a un nivel al que pueda detectarse. En otras realizaciones, pueden emplearse más de dos etapas catalíticas. La cascada puede ser lineal. En una realización preferida, la cascada puede ser exponencial.
- 10 Como se usa en el presente documento, las expresiones “inhibidor” o “inhibidor de ensamblaje” incluyen, pero sin limitación, cualquier proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico, ARN o ADN, análogos de ácido nucleico, ácidos péptido nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico-péptido, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas,
- 15 priones o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos o cualquier otra entidad o molécula que interaccione con uno o más componentes de una MNAzima como se han definido en el presente documento o que interaccione con un sustrato o facilitador de ensamblaje, para prevenir el ensamblaje de una MNAzima. Un “inhibidor” o “inhibidor de ensamblaje” no necesita estar en proximidad física con una MNAzima, pero, como ejemplo no limitante, puede unirse competitivamente a una parte componente de una MNAzima, sustrato o facilitador de
- 20 ensamblaje, evitando de este modo que dicha parte o componente esté disponible para ensamblaje de MNAzima. Dicha unión puede incluir, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor que es complementario a un oligonucleótido que comprende una parte o componente de una MNAzima.

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento y a lo largo de la memoria descriptiva:

- 25 *MNAzima*: enzima de ácido nucleico multicomponente o enzima de ácido nucleico multipartito;
ADNzima: enzima de ácido desoxirribonucleico;
ARNzima: enzima de ácido ribonucleico o ribozima;
PCR: reacción en cadena de la polimerasa;
SDA: amplificación de desplazamiento de cadena;
LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle;
30 *RCA*: amplificación de círculo rodante;
TMA: amplificación mediada por transcripción;
3SR: replicación de secuencia autosostenida;
NASBA: amplificación basada en secuencia de ácido nucleico;
dH₂O: agua destilada desionizada;
35 *LNA*: ácido nucleico bloqueado;
PNA: ácido péptido nucleico;
ADNr: ensayo de ADN ramificado;
FCS: espectroscopia de correlación de fluorescencia;
TSA: amplificación de señal de tiramida;
40 *An*: analito o diana;
F: fluoróforo;
Q: interruptor;
miR: microARN;
N= A, C, T, G, o cualquier análogo de los mismos;
45 *N'*= cualquier nucleótido complementario a N o capaz de formar pares de bases con N;
(N)_x: cualquier número de N;
(N')_x: cualquier número de N';
W: A o T;
K: A, G, o AA;
50 *rN*: cualquier base ribonucleotídica;
(rN)_x: cualquier número de rN;
rR: A o G;
rY: C o U;
M: A o C;
55 *H*: A, C, o T;
D: G, A, o T;
JOE o 6-*JOE*: 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína;
FAM o 6-*FAM*: 6-Carboxifluoresceína.
BHQ1: Interruptor Black Hole 1
60 *BHQ2*: Interruptor Black Hole 2
M-MLV RT (H-): Transcriptasa Inversa de Virus de la Leucemia Murina de Moloney,
RNasa H Menos
ARNhp: ARN en horquilla corto

ARNip: ARN de interferencia corto
ARNm: ARN mensajero
ARNt: ARN de transferencia
ARNnop: ARN nucleolar pequeño
ARNtp: ARN temporal pequeño
ARNmp: ARN modulador pequeño
pre-microARN: precursor de microARN
pri-microARN: microARN primario

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

- 10 Debe entenderse desde el comienzo, que las figuras y ejemplos proporcionados en el presente documento son para ejemplificar y no para limitar la invención y sus diversas realizaciones.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones, procedimientos y kits para la detección, identificación y/o cuantificación de una diana. Los procedimientos generalmente comprenden el uso de composiciones que comprenden enzimas de ácido nucleico multipartitas o multicomponentes que se forman preferentemente por múltiples componentes de ácido nucleico que se autoensamblan para formar una enzima de ácido nucleico activa en presencia de un facilitador de ensamblaje. En realizaciones preferidas, el facilitador de ensamblaje es la diana y por lo tanto las enzimas de ácido nucleico multicomponentes se forman solamente en presencia de la diana.

1. Composiciones - MNAzimas

- 20 Las enzimas de Ácido Nucleico Multicomponentes (también denominadas en el presente documento igualmente enzimas de ácido nucleico multipartitas o "MNAzimas") son capaces de autoensamblarse a partir de dos o más componentes oligonucleotídicos, también denominados en el presente documento partezimas. Los oligonucleótidos de partezimas se autoensamblan en presencia de un facilitador de autoensamblaje de MNAzima para formar una MNAzima. Las MNAzimas son por lo tanto enzimas de ácido nucleico catalíticamente activo. En algunas realizaciones, la presencia de una MNAzima puede detectarse y es indicativa de la presencia de una diana, porque la MNAzima se forma solamente en presencia de la diana, comprendiendo la diana el facilitador de ensamblaje. Se proporciona una amplia diversidad de ensayos basados en los principios básicos descritos anteriormente en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden oligonucleótidos capaces de formar MNAzimas y MNAzimas de diversas secuencias. En algunas realizaciones al menos uno de los componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o sustrato también puede incluir/comprender un aptámero que es capaz de unirse a una diana.

En realizaciones preferidas, las estructuras de MNAzima se basan en una o más ADNzimas y/o ribozimas. Se prefieren más las estructuras de MNAzima que se basan en una estructura de ADNzima particular. Las estructuras actualmente preferidas se basan en ADNzimas que incluyen las ADNzimas 10:23 y 8:17. En diversas realizaciones las MNAzimas comprenden una o ambas bases ribonucleotídicas y bases desoxirribonucleotídicas. En realizaciones más preferidas, una estructura de MNAzima se basa al menos en parte en la estructura de una ADNzima. En otras realizaciones preferidas, las MNAzimas comprenden al menos algunas bases desoxirribonucleotídicas o análogos de las mismas. En realizaciones más preferidas, el núcleo catalítico de una MNAzima comprende una o más bases desoxirribonucleotídicas o análogos de las mismas. En realizaciones aún más preferidas, una o más bases desoxirribonucleotídicas o análogos de las mismas están implicadas en la catálisis de un sustrato. En otras realizaciones, al menos una base desoxirribonucleotídica, o su análogo, en el núcleo catalítico mejora la actividad catalítica. En otras realizaciones más, existe un requisito estricto de al menos una base desoxirribonucleotídica, o su análogo, en el núcleo catalítico de la MNAzima para que se produzca la catálisis a una tasa medible, en relación con la de una MNAzima comparable sin la base desoxirribonucleotídica presente.

45 Como se proporcionan en el presente documento, las MNAzimas pueden contener una o más sustituciones tales como análogos, derivados, bases modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones de la cadena principal de fosfato o azúcar, diversas delecciones, inserciones, sustituciones, duplicaciones u otras modificaciones, o cualquier modificación de estas, bien conocidas por los expertos en la materia. Tales modificaciones, sustituciones, delecciones, inserciones, etc, pueden realizarse en las ramas sensora y/o de sustrato y/o en las partes de núcleo catalítico, como se demuestra en el presente documento, de modo que la molécula conserva su actividad catalítica. Pueden tolerarse sustituciones o modificaciones a ramas que se unen al sustrato o facilitador de ensamblaje y de hecho son la base para permitir la adaptación de las moléculas a diferentes sustratos/facilitadores de ensamblaje. Por ejemplo, la modificación de las ramas sensoras permitirá la adaptación a diferentes facilitadores de ensamblaje, mientras que la modificación de las ramas de sustrato permitirá la adaptación a diferentes sustratos.

55 Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la invención prevé MNAzimas con actividad catalítica que están comprendidas por desoxirribonucleótidos o que derivan de tales moléculas por ciertas modificaciones/sustituciones etc. Como normal general, el reemplazo de la molécula completa con, por ejemplo, ribonucleótidos, harán a la molécula inactiva debido a que se basa para su actividad en ciertos desoxirribonucleótidos clave. De una manera correspondiente, algunos ribonucleótidos en una ribozima pueden sustituirse con desoxirribonucleótidos pero el

reemplazo de la molécula completa con, por ejemplo, desoxirribonucleótidos hará a la molécula inactiva.

El experto en la materia apreciará que las MNAzimas comprenden desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o incluso ambos. Se prefieren actualmente las MNAzimas que comprenden al menos uno y más preferentemente, todos, los oligonucleótidos componentes de desoxirribonucleótidos. También se prefieren las MNAzimas que comprenden al menos una base desoxirribonucleotídica, o su análogo, dentro del núcleo catalítico de la MNAzima. Se prefieren aún más las realizaciones en las que se requiere una base tal para la actividad catalítica.

El experto en la materia también apreciará que las ADNzimas multipartitas tienen ventajas sobre las ribozimas multipartitas, por ejemplo con respecto a estabilidad y facilidad de uso. Por lo tanto, las MNAzimas multicomponente proporcionadas en el presente documento pueden proporcionar una alternativa actualmente preferida a ribozimas multicomponente, que también se proporcionan de acuerdo con diversas realizaciones. También se apreciará que en ciertas realizaciones, las MNAzimas ofrecen ventajas frente a enzimas de ácido nucleico unimoleculares, por ejemplo ADNzimas que solamente pueden reconocer un sustrato, mientras que una MNAzima sencilla puede reconocer dos moléculas, concretamente un facilitador de ensamblaje (por ejemplo una diana) y un sustrato. Por ejemplo, estas propiedades de MNAzimas las hacen adaptables por ejemplo, para detección de dianas, incluyendo detección *in situ*, *in vivo* o *in vitro*.

2. Procedimientos que usan MNAzimas para detectar, identificar o cuantificar dianas

La presente invención proporciona diversos procedimientos que emplean el uso de una o más MNAzimas para la detección, identificación o cuantificación de al menos una diana. En una realización, el primer y segundo componentes oligonucleotídicos se autoensamblan solamente cuando entran en contacto con una muestra que contiene un facilitador de ensamblaje, indicando de este modo dicho autoensamblaje de la MNAzima catalíticamente activa la presencia del facilitador de ensamblaje, siendo el facilitador de ensamblaje la diana. En otras realizaciones, tales como por ejemplo las que implican un aptámero, el facilitador de ensamblaje puede no ser la diana y por lo tanto puede comprender solamente un elemento requerido para autoensamblaje de la MNAzima.

Varias de las diversas realizaciones de la invención pueden entenderse mejor por medio de representaciones pictóricas. Por lo tanto, en referencia a las figuras y de acuerdo con las composiciones y procedimientos del presente documento, se proporcionan generalmente procedimientos basados en MNAzima que permiten la detección de al menos una diana usando solamente enzimas de ácido nucleico (por ejemplo, Figuras 1, 3, 4, 7 - 13, 20, 21, 24, 25) sin ninguna necesidad de enzimas proteicas tales como polimerasas. Aunque el uso de enzimas proteicas junto con MNAzimas no se excluye en el presente documento y en ciertas realizaciones en el presente documento la inclusión de enzimas proteicas es permisible, o incluso se prefiere, las condiciones de reacción para procedimientos que no requieren enzimas proteicas son generalmente menos restrictivas y se optimizan más fácilmente, por ejemplo para la eficacia de escisión de MNAzima. La falta de necesidad de enzimas proteicas también reduce generalmente el coste de los reactivos.

Como se proporciona adicionalmente en el presente documento, algunos procedimientos para emplear MNAzimas para detección de diana no requieren termociclación y/o desnaturalización de una diana. Los procedimientos isotérmicos son más flexibles que los procedimientos que requieren termociclación y pueden también permitir la diferenciación entre dianas que comprenden ácido nucleico bicatenario y monocatenario. Además, la falta de una necesidad de termociclación puede hacer tales procedimientos más fáciles y menos caros. Se proporcionan de acuerdo con los procedimientos del presente documento procedimientos sencillos, rápidos, rentables, isotérmicos y flexibles con respecto al procedimiento para detectar dianas de interés en una muestra, que puede ser sintética o natural.

Ciertos de los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran detección de una diana de ácido nucleico por ensamblaje específico de diana de una MNAzima que conduce a escisión mediada por MNAzima de, por ejemplo, un sustrato indicador fluorescente. Además, debido a la naturaleza de la molécula de MNAzima, pueden realizarse reacciones a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, sujeta solamente a los requisitos para el ensamblaje de MNAzima y modificación catalítica (por ejemplo escisión) del sustrato utilizado.

Un ejemplo básico de una estructura de MNAzima se representa en la Figura 1. La estructura mostrada comprende partezima A y partezima B que han formado pares de bases con una molécula facilitadora de ensamblaje de MNAzima, mostrada en el presente documento simplemente como Diana. Las partezimas A y B por la interacción con la Diana, han permitido al núcleo catalítico situarse en proximidad cercana y por lo tanto formarse. Las ramas de sustrato de la MNAzima han interactuado y formado pares de bases con un sustrato, en el presente documento, Sustrato Indicador. Por lo tanto, la MNAzima se ha autoensamblado y este procedimiento se facilita a través de la presencia de la molécula diana facilitadora de ensamblaje de MNAzima. En ausencia de la diana, no se formará MNAzima. La modificación (en este caso, escisión) de los sustratos se cataliza por el núcleo catalítico de la MNAzima en el sitio de escisión de MNAzima dentro del sustrato indicado por la flecha vertical. El sustrato de esta realización particular de la invención comprende una parte detectable que tiene una señal detectable, por ejemplo fluoróforo F, y una parte interruptora que tiene un efecto interruptor en la señal detectable F a través de la acción del interruptor Q. Tras la escisión en el sitio de escisión de MNAzima, existe un aumento sustancial de señal detectable, aquí fluorescencia, que se detecta o cuantifica fácilmente.

La Figura 1 puede entenderse adicionalmente que representa un ejemplo de un procedimiento básico para usar MNAzimas para detectar una diana, que en algunas realizaciones comprende un facilitadora de ensamblaje. La estrategia 1 (véase Figura 2) usa MNAzimas adaptadas para la detección de las dianas incluyendo ADN, ARN y proteínas. El sustrato indicador puede estar libre en solución (Figura 1) o unido a un soporte (Figura 3). Puede generarse señal por diversos medios tales como separación de pares de colorante interruptor Q y fluoróforo F (Figuras 1 y 3).

Más específicamente, se muestra la partezima A y partezima B en la Figura 1, comprendiendo cada una una parte de rama de sustrato, parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora. En presencia de una diana, las partes de rama sensora de partezima A y partezima B pueden comenzar a hibridar y formar pares de bases con partes complementarias de la diana, por ejemplo una secuencia de ADN o ARN. Tras poner en contacto la diana de esta manera, la MNAzima se autoensambla formando un núcleo catalítico que puede modificar un sustrato que está unido por las ramas de sustrato. Preferentemente, la presencia de la MNAzima se detecta a través de la detección o medición de su actividad catalítica. Las ramas de sustrato de la MNAzima ensamblada de este modo pueden interactuar con un sustrato, por ejemplo el sustrato indicador mostrado en la Figura 1, a través de la interacción de las secuencias complementarias en las ramas de sustrato y el sustrato. Una vez que el sustrato interactúa de este modo con las ramas de sustrato, el núcleo catalítico puede promover la modificación (por ejemplo escisión) del sustrato, que puede a su vez medirse o detectarse, directa o indirectamente.

En referencia adicional a las figuras, la Figura 2 proporciona una visión de conjunto estilizada de varias aplicaciones ejemplares de un ensayo de MNAzima. La estrategia 1 ejemplifica una aplicación básica del ensayo de MNAzima como se ha descrito anteriormente. Una MNAzima compuesta de dos oligonucleótidos separados con secuencias de reconocimiento para tanto una diana como un sustrato se forma cuando los oligonucleótidos se reconocen y se unen a una diana. El sustrato, por ejemplo sustrato indicador, se modifica por la acción catalítica de la MNAzima y causa la generación de una señal detectable, directamente (Estrategia 1), durante o después de la amplificación de diana (Estrategia 2) o mediante una cascada de señales (Estrategia 3). En algunas realizaciones, la amplificación tanto de diana como de señal se produce simultáneamente.

Un experto en la materia reconocería que las MNAzimas pueden usarse en estrategias para detección, identificación o cuantificación de facilitador de ensamblaje que abarcan una amplia serie de áreas de aplicación. Estas áreas incluyen, pero sin limitación, aplicaciones médicas, veterinarias, de agricultura, de tecnología de los alimentos, de formación de imágenes y de bioterrorismo.

También será fácilmente evidente para un experto en la materia que las MNAzimas pueden usarse para detectar, identificar y/o cuantificar dianas en solución. Por ejemplo, las estrategias que implican detección, identificación y/o cuantificación de dianas sencillas usando un sustrato sencillo son aplicables a dicha detección. En algunas realizaciones esto puede implicar el uso de un sustrato genérico. También pueden detectarse dianas múltiples en solución usando múltiples MNAzimas que modifican una serie de sustratos genéricos, dando como resultado la modificación de cada sustrato una señal perfectamente detectable, por ejemplo fluorescencia diferente.

3. Procedimientos que usan múltiples MNAzimas

El experto en la materia reconocerá que los diversos ensayos proporcionados en el presente documento pueden usarse generalmente para detectar una diana sencilla por reacción o ensayo o para detectar múltiples dianas en una reacción o ensayo sencillo. Cuando se detectan múltiples dianas, pueden usarse una o más MNAzimas dependiendo del ensayo y lo que se va a detectar. Por ejemplo, una MNAzima sencilla puede ser suficiente cuando se detectan múltiples estructuras relacionadas, por ejemplo un grupo de secuencias que comparten una secuencia crítica (reconocida por la MNAzima) y que varía solamente por ejemplo, en longitud o en secuencia fuera de la secuencia crítica. Cualquier secuencia con la secuencia crítica podría detectarse. Múltiples MNAzimas serían útiles cuando se detectan secuencias relacionadas que difieren en tan poco como un nucleótido sencillo o incluso cuando se detectan dianas ampliamente diferentes y es deseable conocer la presencia o ausencia de cada una. De forma similar, en algunas realizaciones será suficiente un sustrato sencillo, mientras que en otras se requiere un sustrato único para detectar cada una de varias dianas. En algunos casos, combinar el procedimiento requiere el uso de una señal detectable única o distinta para cada sustrato para facilitar el diseño del procedimiento. Puede no requerirse una señal detectable única o distinta para cada sustrato cuando los sustratos se fijan a un soporte o soportes y pueden distinguirse en virtud de su localización en el soporte o soportes. Estas características de diseño se entenderán fácilmente por un experto en la materia. En algunas realizaciones, los procedimientos permiten la detección de una diversidad de diferentes tipos de diana en una reacción, por ejemplo una diana de ácido nucleico y una proteína.

4. Procedimientos que usan amplificación de diana

El experto en la materia apreciará fácilmente que los procedimientos descritos en el presente documento pueden implicar amplificación de una diana antes, durante o después de actividad catalítica de MNAzima. Tal amplificación de diana encuentra aplicación particular en realizaciones de la presente invención en las que la cantidad de diana que se busca detectar, identificar o cuantificar es tal que proporciona una señal que podría no ser detectable de otro modo. Dicha amplificación puede comprender una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

- 5 La estrategia 2 (Figura 2) ejemplifica el uso de una MNAzima adaptada para controlar la acumulación de amplicones durante o después de amplificación *in vitro* de dianas de ácido nucleico. Se conocen en la materia técnicas para amplificación *in vitro* de secuencias de ácido nucleico. Estas incluyen técnicas mediadas por una ADN polimerasa, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.683.202; Patente de Estados Unidos N° 4.683.195; Patente de Estados Unidos N° 4.000.159; Patente de Estados Unidos N° 4.965.188; Patente de Estados Unidos N° 5.176.995) (Saiki y col., 1985; Chehab y col., 1987), amplificación de desplazamiento de cadena ("SDA") (Walker y col., 1992), amplificación de círculo rodante ("RCA") (Lizardi y col., 1998), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y amplificación isotérmica mediada por bucle ("LAMP") (Notomi y col., 2000; Nagamine y col., 2002). Otras técnicas de amplificación de diana están mediadas por una ARN polimerasa, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción ("TMA") (Jonas y col., 1993), replicación de secuencia autosostenida ("3SR") (Fahy y col., 1991) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico ("NASBA") (Compton, 1991).

Los productos de amplificación ("amplicones") producidos por PCR, RT-PCR, SDA, RCA y LAMP están compuestos por ADN, mientras que los amplicones de ARN están producidos por TMA, 3SR y NASBA.

- 20 En referencia adicional a la estrategia 2 como se ejemplifica en la Figura 2, en uno de sus varios aspectos, la invención proporciona procedimientos para usar MNAzimas junto con procedimientos de amplificación de diana que incluyen, por ejemplo, los anteriormente mencionados PCR, RT-PCR, SDA, RCA, LAMP, TMA, 3 SR y NASBA. Los ejemplos 4, 5, 6 y 9 demuestran la detección de amplicones de PCR. Los ejemplos 4, 5, 6 y 9 el análisis de puntos finales después de PCR facilitó la determinación rápida de la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos diana. Los ejemplos 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19 y 20 ejemplifican control en tiempo real de amplificación por PCR, permitiendo de este modo la cuantificación del ácido nucleico diana. La acumulación de amplicones producidos por PCR usando relaciones de cebador asimétricas o simétricas puede controlarse usando MNAzimas.

- 30 Como puede verse en la Figura 2 (estrategia 2) un ácido nucleico diana se amplifica de acuerdo con un procedimiento para amplificar ese ácido nucleico (es decir ADN o ARN). Preferentemente, se usan procedimientos convencionales de amplificación *in vitro*. Los amplicones generados durante la amplificación funcionan como dianas para una MNAzima, por lo tanto la actividad de MNAzima es indicativa de la presencia de la diana. El experto en la materia apreciará que dicho control puede realizarse en un frasco sencillo en condiciones que permiten tanto la amplificación como el ensamblaje de MNAzima y la actividad catalítica o el ensayo de MNAzima puede realizarse posterior a, o en puntos temporales a lo largo de, la amplificación, retirando muestras al final o durante el transcurso de las reacciones de amplificación.

- 35 También debe apreciarse que los procedimientos o protocolos que combinan amplificación de diana con actividad de ácido nucleico catalítico pueden requerir condiciones de reacción específicas. Preferentemente, las condiciones de reacción son compatibles con tanto actividad polimerasa (para amplificación) como modificación de ácido nucleico catalítico de un sustrato (para detección). Se han descrito protocolos para determinar condiciones para actividad catalítico y actividad polimerasa simultáneas a alta temperatura, tal como durante PCR, para ADNzimas (Impey y col., 2000). La influencia de factores que incluyen longitud de la rama de ADNzima, tampón, temperatura, concentración de ión divalente y efectos de aditivos se demostró en este artículo. Las enzimas de ADN son adecuadas para su uso en combinación con estrategias de amplificación *in vitro*. Por ejemplo, no se desnaturaliza de forma irreversible por exposición a altas temperatura durante la amplificación.

5. Procedimientos que usan soportes sólidos e insolubles

- 45 También debe entenderse que generalmente los procedimientos, tanto múltiples como no, son aplicables en solución o combinados con un soporte insoluble o soporte sólido en el que uno o más de sustrato, enzima o parte de la misma, facilitador de ensamblaje de MNAzima y/o diana están unidos, fijados o ligados. De nuevo las características de tales sistemas de ensayo se entenderán generalmente por el experto en la materia que está en posesión de los procedimientos y variaciones ejemplificados en el presente documento y los ejemplos de trabajo.
- 50 Por lo tanto, la invención no debe considerarse limitada a las enseñanzas literales en el presente documento, sino que puede modificarse y variarse de forma coherente con los principios y alcance de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento y el conocimiento de la técnica.

- 55 En referencia a la Figura 3, Panel (i), se representa un procedimiento ejemplar para detectar dianas usando una MNAzima y un sustrato anclado a un soporte. En esta realización, el sustrato es preferentemente un sustrato como se muestra con una parte detectable que comprende una señal detectable, por ejemplo un fluoróforo, y una parte interruptora que disminuye o elimina la señal detectable mientras que la parte detectable y la parte interruptora del sustrato permanecen en proximidad cercana, por ejemplo, hasta que el sustrato se modifica por ejemplo por escisión. El sustrato se une a un soporte. Preferentemente el soporte es un material insoluble o una matriz que conserva el sustrato y lo excluye de moverse libremente en el volumen de la mezcla de reacción. Tales soportes se

conocen en la técnica para inmovilizar o localizar sustratos, incluyendo dianas de ácido nucleico. El experto en la materia apreciará que el soporte puede seleccionarse de una amplia diversidad de matrices, polímeros y similares en una diversidad de formas incluyendo perlas convenientes para su uso en microensayos, así como otros materiales compatibles con las condiciones de reacción. En ciertas realizaciones preferidas el soporte puede ser un material plástico, tal como perlas u obleas de plástico o el del pocillo o tubo en el que se realiza un ensayo particular.

La unión del sustrato al soporte se diseña de modo que tras la modificación, por ejemplo por escisión, del sustrato por la MNAzima, la parte detectable o la parte interruptora, pero no ambas, permanece unida al soporte, mientras que la otra se libera para moverse en el volumen de la mezcla de reacción, lejos de la parte que se mantiene unida. Por lo tanto, en un ejemplo de escisión, la señal detectable aumenta ampliamente cuando se separan la parte interruptora y la parte detectable tras la escisión. En la realización mostrada en la Figura 3, Panel (i), la parte detectable que contiene fluoróforo permanece unida después de la escisión. Esto tiene el beneficio de permitir la localización de la señal en el soporte pero en ciertos casos, el fluoróforo o fluoróforos pueden liberarse en solución. En una realización adicional cuando, por ejemplo, se produce ligación, el interruptor puede ligarse a un fluoróforo reduciendo de este modo la señal detectable.

En referencia a la Figura 3, Panel (ii), se muestra un procedimiento múltiple que comprende múltiples componentes de MNAzima para realizar múltiples MNAzimas (dos mostradas) específicas para dianas diferentes. Esta realización abarca una estructura que comprende un sustrato en una posición conocida particular, por ejemplo una "microplaca", en la que están disponibles múltiples posiciones para unir numerosos sustratos, por ejemplo Sustrato 1, Sustrato 2. La parte detectable de cada sustrato puede localizarse en su posición y se liga en esa localización. Para cada MNAzima, por ejemplo MNAzima 1, MNAzima 2, si la diana, por ejemplo, Diana 1, Diana 2, está presente en, por ejemplo, una solución de ensayo, la MNAzima correspondiente a y específica para esa diana se autoensamblará y será capaz de catalizar la escisión de su sustrato correspondiente, dando como resultado la producción de una señal en esa localización. La posición de la señal detectable identificará por lo tanto que MNAzima ha escindido su sustrato y por lo tanto que diana o dianas están presentes en la solución de ensayo. En esta realización, la modificación del sustrato da como resultado una señal identificable en virtud de su localización. El sustrato no necesita un mecanismo de detección identificable de forma independiente, por ejemplo, un fluoróforo diferente, aunque los expertos en la materia reconocerían que dicha observación está dentro del alcance de la presente invención.

Las realizaciones de la presente invención que abarcan un soporte insoluble en forma de una "microplaca", conocida de otro modo como una serie o microserie, típicamente comprenden una pluralidad de sustratos acoplados, ligados o unidos de otro modo a la microplaca. En realizaciones particulares, los sustratos comprenden un ácido nucleico. Puede posicionarse una pluralidad de ácidos nucleicos sobre la microplaca por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, por pipeta, impresión por chorro de tinta, impresión de contacto o fotolitografía. La microplaca puede estar comprendida por al menos un elemento, comprendiendo cada elemento al menos un ácido nucleico. El al menos un elemento puede estar comprendido por una pluralidad de ácidos nucleicos de la misma secuencia. El número de elementos que comprende una microplaca puede ser cualquier número y cuando se posiciona una pluralidad de elementos en una microplaca, los elementos pueden separarse a una distancia uniforme o variable, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, los elementos pueden posicionarse de forma aleatoria, determinándose después la localización respectiva de cada elemento. El tamaño y la forma de los elementos dependerá de la aplicación particular de la presente invención y pueden combinarse elementos de diferentes tamaños y formas en una microplaca sencilla. La superficie de la microplaca puede ser sustancialmente plana o puede tener características tales como depresiones o protuberancias y los elementos pueden posicionarse en las depresiones o en las protuberancias. Tales depresiones pueden proporcionar un depósito para soluciones en las que los elementos se sumergen o tales protuberancias pueden facilitar el secado de los elementos. Por ejemplo, pueden colocarse elementos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. En algunas realizaciones, la microplaca puede incluir identificadores únicos tales como indicios, marcadores de radiofrecuencia, dispositivos integrados tales como microprocesadores, códigos de barras u otras marcas para identificar cada uno de los elementos. Los identificadores únicos pueden adicionalmente o como alternativa comprender las depresiones o protuberancias en la superficie de la serie. Además, los identificadores únicos pueden proporcionar orientación o identificación correcta de la microplaca. Los identificadores únicos pueden leerse directamente por un dispositivo de captura de datos o por un explorador o detector óptico.

6. Sistemas de sustrato indicador usados en los procedimientos

También se proporcionan de acuerdo con la presente invención sistemas de sustrato indicador genéricos, que permiten un desarrollo de ensayo rápido permitiendo cambios de diseño fáciles para crear nuevas MNAzimas que reconocen diferentes dianas. Como se analiza en el presente documento, la parte de rama de sustrato y la parte de núcleo catalítico de las partezimas pueden permanecer sin cambios, con cambios solamente en la parte de rama sensora de una o más partezimas requeridas para nuevas dianas. Se proporcionan secuencias de sustrato genéricas y el mismo sustrato puede por lo tanto incorporarse en ensayos para muchas dianas diferentes. Además, el mismo sustrato puede incorporarse en los procedimientos en varias realizaciones en el presente documento, incluyendo ensayos en los que el sustrato está libre en solución o está ligado o unido a un soporte. Puede usarse una serie de sustratos genéricos en una reacción múltiple que permite la detección simultánea de múltiples dianas.

Las estrategias de MNAzima que usan sustratos genéricos ofrecen una ventaja importante frente a tecnologías tales como Tasman® o Beacons que requieren el diseño y uso de sondas específicas para cada nueva diana.

7. Sustratos usados en los procedimientos

Como se describe en más detalle posteriormente, las MNAzimas tienen una propiedad ventajosa en ciertas realizaciones de ser capaces de utilizar un sustrato universal o genérico. Un sustrato tal se muestra en la Figura 1 en una configuración preferida actualmente en la que el sustrato comprende tanto una parte detectable como una parte interruptora. La parte interruptora se adapta para disminuir o eliminar una señal detectable de la parte detectable del sustrato hasta que el sustrato se escinde por la MNAzima. Por ejemplo, la parte interruptora puede comprender "interruptor Black Hole 1" (BHQ1) o "interruptor Black Hole 2" (BHQ2).

Por lo tanto, la MNAzima escinde el sustrato entre la parte detectable y la parte interruptora permitiendo que las dos partes se separen en solución, permitiendo de este modo que la señal detectable aparezca o aumente cuando la parte interruptora se separa o de hecho se retira del ambiente local de la parte detectable.

El uso del sustrato genérico universal se permite a través del diseño de las partezimas componentes de la MNAzima. Alterando solamente las ramas sensoras de las partezimas, pero dejando las ramas de sustrato sin cambiar, puede diseñarse una gran diversidad de MNAzimas específicas para cada una de una pluralidad de dianas todas las cuales utilizan un sustrato universal para detección. El experto en la materia apreciará las ventajas que esto ofrece en lo que respecta a eliminar la necesidad de sustratos únicos o adaptados para cada diana. Cada nueva diana requiere solamente uno o más cambios en una o más partes de la rama sensora; la parte de rama de sustrato y la parte de núcleo catalítico pueden permanecer constantes. Por lo tanto, puede usarse un sustrato indicador sencillo para una diana sencilla usando una MNAzima y múltiples dianas en una serie de ensayos usando MNAzimas alteradas. Una pluralidad de sustratos indicadores permite la multiplexación para detectar múltiples dianas en un ensayo sencillo usando múltiples MNAzimas, una para cada diana. Tales procedimientos múltiples para usar MNAzimas se consiguen fácilmente en solución (Figura 18) o con unión a un sistema de soporte (Figura 3). Se contempla en el presente documento que pueden conseguirse de este modo ensayos múltiples en sistemas que implican unir uno o más del sustrato o las partezimas o facilitador de ensamblaje de la MNAzima o actividades enzimáticas adicionales, a un soporte como se describe en el presente documento.

Además, los sustratos pueden incorporar entidades adicionales tales como ácidos nucleicos marcados, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticuerpos, ARN, ADN, análogos de ácido nucleico, proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, ácidos péptido nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico-péptido o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser nanopartículas de oro, estando asociadas estas nanopartículas de oro con una pluralidad de dianas, tales como ácidos nucleicos.

Pueden modificarse los sustratos por una MNAzima proporcionando de este modo un efecto detectable. En el procedimiento de detección, la modificación del sustrato por una MNAzima puede implicar, por ejemplo, escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida. Como consecuencia de la modificación de sustrato por una MNAzima, se genera un efecto detectable y la magnitud del efecto puede por lo tanto ser indicativa de la cantidad de la diana que se busca a medir. El efecto detectable puede detectarse por una diversidad de procedimientos, incluyendo espectroscopia de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopia de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopia de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopia de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

Varios grupos han indicado detección de dianas de ácido nucleico y otros analitos con lecturas colorimétricas (Elghanian y col., 1997, Mirkin y col., 1996 y Liu y Lu, 2004). La estrategia implica la preparación de lotes de nanopartículas de oro, cada una de las cuales tiene una secuencia oligonucleotídica de ADN distinta unida a su superficie. Las partículas de oro pueden agregarse después mediante la adición de un "oligonucleótido puente", que tiene complementariedad con las secuencias que se unen a las partículas de oro. La agregación de partículas da como resultado cambio conjunto en el color de rojo a azul (Mirkin y col., 1996). Trabajo más reciente ha mostrado que la inclusión de una secuencia de sustrato de ADNzima dentro del oligonucleótido puente puede proporcionar un mecanismo para invertir la agregación de las partículas de oro (Liu y Lu, 2004). La activación de las ADNzimas y escisión posterior del oligonucleótido puente/sustrato, dio como resultado la disociación de las partículas de oro y un cambio en el color de azul a rojo.

Se ideó un detector de plomo sencillo basado en el concepto anterior que actuaba explotando la dependencia de una ADNzima específica de plomo para su actividad catalítica. La ADNzima se diseñó para escindir un oligonucleótido puente usado para agregar partículas de oro (Liu y Lu, 2004). De forma similar, una aptazima que contiene un aptámero específico para adenosina y una ADNzima capaz de escindir un oligonucleótido puente solamente en presencia de adenosina, permitió la detección de adenosina en un formato colorimétrico.

8. Optimización de los procedimientos

El experto en la materia entenderá fácilmente que los procedimientos descritos en el presente documento pueden

optimizarse usando una diversidad de parámetros experimentales para optimizar la detección, identificación y/o cuantificación de un diana. Los parámetros experimentales particulares que se optimizan y el nivel de dicha optimización, dependerán del procedimiento particular que se emplee y la diana particular que se busca detectar, identificar y/o cuantificar. Tales parámetros incluyen, pero sin limitación, tiempo, temperatura, concentración de sales, detergentes, cationes y otros reactivos incluyendo pero sin limitación dimetilsulfóxido (DMSO) y longitud, complementariedad, contenido de GC y punto de fusión (T_m) de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, por ejemplo los procedimientos que implican detección de variación de secuencia y/o detección de ADN metilado, los parámetros experimentales y preferentemente que incluyen la temperatura a la que se realiza el procedimiento, pueden optimizarse para diferenciar entre la unión de un ácido nucleico componente de MNAzima a un ácido nucleico diana que comprende o no una variación de secuencia o un nucleótido metilado, respectivamente. La temperatura a la que pueden realizarse tales procedimientos puede estar en un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 96 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 75 °C, 20 °C a aproximadamente 60 °C o de aproximadamente 20 a aproximadamente 55 °C.

En una realización preferida, se proporciona en el presente documento reacciones optimizadas para realizar los procedimientos de uso de las MNAzimas. En tales reacciones optimizadas, la actividad catalítica aumenta hasta 10, 20 ó 30 % por encima de las reacciones no optimizadas. Las condiciones de reacción más preferidas mejoran la actividad catalítica en al menos 35 % o 40 % y preferentemente hasta 50 % o más. En realizaciones aún más preferidas, las reacciones optimizadas tienen un aumento de actividad catalítica de más del 50 % y hasta 66 %, 75 % o incluso el 100 %. En realizaciones aún más preferidas, un procedimiento de reacción completamente optimizado ofrecerá 100, 200 o incluso 300 % o más de aumento de la actividad catalítica. Otras condiciones de reacción preferidas pueden mejorar la actividad catalítica hasta 1000 % o más frente a procedimientos realizados con condiciones de reacción no optimizadas. Una condición de reacción altamente preferida para optimizar los procedimientos proporcionados en el presente documento es la inclusión de ciertos cationes divalentes. La actividad catalítica de la mayoría de las enzimas de ácido nucleico puede verse influenciada de una manera dependiente de concentración por la concentración de cationes divalentes. Las reacciones optimizadas preferidas se optimizan por uno o más de Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} .

9. Procedimientos que usan aptámeros

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse con aptámeros, pudiendo dichos aptámeros facilitar la detección, identificación y/o cuantificación de dianas incluyendo dianas distintas de ácidos nucleicos.

En referencia a las Figuras 4 y 20, se ejemplifica un procedimiento para usar MNAzimas para detectar dianas, incluyendo entidades no de ácido nucleico. Este procedimiento usa aptámeros que pueden comprender un ácido nucleico o proteína, polipéptido o péptido o combinación de los mismos que tiene la capacidad para reconocer uno o más ligandos. Los aptámeros pueden unirse, por ejemplo, a proteínas, polipéptidos, péptidos o ácidos nucleicos, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos o cualquier otra entidad (Lee y col, 2004).

Los aptámeros preferidos en el presente documento pueden comprender oligómeros de ADN o ARN monocatenarios cortos o péptidos que pueden aislarse de bibliotecas complejas de ácidos nucleicos sintéticos o péptidos por un procedimiento por iteraciones de adsorción, recuperación y reamplificación. Los aptámeros pueden por lo tanto generarse contra casi cualquier diana, variando desde moléculas pequeñas tales como aminoácidos o antibióticos, hasta proteínas y estructuras de ácido nucleico. En realizaciones preferidas, los aptámeros incluyen, por ejemplo, moléculas de unión a ácido nucleico que se generan preferentemente por técnicas de evolución y selección. Preferentemente, los aptámeros pueden comprender moléculas de ADN o ARN, o una combinación de las mismas, incluyendo pero sin limitación los análogos de nucleótidos según, por ejemplo, la Tabla 2 anterior.

Se ilustran estrategias para combinar el uso de aptámeros con MNAzimas en las Figuras 4 y 20. En referencia a la Figura 4 panel (i), los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para esta estrategia de detección de MNAzima pueden incluir; (a) una partezima convencional; (b) una apta-partezima que es una partezima que incorpora un aptámero (secuencia en negrita) así como una secuencia complementaria capaz de formar una horquilla y por lo tanto inhibir el ensamblaje de MNAzima; (c) un facilitador de ensamblaje que puede unirse a tanto la aptapartezima como la partezima, permitiendo de este modo el ensamblaje de una MNAzima activa; y (d) un sustrato. En ausencia de un analito diana (An), la aptapartezima adopta una estructura en horquilla que inhibe el ensamblaje de una MNAzima activa. En presencia de analito diana, el analito diana se une al dominio de aptámero de la aptapartezima interrumpiendo de este modo la estructura en horquilla y permitiendo que la aptapartezima participe en el ensamblaje de una MNAzima activa. La MNAzima activa puede modificar después un sustrato provocando, por ejemplo, generación de señal fluorescente.

En referencia a la Figura 4 panel (ii), los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para esta estrategia de detección de MNAzima pueden incluir; (a) dos partezimas convencionales; (b) un facilitador de ensamblaje que

incorpora un aptámero (secuencia en negrita), así como secuencia inhibidora complementaria capaz de formar una estructura en horquilla; y (c) un sustrato. En ausencia de un analito diana, el facilitador de ensamblaje adopta una estructura en horquilla que inhibe la capacidad de este componente para dirigir el ensamblaje de MNAzimas activas. En presencia del analito diana, el analito diana se une al dominio de aptámero del facilitador de ensamblaje, interrumpiendo de este modo la estructura en horquilla y permitiendo al componente dirigir el ensamblaje de una MNAzima activa. La MNAzima activa puede modificar después un sustrato causando, por ejemplo, generación de señal fluorescente.

Un experto en la materia apreciará que el aptámero puede incorporarse en cualquier extremo de la molécula o moléculas facilitadoras del ensamblaje. Además se apreciará que pueden incorporarse múltiples aptámeros en uno o más de los componentes oligonucleotídicos de partezima. El facilitador de ensamblaje en las estrategias ilustradas en la Figura 4 paneles (i) y (ii) pueden comprender ADN, ARN, LNA, APN o una secuencia que contiene uno o más análogos de bases nucleotídicas. En otras realizaciones, el An diana es un ácido nucleico. En tales realizaciones, una secuencia complementaria al ácido nucleico diana reemplaza la secuencia de aptámero en negrita en la Figura 4.

En referencia a la Figura 4 panel (iii), los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para esta estrategia de detección de MNAzima pueden incluir dos apta-parteizimas, cada una de las cuales contiene una parte de un aptámero. En ausencia de un analito diana, no se pueden ensamblar MNAzimas activas. En presencia de analito diana, el analito diana actúa como el facilitador de ensamblaje que une los componentes oligonucleotídicos dirigiendo de este modo el ensamblaje de una MNAzima activa. La MNAzima activa puede modificar después un sustrato causando, por ejemplo, generación de señal fluorescente.

Una estrategia relacionada, que combina unión de aptámero y ensamblaje de MNAzima, se ilustra en la Figura 20. En esta estrategia, se incorpora una secuencia de aptámero en el extremo de una partezima (apta-parteizima) en una configuración mediante la que una MNAzima activa se forma solamente en presencia del analito diana. Los componentes oligonucleotídicos requeridos para la estrategia de detección de MNAzima ilustrada incluyen: (a) una partezima convencional; (b) una apta-parteizima que es un partezima con un aptámero incorporado en uno de sus extremos; (c) un facilitador de ensamblaje que se une tanto a la apta-parteizima como a la partezima permitiendo el ensamblaje de una MNAzima activa (en presencia de diana); (d) un sustrato sonda indicador; y (e) un inhibidor de ensamblaje que hibrida con la apta-parteizima en una región que abarca al menos parte de la secuencia del aptámero y parte de la rama de unión a sustrato de la secuencia de partezima. En ausencia de una diana (panel izquierdo), el inhibidor de la ensamblaje se une a la apta-parteizima bloqueando de este modo la unión (y escisión) del sustrato sonda indicador. En presencia de una diana (panel derecho), la diana se une a la secuencia de aptámero de la apta-parteizima, evitando la unión del inhibidor de ensamblaje y permitiendo la unión y escisión del sustrato sonda indicador. Como tal, una MNAzima activa puede formarse solamente y provocar generación de señal fluorescente en presencia de diana.

Además, se apreciará por un experto en la materia que la estrategia como se ilustra en la Figura 20 es similar a la ilustrada en la Figura 4 panel (i), con la diferencia de que la secuencia inhibidora complementaria, que evita la formación de MNAzima activa se incorpora en un componente de partezima oligonucleotídico (Figura 4 panel (i)) o en una molécula separada (Figura 20). Como tal, una secuencia inhibidora puede ser una molécula separada o puede incorporarse en uno de los componentes que participan en el complejo de MNAzima.

También se apreciará por un experto en la materia que podrían incorporarse uno o más aptámeros en cualquiera de los componentes oligonucleotídicos, incluyendo las partezimas, el facilitador de ensamblaje o el sustrato. Además el aptámero podría incorporarse en cualquier extremo de uno cualquiera de estos oligonucleótidos.

La invención puede entenderse mejor por referencia a los Ejemplos 18 y 21 en los que la estrategia de aptámero/MNAzima se usa para detectar una molécula pequeña (ATP) y una proteína (Taq polimerasa) respectivamente.

10. Procedimientos para detección, identificación y cuantificación de microARN

El experto en la materia entenderá que la detección, identificación y/o cuantificación de microARN representa una realización particular de los procedimientos descritos en el presente documento. En referencia a la Figura 5, se ejemplifica una estrategia para amplificación de secuencias de ácido nucleico cortas (por ejemplo, microARN (miR)) y detección de amplicones usando MNAzimas.

La detección de secuencias de ácido nucleico cortas tales como microARN (miR) requiere estrategias adicionales principalmente debido al tamaño pequeño de estas dianas. Los miR son moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Pueden detectarse por clonación o por análisis de transferencia de Northern, pero estos procedimientos son laboriosos y requieren mayores cantidades de ARN total que técnicas tales como RT-PCR. El tamaño pequeño de los miR proporciona insuficiente secuencia para acomodar dos cebadores de PCR de diseño convencional. Además, incluso si se consigue amplificación de miR, es difícil distinguir amplicones genuinos de dímeros de cebadores usando tamaño (determinado por electroforesis) o fluorescencia de la intercalación de colorantes no específicos tales como Sybr Green o bromuro de etidio. Esta limitación podría

superarse explorando los amplicones de miR con sondas de hibridación interna tales como TaqMan® o sondas Beacon, sin embargo, de nuevo el pequeño tamaño de los amplicones impide el uso de sondas de diseños convencionales.

Un procedimiento de RT-PCR de TaqMan® modificado (Chen y col., 2005) para análisis de miR inicia transcripción inversa usando cebadores 3' que tienen extremos 3' específicos de miR y secuencias no relacionadas adicionales en sus extremos 5' que pueden formar tallos de bucle. El ADNc generado se amplifica usando estos cebadores 3' y cebadores 5', que también tienen extremos 3' específicos de miR y secuencias no relacionadas adicionales en sus extremos 5'. La amplificación se controla en tiempo real usando sondas TaqMan® que se unen tanto a secuencias de miR como a secuencias no relacionadas introducidas por los cebadores. Sin embargo, debido al diseño del cebador y al tamaño y posicionamiento de la sonda TaqMan® existe aún la posibilidad de que los miR específicos puedan no distinguirse de secuencias cercanamente relacionadas.

Como se muestra en la Figura 5, el procedimiento empleado aquí preferentemente emplea un cebador 3' que se une a un miR en su extremo 3' y tiene una secuencia de extensión, no relacionada con el miR, que puede, o no, formar un tallo de bucle en el extremo 5'. Como representa la Figura 5, la secuencia no relacionada del cebador puede crear una estructura en bucle (Figura 5, lado izquierdo) o puede crear meramente una estructura marcadora (Figura 5, lado derecho). En cualquier ejemplo, el cebador de miR 3' se extiende en presencia de transcriptasa inversa, seguido de amplificación por PCR usando cebadores 5' y 3' con secuencia específica de miR en el extremo 3' con secuencia de extensión no relacionada en los extremos 5'. Los amplicones se detectan fácilmente por MNazimas, que reconocen e hibridan con el amplicón incluyendo la región entre los cebadores 5' y 3'. El requisito estricto de complementariedad entre la rama sensora de MNazima y el ácido nucleico diana permite la diferenciación de secuencias incluso cercanamente relacionadas. El Ejemplo 5 y Ejemplo 10 en los ejemplos posteriores demuestran los resultados de usar MNazimas para detectar amplicones generados por amplificación de secuencias de ácido nucleico cortas (véase también estrategia 2 en la Figura 2, anteriormente). Además, el Ejemplo 5 demuestra la capacidad de procedimientos que usan MNazimas para distinguir entre dos secuencias que tienen solamente una diferencia de nucleótido sencillo. Esto proporciona una ventaja principal en tanto que, incluso cuando el procedimiento de amplificación es incapaz de diferenciar entre secuencias cercanamente relacionadas, las MNazimas permiten la diferenciación de variación de secuencia menor en los amplicones resultantes.

11. Procedimientos que usan cascadas

Los expertos en la materia apreciarán que los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para realizar una cascada como se ha definido en el presente documento. Las realizaciones particulares de realizar tales procedimientos como se desvela en el presente documento incluyen, pero sin limitación (1) uso de una MNazima para escindir un sustrato solamente en presencia de una diana, facilitándose después dicho sustrato para implicación en un segundo acontecimiento tal como generación de una señal detectable, como se representa en la Figura 6 en la que la escisión de un sustrato facilita una enzima que puede después escindir un anclaje, dando como resultado de este modo la disociación de marcador fluorescente de un interruptor; o (2) uso de una MNazima para escindir un sustrato solamente en presencia de una diana, facilitándose después dicho sustrato para su implicación en un segundo acontecimiento, facilitando a su vez la realización de dicho segundo acontecimiento un sustrato adicional para su implicación en cualquier número de acontecimientos posteriores, de modo que un acontecimiento posterior facilita un sustrato para su implicación en la realización de un acontecimiento anterior, creando de este modo una cascada cíclica, tal como se representa en las Figuras 7 y 25, pudiendo emplearse tales cascadas cíclicas para amplificar una señal, por ejemplo, en aplicaciones en las que la baja abundancia de una diana no puede proporcionar de otro modo una señal que sea detectable.

Una cascada de amplificación de efecto detectable puede comprender uno o más de una cascada de ligasa/ribozima, una cascada de enzima de ácido nucleico circular, una cascada de enzima proteica o una o más enzimas unidas a un soporte o cualquier combinación de los mismos.

En referencia a la Figura 2, la estrategia 3 muestra una visión de conjunto de un procedimiento para usar una MNazima para amplificar una señal a través del uso de una cascada de señal. Esto se analiza en más detalle en referencia a las Figuras 6, 7 y 25.

La Figura 6 representa un procedimiento ejemplar de detección de MNazima de diana acoplada con amplificación de señal mediada por enzima. Como se ha analizado antes, la invención proporciona procedimientos para usar detección por MNazima en los que una diana se amplifica así como procedimientos en los que se amplifica una señal generada. En algunas realizaciones, la combinación de tecnología de MNazima con estrategia de amplificación de señal proporciona una alternativa a ensayos de MNazima combinados con amplificación de diana, aunque en algunos casos tanto la amplificación de diana como la amplificación de señal pueden usarse juntas. Los procedimientos preferidos para amplificar señales implican mecanismos de cascada, que como comprenderá el experto en la materia con frecuencia están implicados en la amplificación de señales en sistemas biológicos.

Se conocen en la técnica varios ejemplos de cascadas de amplificación, que usan ácidos nucleicos catalíticos, y se contemplan para su uso en el presente documento. Las cascadas de ligación (Paul y Joyce, 2004) usan una primera ribozima (A) que liga dos oligonucleótidos que contienen ARN para formar una segunda ribozima (B). La ribozima

(B) liga después otros dos oligonucleótidos que contienen ARN para formar una nueva primera ribozima (A), desencadenando de este modo una reacción en cascada.

Una segunda cascada de amplificación adecuada para su uso en el presente documento usa moléculas de sustrato/ADNzima circularizadas (Levy y Ellington, 2003). Una ADNzima (A) es inactiva cuando es circular, pero se activa por linealización por una segunda ADNzima (B) que escinde la ADNzima circular (A). La ADNzima lineal activa (A) escinde después las moléculas de ADNzima circular (B) linealizándolas y activándolas de este modo. Las dos ADNzimas capaces de escindir/linealizarse entre sí dan como resultado una cascada de actividad de ácido nucleico catalítico.

Los expertos en la materia entenderán que otros enfoques están disponibles, por ejemplo que combinan el uso de ADNzimas con la versatilidad de aptámeros y/o con el poder catalítico de enzimas proteicas tradicionales (véase, por ejemplo, Zhang y col., 2005). El procedimiento de Zhang da como resultado la liberación de una enzima proteica que puede, a su vez, catalizar la formación de moléculas detectables generando y amplificando de este modo la señal. El enfoque de Zhang permite detección sensible, pero es caro puesto que requiere moléculas altamente adaptadas para cada ensayo. Se conocen en la técnica procedimientos para acoplar péptidos con ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Cheng y col., 1993), así como procedimientos para unir ADN a estructuras de soporte. Por ejemplo, Asher (documento PCT/US96/02380) describió ligación de una enzima (ribozima) a un soporte insoluble, que tras su liberación, escindió un sustrato iniciando de este modo la amplificación de una señal usando dos ribozimas espacialmente separadas.

Otros ejemplos de amplificación de señal para procedimientos *in vitro* se conocen en la técnica y pueden crearse otras estrategias más para amplificar señales usando técnicas similares a las que han demostrado éxito. Por ejemplo, el ensayo de ADN ramificado (ADNr) (Urdea, 1993) amplifica una señal empleando una molécula indicadora secundaria (por ejemplo, fosfatasa alcalina) unida a sondas marcadas que median la reacción. La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) emplea amplificación electrónica de la señal (Eigen y Rigler, 1994). La amplificación de señal de tiramida (TSA) (Bobrow y col., 1989; Adams, 1992; Raap y col., 1995; van Gijlswijk y col., 1997), emplea peroxidasa de rábano rusticano para convertir tiramisida a su forma activa, que se une a restos de tirosina en proteínas. TSA se usa para diversas aplicaciones de inmunoquímica celular. El ensayo Invader (Hall y col., 2000) emplea dos oligonucleótidos que se unen a una secuencia diana de una manera que permite que la escisión de nucleasa conduzca a más de 1000 acontecimientos de escisión por molécula diana a lo largo del tiempo y la reacción de escisión puede acoplarse a una sonda fluorescente. Sin embargo, existen limitaciones a los procedimientos de amplificación de señal conocidos. Por ejemplo, el ensayo de ADNr no es tan sensible como los procedimientos de amplificación de diana.

Por lo tanto, con atención adicional a la Figura 6, se representa un ejemplo de un procedimiento que emplea una enzima liberada por MNAzimas como parte de una estrategia de amplificación de señal. La señal puede generarse, por ejemplo, por escisión enzimática de un sustrato entre un resto de fluoróforo y un resto interruptor, permitiendo de este modo que se genere una señal. Las enzimas contempladas para su uso en el presente documento incluyen, pero sin limitación, ADNzimas, MNAzimas, ribozimas y enzimas proteicas con actividad medible, tales como proteasas, endonucleasas de restricción y otras enzimas hidrolíticas. Las dianas preferidas son secuencias de ácido nucleico que incluyen, pero sin limitación, ADN o ARN humano, animal, vegetal, viral, bacteriano. Otras dianas preferidas pueden incluir moléculas de prión, levadura u hongo o cualquier otra, por ejemplo, incluyendo pero sin limitación glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de los mismos.

Como puede verse en la Figura 6, una enzima ejemplar, designada en el presente documento "Enzima" se une a un primer soporte insoluble, a través de una molécula escindible, preferentemente un ácido nucleico. Como se muestra en el ejemplo en la Figura 6, la molécula escindible que actúa como la unión para la enzima "Enzima" es un sustrato de MNAzima genérico o universal. También se une a un soporte insoluble no en contacto con el primer soporte insoluble un sustrato de "anclaje escindible" para la enzima "Enzima". La "Enzima" es cualquier enzima con una actividad detectable, por ejemplo una MNAzima, ADNzima, ribozima o enzima proteica como se ha descrito anteriormente. En realizaciones preferidas, las MNAzimas o ADNzimas son particularmente útiles. En presencia de componentes oligonucleotídicos, o partezimas, que se autoensamblan para formar una MNAzima capaz de escindir el sustrato genérico o universal y en presencia de la diana para la MNAzima, la MNAzima se forma y escinde catalíticamente "Enzima" del soporte, liberándola de este modo y permitiendo que acceda al sustrato de "anclaje escindible" y lo escinda. La escisión del "anclaje escindible" libera el fluoróforo del sustrato unido. El fluoróforo se detecta y mide fácilmente.

La separación física de una enzima inmovilizada o unida de su sustrato, que preferentemente también está inmovilizado o unido a un soporte, se denomina en ocasiones en el presente documento "separación espacial". Una o más enzimas pueden estar "separadas espacialmente" de sus sustratos respectivos y entre sí. Puede resultar una cascada de amplificación de señal, particularmente cuando la escisión del sustrato para la primera enzima libera la segunda enzima, que a su vez libera más primera enzima cuando el sustrato para la segunda enzima se escinde (véase Figura 7).

En realizaciones preferidas, el sustrato para la enzima "Enzima" es un sustrato bifuncional como se muestra, que comprende tanto una parte interruptora como una parte detectable. Se prefieren particularmente realizaciones en las que el sustrato para la enzima "Enzima" es una molécula sin señal detectable mientras está en el sustrato no escindido y cuya señal detectable aumenta de uno a muchos órdenes de magnitud tras la escisión.

En referencia ahora a la Figura 7, se muestra un ejemplo de un ensayo que usa MNAzimas y una amplificación de señal que usa dos enzimas "espacialmente separadas". También puede generarse una cascada de amplificación de señal usando tales ADNzimas "espacialmente separadas" como se ha descrito anteriormente. Un acontecimiento de escisión de MNAzima inicial escinde un sustrato ligado inmovilizado, liberando de este modo ADNzima A. La ADNzima A migra después a una segunda secuencia en la que una segunda ADNzima B está ligada. La ADNzima A libera la ADNzima B que, a su vez, libera más ADNzima A. Se inicia una cascada que da como resultado amplificación de la señal. En diversas realizaciones, la diana puede ser secuencia de ácido nucleico incluyendo, pero sin limitación, ADN o ARN humano, viral, bacteriano; o la diana puede ser proteínas, virus, priones, anticuerpos, células completas o moléculas pequeñas.

En particular, puede verse a partir del Ejemplo de la Figura 7 que la ADNzima A está unida a un soporte a través de un primer sustrato genérico o sustrato de MNAzima universal, que también se escinde por ADNzima B. La ADNzima B se une a un soporte insoluble a través de un segundo sustrato genérico que es un sustrato para ADNzima A. Ambas ADNzimas están conservadas de modo que sus sustratos respectivos les son inaccesibles. En presencia de las partezimas que se autoensamblan para formar una MNAzima que escinde el sustrato universal y en presencia adicional de la diana, la MNAzima se forma y escinde el sustrato de MNAzima universal conservando ADNzima A, liberando de este modo la ADNzima A. La ADNzima A puede migrar ahora al segundo sustrato genérico. Tras la escisión del segundo sustrato genérico por ADNzima A, la ADNzima B se libera junto con su señal detectable unida, mostrada en el presente documento como fluoróforo F. El fluoróforo F es detectable ahora puesto que se separa de una parte interruptora conservada Q. La ADNzima B liberada, que ahora puede acceder a su sustrato lo hace, escindiéndolo (el primer sustrato genérico) y liberando de este modo ADNzima A adicional, que a su vez libera más ADNzima B y señal detectable F. Por lo tanto, se establece una cascada de amplificación de señal potente, con cantidades exponencialmente crecientes de señal detectable F.

Un ejemplo de una cascada de MNAzima que usa partezimas ligadas puede entenderse mejor por referencia a la Figura 25. Las MNAzimas pueden usarse para iniciar cascadas de amplificación de señal como se ilustra en este diagrama. La reacción contiene los siguientes elementos; (i) partezimas para MNAzima 1 que están libres en solución; (ii) un facilitador de ensamblaje para MNAzimas 2 y 3 (que tienen las mismas ramas sensoras) que está libre en solución (como se ilustra) o ligado a un soporte insoluble por sustrato, Sub 1; (iii) partezimas para MNAzima 2 que están ligadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 1. Sub 1 puede escindirse por MNAzima 1 (en presencia de un analito diana) o MNAzima 3 (en presencia de un facilitador de ensamblaje) y la escisión da como resultado la liberación de las partezimas para MNAzima 2 en solución; (iv) partezimas para MNAzima 3 que están ligadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 2. Sub 2 puede escindirse por MNAzima 2 (en presencia de facilitador de ensamblaje) y la escisión da como resultado la liberación de las partezimas para la MNAzima 3 en solución; (v) Sub 2-FQ, que tiene la misma secuencia que Sub 2, pero está libre en solución y está marcado de forma dual con un fluoróforo (F) y un interruptor (Q). Sub 2-FQ puede escindirse por MNAzima 2 para generar una señal fluorescente.

En presencia del analito diana, la MNAzima activa 1 se forma a partir de partezimas que están libres en solución. La MNAzima 1 escinde su Sub 1 liberando de este modo partezimas para MNAzima 2. Una vez libres, estas partezimas se hibridan con el facilitador de ensamblaje y forman MNAzima 2, que escinde Sub 2-FQ libre (generando una señal fluorescente) o Sub 2 ligado (liberando partezimas para MNAzima 3). Puesto que MNAzima 3 comparte las mismas ramas de sustrato que la MNAzima 1, también puede escindir Sub 1 ligado, liberando de este modo más partezimas para MNAzima 2. Esto da como resultado una cascada de generación enzimática de los componentes (partezimas) para más enzimas (MNAzimas) y una cascada de amplificación de señal simultánea.

12. Procedimientos para la detección, identificación y cuantificación de ácido nucleico metilado

La generación de señal mediada por MNAzima permite diferenciación entre secuencias de ácido nucleico completamente coincidentes y las que contienen emparejamientos erróneos. Esta capacidad permite que las MNAzimas se usen para la detección, identificación y cuantificación del ácido nucleico metilado.

Con frecuencia se producen alteraciones en el patrón de metilación en relación con enfermedades tales como cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes y trastornos psiquiátricos. La amplia mayoría de protocolos actualmente usados para el análisis de metilación comienzan con modificación por bisulfito de ADN genómico. Las modificaciones de bisulfito convierten las citidinas no metiladas, pero no las metiladas, a uridinas. Si el ácido nucleico modificado con bisulfito se amplifica después, por ejemplo por PCR, las uridinas se reemplazan con timidinas y la citidina metilada se reemplaza con citidina. Los amplicones modificados pueden analizarse por diversos procedimientos que permiten la diferenciación de las secuencias que contienen T (en posiciones que originalmente contienen T no metilada) y C (en posiciones que originalmente contienen C metilada).

La capacidad de las MNAzimas para diferenciar entre variantes de secuencia cercanamente relacionadas hace a

esta tecnología bastante adecuada para diferenciar entre secuencias modificadas con bisulfito que originalmente estaban metiladas o no metiladas. El enfoque puede entenderse mejor por referencia al Ejemplo 11.

Además, las MNAzimas pueden proporcionar un nuevo enfoque que permite el análisis directo de ADN metilado y no metilado sin la necesidad de modificación con bisulfito. Esto proporciona una ventaja significativa debido a que la modificación con bisulfito es laboriosa, consume tiempo y es destructiva para el ácido nucleico a analizar.

El uso de una rama estabilizadora con una partezima que tiene una rama sensora truncada se ha usado para demostrar la capacidad de las MNAzimas para detectar polimorfismos de nucleótido sencillo presentes en facilitadores de ensamblaje (Ejemplo 22). En las condiciones experimentales usadas en este ejemplo, una partezima con una rama sensora truncada (cinco bases) fue funcional a una temperatura bastante por encima de su temperatura de fusión esperada. Los sistemas con ramas estabilizadoras y partezimas que tienen ramas sensoras truncadas, son muy sensibles a cambios pequeños en la diana y son susceptibles de uso a temperaturas altamente rigurosas. Esta estrategia de detección puede extenderse adicionalmente para diferenciar directamente entre dianas, que están metiladas o no metiladas en restos de citosina específicos, sin la necesidad de modificación de bisulfito anterior.

La presencia de 5-metilcitosina o 5-metilcitosinas aumenta la temperatura de fusión de ADN en 1,3 °C por base metilada, en relación con citosina o citosinas no metiladas. Cuando las partezimas, una rama estabilizadora y un sustrato se incuban a una temperatura que es adecuada para hibridación y ensamblaje de MNAzima activa en presencia de una diana metilada, pero que es demasiado alta para el ensamblaje de MNAzima en presencia de una diana no metilada, se generaría una señal solamente en presencia de la diana metilada. Esto proporciona una nueva estrategia para análisis directo de patrones de metilación que pueden proporcionar un procedimiento para la detección de bases de metilación como marcadores de cáncer y otras enfermedades.

Los expertos en la materia apreciarán por tanto fácilmente y entenderán que la optimización de parámetros experimentales incluyendo temperatura como se desvela en el presente documento se contempla como dentro del alcance de los procedimientos de la presente invención y que dicha optimización encuentra aplicación particular en la realización de procedimientos en relación con la detección de ADN metilado directamente o después de modificación con bisulfito.

13. Procedimientos para detección e identificación de variantes de secuencia de ácido nucleico

La presente invención proporciona adicionalmente procedimientos para la detección e identificación de variantes de secuencia basándose en que la generación de señal mediada por MNAzima permite la diferenciación entre secuencias de ácido nucleico completamente coincidentes y las que contienen emparejamientos erróneos.

Las variaciones de secuencia capaces de detección por los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, adiciones, deleciones, sustituciones, conversiones, duplicaciones, translocaciones, variantes de secuencia de desplazamiento de fase, variantes de secuencia sin sentido o cualquier combinación de las mismas.

Los procedimientos pueden aplicarse en cualquier situación en la que sea deseable detectar y/o identificar una variación de secuencia de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitación diagnóstico de enfermedades o predisposiciones a las mismas, identificación de polimorfismos o evaluación de fidelidad de replicación de ácidos nucleicos. Además, también pueden detectarse alteraciones mayores tales como translocaciones asociadas con diversos tipos de cáncer, que dan como resultado transcritos de fusión. Estas se producen frecuentemente en asociación con leucemia. Por ejemplo, los transcritos de fusión *PML/RARα* se asocian con leucemia promielocítica aguda y los transcritos de fusión *bcr/abl* se asocian con leucemia granulocítica crónica.

Puede producirse detección de diana mediada por MNAzima mediante reconocimiento de bases de Watson-Crick de las ramas sensoras de la partezima y el facilitador de ensamblaje. El requisito de complementariedad puede explotarse para detectar variaciones de secuencia pequeñas, incluyendo pero sin limitación, emparejamientos erróneos de base sencilla entre la rama sensora de la partezima y el facilitador de ensamblaje. La capacidad de diferenciación de variantes de secuencia puede entenderse mejor por referencia a los Ejemplos 5, 19 y 22.

Todos esos ejemplos demuestran la capacidad de las MNAzimas para diferenciar entre situaciones en las que la rama sensora y el facilitador de ensamblaje son completamente coincidentes y situaciones en las que hay al menos un emparejamiento erróneo o polimorfismo de base sencilla.

La capacidad para diferenciar emparejamientos erróneos de base sencilla depende de varios factores, incluyendo (a) la rigurosidad de las condiciones de reacción, que pueden verse influidas por muchos factores incluyendo la temperatura, concentración salina, concentración de cationes, (b) el tipo de emparejamiento erróneo, (c) la posición del emparejamiento erróneo dentro de la rama de partezima y (d) la longitud de la rama de partezima. Dependiendo de la aplicación, la rigurosidad de la reacción puede adaptarse para ser intolerante o tolerante, hasta cierto grado de emparejamiento erróneo entre la rama sensora y el facilitador de ensamblaje. Las condiciones rigurosas permiten la diferenciación de variantes de secuencia cercanamente relacionadas, tales como una diferencia de un solo nucleótido. Las condiciones de menor rigurosidad pueden no diferenciar entre facilitadores de ensamblaje con secuencias cercanamente relacionadas. Por lo tanto, esto podría explotarse para detectar simultáneamente un

grupo de secuencias cercanamente relacionadas en una reacción sencilla con una MNAzima sencilla.

La diferenciación de polimorfismos de nucleótido sencillo puede extenderse por el uso de partezimas con ramas sensoras truncadas (Figura 23 y Ejemplo 22). Pueden estabilizarse ramas sensoras truncadas por un componente oligonucleotídico estabilizador, que aunque es una molécula separada, puede considerarse como un segundo componente de la partezima truncada, a la que se une de forma adyacente.

14. MNAzimas para detección, identificación y/o cuantificación de bacterias y virus.

La presente invención abarca procedimientos para la detección de bacterias, virus o cualquier otro microorganismo, por ejemplo, a través del diseño de ramas sensoras de MNAzima que se adaptan para hibridar con cualquier molécula tal como un ácido nucleico que es único para el microorganismo que se busca detectar, identificar y/o cuantificar. Adicionalmente, o como alternativa, puede detectarse una clase de microorganismo, por ejemplo, incluyendo pero sin limitación bacterias Gram positivas o Gram negativas. Las variaciones adicionales de los procedimientos que están dentro del alcance de la contemplación del experto en la materia incluyen, pero sin limitación, uso de un aptámero adaptado para unirse a una proteína, molécula pequeña, célula, componente celular o producto celular tal como una toxina que es única para el microorganismo que se busca detectar, identificar y/o cuantificar.

Las bacterias y virus contienen ADN y/o ARN que puede proporcionar un molde para su identificación, detección y/o cuantificación rápida y sensible usando tecnología de MNAzima. La variación de secuencia entre especies y cepas bacterianas y virales puede usarse para permitir la diferenciación sensible entre especies y cepas individuales. Se prefieren particularmente enfoques de MNAzima múltiples para la detección y/o diferenciación simultánea de especies, cepas o aislados bacterianos o virales múltiples.

Como alternativa, pueden usarse regiones de similitud de secuencia entre especies y cepas bacterianas o virales para identificar la presencia o ausencia de cualquiera de un grupo de especies y cepas individuales en un ensayo de MNAzima sencillo. Este último enfoque se ejemplifica en el Ejemplo 15 en el que se usó una región conservada hallada en la secuencia 16S ribosómica bacteriana como la base de un ensayo para reemplazar el ensayo bacteriano de una tinción de Gram para un ensayo de liberación rápido con respecto a esterilidad y/o contaminación de micoplasma.

El Ejemplo 16, que ilustra el uso de MNAzimas para la detección y cuantificación de ARN viral de VIH-1, demuestra el uso de MNAzimas como una herramienta sensible para la detección y cuantificación viral.

15. Kits

La presente invención también proporciona kits para realizar los procedimientos desvelados en el presente documento. Típicamente, los kits para llevar a cabo los procedimientos de la presente invención contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento. Por ejemplo, en una realización un kit puede comprender un primer recipiente que contiene al menos un primer y segundo componentes oligonucleotídicos que comprenden una primera y segunda partezima y un segundo recipiente que comprende un sustrato, en el que el autoensamblaje de la primera y segunda partezimas y el sustrato en una MNAzima requiere asociación de un facilitador de ensamblaje presente en una muestra de ensayo. En consecuencia, en dicha realización, la primera y segunda partezimas y el sustrato, pueden aplicarse a la muestra de ensayo para determinar la presencia del facilitador de ensamblaje, comprendiendo el facilitador de ensamblaje la diana.

Típicamente, los kits de la presente invención también comprenderán uno o más recipientes adicionales, que contienen, por ejemplo, reactivos de lavado y/u otros reactivos según se requiera en la realización de los procedimientos de la invención.

En el contexto de la presente invención, un kit compartimentalizado incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes separados y pueden incluir recipientes de vidrio pequeños, recipientes de plástico o tiras de plástico o papel. Tales recipientes pueden permitir la transferencia eficaz de reactivos de un compartimiento a otro compartimiento evitando a la vez la contaminación cruzada de las muestras y reactivos y la adición de agentes o soluciones de cada recipiente de un compartimiento a otro de una manera cuantitativa. Tales kits pueden también incluir un recipiente que aceptará la muestra de ensayo, un recipiente que contiene los reactivos usados en el ensayo, recipientes que contienen reactivos de lavado y recipientes que contienen un reactivo de detección. Típicamente, un kit de la presente invención también incluirá instrucciones para usar los componentes del kit para realizar los procedimientos apropiados. Los kits y procedimientos de la invención pueden usarse junto con equipamiento y sistema de análisis automático, por ejemplo, incluyendo pero sin limitación, máquinas de PCR en tiempo real.

Para aplicación a detección, identificación o cuantificación de diferentes dianas, puede ser aplicable un kit sencillo de la invención o como alternativa pueden requerirse diferentes kits, por ejemplo que contienen reactivos específicos para cada diana. Los procedimientos y kits de la presente invención encuentran su aplicación en cualquier circunstancia en la que sea deseable detectar, identificar o cuantificar cualquier entidad.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos específicos, que no deberían interpretarse como limitantes en ningún modo del alcance de la invención.

Ejemplos

5 En los siguientes ejemplos, se adaptaron varios diseños de MNAzima, basándose en la división del núcleo catalítico de la ADNzima 10:23 o la 8:17, para una diversidad de sustratos y ácidos nucleicos diana (Tabla 3). Estos sistemas de sustrato diana se han ensayado en una diversidad de condiciones de reacción y se ha demostrado que son robustos.

10 Los diseños de MNAzima y partezimas específicas ejemplares usados en los siguientes ejemplos se enumeran en la Tabla 3. Las partezimas se nombran de modo que el nombre (por ejemplo, RO4A1/1) incorpora la referencia al dominio diana (por ejemplo, RO4 para RPLPO exón 4), el dominio requerido para actividad catalítica de MNAzima (por ejemplo A1) y el dominio de sustrato (por ejemplo 1 para SubBi-1).

Tabla 3: Sustratos y MNAzimas ejemplares. Parteizimas específicas usadas en los ejemplos de trabajo

Diseños de MNAzima (Núcleo Catalítico)	Parteizimas A y B	Sustrato de dianas de parteizimas específicos	Ejemplos (Figuras)
1 (8:17)	A1:B1	RO4A1/1: RO4B1/1 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (8)
2 (8:17)	A1:B2	RO4A1/1: RO4B2/1 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (8)
3 (8:17)	A1:B3	RO4A1/1: RO4B3/1 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (9,10)
4 (8:17)	A2: B3	RO4A2/1: RO4B3/1 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 y 4 (10,14)
		miR20A2/1: miR20B3/1 MiR-20	2, 5 y 6 (11, 12, 15, 16)
		AtpA2/1: Atp B3/1 ATP y dATP SubBi-1-FB (1)	18
		TaqA2/1: AtpB3/1 Taq polimerasa SubBi-1-FB (1)	21
		miR143 A2/1: miR143 B3/1 miR143	12
		miR143 A2/1: miR143 B3H/1 miR143	12
		miR143 A2H/1: miR143 B3/1 miR143	12
		miR143 A2H/1: miR143 B3H/1 miR143	12
5 (10:23)	A3:B4	ROSA3/2: RO5B4/2 RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	3 (13)

(cont)			
Diseños de MNAzima (Núcleo Catalítico)	Partezimas A y B	Sustrato de dianas de partezimas específicos	Ejemplos (Figuras)
6 (10:23)	A4:B5	RO5A4/2: RO5B5/2 RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	3 (13)
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-3-FB (3)	8 (17)
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-3-Q6B2 (3)	13
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-3-JB (3)	9 (19)
		RO5A4/4-P: RO5B5/4-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-4-JB (4)	14
		RO5A4/2-P: RO5B5(16)/2-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
		RO5A4/2-P: RO5B5/2-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2 (2)	24
		nfR20A4/2: miR20B5/2 miR-20 SubBi-2-FB (2)	9 (19)
		PCR7aA412-P: PCR7aB5/2-P Let-7a SubBi-2-FB (2)	10
		BaA4/2-P: BaB5/2-P B-actina SubBi-2-JB (2)	13
		BaA4/7-P: BaB5/7-P B-actina SubBi-7-FB (7)	14
		BCRA4/6-P: BCRB5/6-P BCR SubBi-6-TRB2 (6)	13 y 14
		HPRTA4/7-P: HPRTB5/7-P HPRT SubBi-7-FB (7)	13
		HPRTA4/2-P: HPRTB5/2-P HPRT SubBi-2-A350B (2)	14

(cont)			
Diseños de MNAzima (Núcleo Catalítico)	Partezimas A y B	Sustrato de dianas de partezimas específicos	Ejemplos (Figuras)
		RO4A4/3-P: RO4B5/3-P RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-3-Q6B2 (3)	14
		RO4A4/3-5b: RO4B5/3-3b RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-3-FB (3)	24
		NefA4/6-P: NefB5/6-P HIV-1 Nef SubBi-6-TRB2 (6)	16
		XdA4/2-P: XdB5/2-P Xd SubBi-2-FB (2)	22 (23)
7 (10:23)	A5:B6	p16A5/3-P: p16B6/3-P p16 SubBi-3-FB (3)	11
		16S1A5/2-P: 16S1B6/2-P 16 S ribosómico bacteriano SubBi-2-FB (2)	15
		RO5A5/2(22)-P:RO5B6/2 (11G)-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	19 (22)
		RO5A5/2(22)-P:RO5B6/2 (11C)-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	19 (22)
		RO5A5/2(22)-P: RO5B6(16)/2 RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
		RO4A5/2: RO4B6/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-G14A: RO4B6/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-A12T: RO4B6/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		R04A5/2-A11T: RO4B6/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17

(cont)			
Diseños de MNAzima (Núcleo Catalítico)	Partezimas A y B	Sustrato de dianas de partezimas específicos	Ejemplos (Figuras)
		RO4A5/2-A9T: RO4B6/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2: RO4B6/2-C7A RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2: RO4B6/2-T4C RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5(18)/2-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4A5(18)/2-rA9-P RO4B6 (19)/2-P RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4A5(18)/2-rG14-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4rA5(18)/2: RO4B6 (19)/2-P RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4A5(18)/2-P: RO4rB6(19)/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4rA5(18)/2: RO4rB6(19)/2 RPLPO exón 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
8 (10:23)	A6:B7	RO5A6(22)/2-P: RO5B7(16)/2-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
9 (10:23)	A7:B8	RO5A7(22)/2-P: RO5B8(16)/2-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
10 (10:23)	A8:B9	RO5A8(22)/2-P: RO5B9(16)/2-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
11 (10:23)	A9:B10	RO5A9(22)/2-P: RO5B10(16)/2-P RPLPO exón 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20

Ejemplo 1: Aplicación de MNAzimas a la detección directa de un ácido nucleico diana (secuencia de RPLPO humano).

1.1. Oligonucleótidos de Partezima

Se ensayaron cuatro diseños de MNAzimas (Figuras 8-10) basados en la ADNzima 8:17. Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de rama sensora (unión de diana) designadas por "N" pueden reemplazarse con secuencias específicas de diana para cualquier diana de ácido nucleico conocida (Figuras 8-10). Las secuencias de rama de sustrato, que se unen al sustrato indicador, pueden ser genéricas y usarse para muchas dianas. Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de sustrato designadas por "N" en las Figuras 8-10 pueden reemplazarse por secuencias de ADN, ARN o quiméricas de ADN/ARN y las designadas por "r" pueden reemplazarse por otras y/o un número diferente de secuencias de ribonucleótidos.

En los experimentos realizados para medir la actividad catalítica de las MNAzimas de RPLPO descritas en las Figuras 8-10, las partezimas oligonucleotídicas A y B se diseñaron para dirigirse al exón 4 del gen de RPLPO. Las secuencias de las partezimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3' en las que las bases subrayadas forman al menos parte del núcleo catalítico activo de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato.

SEC ID N°1: Partezima A1 RO4A1/1:

GCTGGTCATCCAGCACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID N°2: Partezima A2 R04A2/1:

GCTGGTCATCCAGCACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID N°3: Partezima B1 RO4B1/1:

CATCTCTTCTCCGTCGAAAGTGTTCGACAATGGC

SEC ID N°4: Partezima B2 R04B2/1:

CATCTCTTCTCCGTCGTTTCGACAATGGC

SEC ID N°5: Partezima B3 R04B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCGTGTTCGACAATGGC

1.2. Sustrato Indicador

La actividad de MNAzima se controla por escisión de un sustrato indicador de ácido nucleico marcado de forma dual. La secuencia de sustrato es una secuencia quimérica que contiene bases tanto de ARN como de ADN que se ha usado previamente como un sustrato de ADNzima 8:17 (Li y col., 2000). En el presente ejemplo, el sustrato indicador se designa SubBi-1-FB y tiene marcadores internos, concretamente 6-carboxifluoresceína ("6-FAM") unida a un nucleótido 5' de la base de ARN y un resto de interruptor Black Hole 1 ("BHQ1") unido a un nucleótido 3' de la base de ARN. La escisión de SubBi-1-FB por MNAzimas se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia marcada de SubBi-1-FB es como sigue, de 5' a 3', indicando las bases subrayadas la posición de la 6-FAM y los restos de BHQ1. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N° 6: SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATG

1.3. Secuencia de MNAzima de Control

El control de hibridación (MNAzima inactiva) se inactivó mutando una base sencilla en el oligonucleótido A1 que es esencial para la formación del núcleo catalítico. Aunque tanto el sustrato indicador como las secuencias diana aún pueden unirse a las MNAzimas, el sustrato no puede escindirse debido a la modificación en el núcleo catalítico de la MNAzima. La unión de un sustrato indicador a las moléculas de partezima podría por sí misma generar una medida de fluorescencia debido a cambio conformacional del sustrato indicador tras hibridación. Se incluyó un control que emplea una molécula de partezima A1 mutada (RO4A1mut) y se designó el control de hibridación. La secuencia de MNAzima mutada se ilustra a continuación y la posición de la base G que se cambió a T está subrayada.

SEC ID N°: 7: Partezima Mutante A

RO4A1mut/1:GCTGGTCATCCAGCACGGTCIAAATAGTGAGT

1.4. Diana

La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido, diana RO4/1, que tiene la misma secuencia que una sección del exón 4 del gen de RPLPO humano. La secuencia de diana RO4/1 es como sigue, escrita de 5' a 3'.

SEC ID N°: 8 Diana RO4/1:

GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

Para asegurar que una señal no puede detectarse cuando una secuencia diana incorrecta está presente se determinó el efecto “fuera de diana” usando 3 µg de ADN lambda (PROMEGA) o un oligonucleótido de control negativo sintético de secuencia no relacionada (Diana RO4/1mut).

SEC ID N°: 9 Diana RO4/1mut:

5 CGACCATTAGGTCGTCCACAAGCTGTTACCG

1.5. Componentes de Reacción

10 La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de señal fluorescente causado por escisión del sustrato indicador por la MNazima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron a 40 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 7 segundos durante un total de 10 minutos. Todas las reacciones en la Tabla 4 contenían la mezcla a granel de SubBi-1-FB 1 µM en Tris HCl (pH 9,0 a 25 °C) y MgCl₂ 25 mM.

Tabla 4: Componentes de reacción para la detección de un ácido nucleico.

Diseño	Reacción de MNazima	Partezimas		Diana	Figura
		A	B		
1	Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B1/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	Figura 8
	Sin Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B1/1 1 µM	H ₂ O	
2	Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B2/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	
	Sin Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B2/1 1 µM	H ₂ O	
3	Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	Figura 9
	Sin Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	H ₂ O	
	Fuera de Diana 1	RO4A1/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	Diana RO4/1 mut 1 µM	
	Fuera de Diana 2	RO4A1/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	3 µg de ADN Lambda	
	Control de hibridación	RO4A1mut/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	
	Solamente Partezima A	RO4A1/1 1 µM	-	Diana RO4/1 1 µM	
	Solamente Partezima B	-	RO4B3/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	
3	Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	Figura 10
	Sin Diana	RO4A1/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	H ₂ O	
4	Diana	RO4A2/1 1 µM	RO4B3/1 1 µM	Diana RO4/1 1 µM	
	Sin Diana	1 µM RO4A2/1 µM	1 µM RO4B3/1 µM	H ₂ O	
Todos	Fondo	-	-	-	-

Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante un experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo, puesto que se sabe que éste varía entre los pocillos. Este se midió leyendo la fluorescencia de la mezcla a granel solamente. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir la comparación entre pocillos.

5 **1.6. Resultados: detección de escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB**

Las MNAzimas de diseño 1 y 2 mostraron pocas pruebas de escisión dependiente de diana del sustrato indicador en las condiciones de este experimento (Figura 8). La fluorescencia fue similar para las reacciones con, y sin, diana oligonucleotídica de RPLPO diana. La adición de oligonucleótido de RPLPO diana dio como resultado un aumento de fluorescencia para el diseño 3 (Figura 9 y 10) y el diseño 4 (Figura 10). Esto es coherente con la formación de MNAzimas activas en presencia de ácido nucleico diana dando como resultado escisión del sustrato indicador entre el par de colorante interruptor y fluoróforo provocando un aumento de la fluorescencia. La fluorescencia de los controles sin diana fue inferior a la de las reacciones que contienen diana y ninguna de las reacciones de control mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo (Figuras 8-10). Esto demuestra que el aumento de fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debe a ensamblaje dependiente de diana de una MNAzima catalíticamente activa que escinde después el sustrato indicador. La eficacia de escisión del diseño 4 fue mayor que la del diseño 3 para el sistema de RPLPO (Figura 10).

Las reacciones de control fuera de diana, hibridación, partezima A solamente y partezima B solamente se muestran para el diseño 3 (Figura 9). Los niveles de fluorescencia de estos controles eran más bajos que o similares a los de las reacciones sin diana. Ninguna de las reacciones de control mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Estos resultados demuestran adicionalmente que la escisión del sustrato indicador depende de la presencia de los oligonucleótidos tanto de partezima A como de partezima B que se requieren para ensamblaje de una MNAzima activa, así como la secuencia de ácido nucleico diana.

Ejemplo 2: MNAzimas para la detección de miR-20 o secuencias de ADN cortas homólogas a miR-20.

2.1. Oligonucleótidos de Partezima

También puede usarse detección que emplea MNAzimas para el análisis de miR. En este ejemplo, la MNAzima solamente se forma cuando está presente la secuencia de miR correcta. Esta MNAzima puede distinguir entre secuencias de miR relacionadas, por ejemplo hsa-miR-20 y hsa-miR-93.

En los experimentos realizados para medir la actividad catalítica de la MNAzima descritos en la Figura 11, los oligonucleótidos de partezima A y B se diseñaron para dirigirse a hsa-miR-20. Las secuencias de los oligonucleótidos de partezimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID N° 10: Partezima A2:

miR20A2/1:**TACCTGCACTACGGTCGAA**ATAGTGAGT

35 SEC ID N° 11: Partezima B3:

miR20B3/1:CATCTCTTCT**C**CGAGCT**AAGCACTTTA**

2.2. Sustrato Indicador

Se controla la actividad de MNAzima por escisión de un sustrato indicador de ácido nucleico marcado de forma dual. El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6 FAM en el extremo 5' y un resto BHQ1 en el extremo 3'. Los cambios en fluorescencia debido a escisión de SubBi-1-FB en el ribonucleótido entre FAM y BHQ1 se controlaron a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID N° 6: SubBi-1-FB:

45 ACTCACT**A**TaGGAAGAG**A**T**G**

2.3. Diana

La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido de ADN, D-20, que tiene una secuencia que es homóloga a la especie de ARN hsa-miR-20 (Figura 11 (i)). La secuencia de la diana D-20 es la siguiente, escrita de 5' a 3'.

50 SEC ID N° 12: Diana D-20:

TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

2.4. Secuencias de Control

Cualquier ensayo desarrollado para detectar microARN debe distinguir específicamente la secuencia de miR deseada por ejemplo hsa-miR-20 de secuencias relacionadas tales como hsa-miR-17-5p, que pueden diferir del miR diana en una o más bases (Figura 11 (i)). Los oligonucleótidos “fuera de diana” relacionados con hsa-miR-20 17-5p, 93, 106a y 106b miR también se sintetizaron como ADN y se escriben de 5' a 3' a continuación.

SEC ID N° 13: Diana D-17-5p:

CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

SEC ID N° 14: Diana D-93:

AAAGTGCTGTTCGTGCAGGTAG

SEC ID N° 15: Diana D-106a:

AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGC

SEC ID N° 16: Diana D-106b:

TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT

2.5. Condiciones de Reacción

La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de señal de fluorescente causado por escisión del sustrato indicador por la MNazima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 40 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 7 segundos durante un total de 4 minutos. Todas las reacciones en la Tabla 5 contenían la mezcla a granel que consistía en SubBi-1-FB, 1 µM, Tris HCl (pH 9,0 a 25 °C) y MgCl₂ 25 mM.

Tabla 5: Componentes de reacciones para la detección de una diana de ácido nucleico como se muestra en la Figura 11

Reacción de MNazima	Molde	Partezima A	Partezima B
Diana	D-20 1 µM	miR20A2/1 1 µM	miR20B3/1 1 µM
Sin Diana	H ₂ O		
Fuera de Diana17-5p	D-17-5p 1 µM		
Fuera de Diana D-93	D-93 1 µM		
Fuera de DianaD-106a	D-106a 1 µM		
Fuera de DianaD-106b	D-106b 1 µM		
Solamente Partezima A	D-20 1 µM	miR20A2/1 1 µM	-
Solamente Partezima B	D-20 1 µM	-	miR20B3/1 1 µM

Cada pocillo de reacción del termociclador SmartCycler® System (Cepheid) usado durante el experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo, puesto que se sabe que éste varía entre pocillos. Este se midió leyendo la fluorescencia de la mezcla a granel sola. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en cada pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

También se realizaron reacciones que contenían diana, “sin diana” y “fuera de diana” en presencia de concentraciones de MgCl₂ 5 mM y 100 mM y se compararon con MgCl₂ 25 mM (Figura 12).

2.6. Resultados: Detección de escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB

Los oligonucleótidos de partezima A y B de la MNazima se ensamblan en una MNazima catalíticamente activa para escindir el sustrato indicador solamente en presencia de la secuencia diana. En este ejemplo, los controles fuera de diana tienen tan poco como dos bases emparejadas de forma errónea con las ramas sensoras (secuencia de unión a diana miR-20). El “fuera de diana” D-17-5p tienen dos bases emparejadas erróneamente, apareciendo solamente

una de ellas en la región más diferenciada localizada en la mitad de la secuencia de miR-20. La reacción de escisión que contiene la secuencia diana D-20 proporcionó un aumento de 26 veces de la señal en comparación con el control sin diana (Figura 11 (iii)). Esto se compara con los controles fuera de diana, D-17-5p y D-106a, que proporcionan un aumento de 3,5 veces en la señal en comparación con el control sin diana y D-93 y D-106b que no proporcionan aumento de la señal en comparación con el control sin diana (Figura 11 (iii)). Por lo tanto, la diferenciación de D-20 de secuencias relacionadas demuestra la capacidad del sistema de MNAzima para diferenciar secuencias que difieren en solamente unas pocas bases. Estudios anteriores usando ADNzimas unimoleculares han demostrado que las ADNzimas tienen la capacidad de distinguir mutaciones de base sencilla (Impey y col, 2000). Las MNAzimas también permiten la diferenciación de cambios de base única (véase, Ejemplo 5 posterior).

Los controles de "solamente partezima A" y "solamente partezima B" tuvieron una fluorescencia similar a la de la fluorescencia de fondo (datos no mostrados).

El uso de enzimas proteicas requiere que otros reactivos en la reacción estén a concentraciones que son óptimas para la actividad enzimática proteica. Por ejemplo, la concentración del cofactor de ión metálico que ayuda a una ADNzima en la escisión de sustrato indicador se mantiene a un mínimo en protocolos que utilizan enzimas como polimerasas. La detección directa usando MNAzimas no requiere ninguna enzima proteica y por lo tanto las condiciones de reacción pueden optimizarse para escisión de sustrato rápida. En estas reacciones el cofactor de ión metálico por ejemplo Mg^{2+} puede aumentarse para optimizar la tasa catalítica de la MNAzima. La Figura 12 muestra cómo la concentración de $MgCl_2$ puede aumentarse a niveles que normalmente no pueden tolerarse en protocolos de detección de diana. A $MgCl_2$ alto (100 mM) la eficiencia catalítica de la MNAzima es mayor. Además, al detectar diana D-20 un aumento en el $MgCl_2$ no afectó a la especificidad de la reacción, puesto que la diana D-20 aún es claramente distinguible de las secuencias relacionadas D-17-5p, diana D-106a, diana D-93 y diana D-106b.

Ejemplo 3: MNAzimas (diseños 5 y 6) para detección directa de una diana de ácido nucleico

3.1. Oligonucleótidos de Partezima

Los diseños 5 y 6 para MNAzimas, basados en la ADNzima 10:23, se ensayaron con respecto a actividad catalítica (Figura 13). Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de rama sensora (unión de diana) designadas con "N" pueden reemplazarse por secuencias específicas de diana para cualquier diana de ácido nucleico conocida. Las secuencias de rama de sustrato, que se unen al sustrato diana, pueden ser genéricas y usarse para muchas dianas. Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de sustrato designadas con "N" en la Figura 13 pueden reemplazarse con secuencias de ADN, ARN o quiméricas de ADN/ARN.

Los experimentos realizados para medir la actividad catalítica de las MNAzimas de RPLPO descritas en la Figura 13, las partezimas oligonucleotídicas A y B se diseñaron para dirigirse al exón 5 del gen de RPLPO. Las secuencias de las partezimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3' en las que las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Las secuencias que no están subrayadas, en **negrita** o en *cursiva* en SEC ID N° 17 y SEC ID N° 18 preferentemente forman una estructura de tallo tal como la representada en la Figura 13 (véase, por ejemplo, diseño 5).

SEC ID N° 17 partezima A3 RO5A3/2:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCGCAACAACGAGAGGAAACCTT

SEC ID N° 18 partezima B4 RO5B4/2:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTGCMGTGGAGACGGATTACACCTTC

SEC ID N° 19 partezima A4 RO5A4/2:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGAGGAAACCTT

SEC ID N° 20 partezima B5 RO5B5/2:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC

3.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en el extremo con un resto de 6 FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N° 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

3.3. Secuencias Diana

La secuencia diana para este ejemplo fue una diana RO5/1 oligonucleotídica sintética con la secuencia, de 5' a 3', a continuación como sigue. Esta secuencia diana tiene la misma secuencia que una sección del gen de RPLPO, exón 5.

5 SEC ID N° 22 diana RO5/1:

GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

3.4. Componentes de la Reacción

10 La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de señal fluorescente provocado por escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron a 55 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 7 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones en la Tabla 6 contenían SubBi-2-FB 1 µM, Tris HCl (pH 9,0 a 25 °C) y MgCl₂ 25 mM.

15 **Tabla 6: Componentes de reacciones para detección de una diana de ácido nucleico como se muestra en la Figura 13**

Diseño	Partezima A (1 µM)	Partezima B (1 µM)	Reacción de MNAzima	Target
5	RO5A3/2	RO5B4/2	Diana	RO5/1 1 µM
			Sin Diana	H ₂ O
6	RO5A4/2	RO5B5/2	Diana	RO5/1 1 µM
			Sin Diana	H ₂ O

20 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) usado durante el experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo, puesto que se sabe que éste varía entre los pocillos. Este se midió leyendo la fluorescencia de la mezcla a granel sola. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

3.5. Resultados: Detección y Escisión de Sustrato

25 Las reacciones que contenían diana, con las MNAzimas de los diseños 5 y 6, mostraron un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo en comparación con el control sin diana (Figura 13ii), paneles superior e inferior, respectivamente. Esto demuestra que los oligonucleótidos de partezima se ensamblan en una MNAzima catalíticamente activa y escinden el sustrato indicador solamente en presencia de la secuencia diana. Los controles sin diana no mostraron un aumento de fluorescencia lo que indica que no se estaba produciendo escisión. La tasa de escisión para el diseño 6 era considerablemente más rápida que para el diseño 5.

Ejemplo 4: Detección de amplicones de amplificación de PCR in vitro de una secuencia de ácido nucleico usando MNAzimas

30 4.1. Oligonucleótidos de Partezima

35 Las MNAzimas también pueden usarse para detectar amplicones de secuencia de ácido nucleico amplificada *in vitro*. Para este ejemplo, se realiza detección de amplicones como un procedimiento de dos etapas pero también puede realizarse en una reacción sencilla. En este caso, los oligonucleótidos usados para detectar los amplicones se basaron en el diseño 4 usando los oligonucleótidos RO4A2/1 y RO4B3/1 (Figura 10), que detecta el gen de RPLPO humano. Los oligonucleótidos de partezima A y B se enumeran a continuación. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan la diana y las fases en cursivas hibridan con el sustrato.

SEQ ID N°: 2 Partezima A2 RO4A2/1:

GCTGGTCATCCAGCAGCGGTCGAAATAGTGAGT

40 SEC ID N°: 5 Partezima B3 RO4B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGC**GTGTT**CGACAATGGC

4.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. La escisión de SubBi-1-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de FAM).

5 SEC ID N°: 6 SubBi-1-FB:

ACTCAC^TATaGGAAGAGAT^G

4.3. Cebadores para amplificación de gen de RPLPO humano por PCR

10 La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación de secuencia por PCR *in vitro* a partir del exón 4 del gen de RPLPO de ADN genómico humano extraído de línea celular K562 (PROMEGA), usando los cebadores de PCR enumerados a continuación.

SEQ ID N°: 23 Cebador 5RO4/3:

CAAGACTGGAGACAAAGTG

SEQ ID N°: 24 Cebador 3RO4/2:

GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

15 4.4. Oligonucleótido Diana de Control

Se sintetizó un oligonucleótido y se usó como un control positivo para secuencia de RPLPO. El oligonucleótido de control no se amplificó por PCR en estos experimentos.

SEC ID N°: 8 Diana RO4/1:

GCCATTGTCGAACACCTGCTGGATGACCAGC

20 4.5. Componentes de Reacción: Amplificación por PCR del gen de RPLPO

Se realizó una amplificación por PCR del gen de RPLPO en volumen total de reacción de 25 µl. todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 5 minutos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 55 °C durante 30 segundos. Todas las reacciones contenían 5RO4/3 40 nM y 3RO4/2 200 nM, MgCl₂ 3 mM, 200 µM de cada dNTP, Immobuffer 1x (Bioline) y 1 unidad de Immolase (Bioline) con o sin 500 ng de ADN genómico humano de K562 (PROMEGA).

25 4.6. Componentes de Reacción: Detección de secuencia diana

30 La detección de secuencia diana se midió por un aumento en la señal de fluorescencia provocado por la escisión del sustrato diana por MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. todas las reacciones se realizaron a 40 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se midió cada 7 segundos durante un total de 10 minutos. Todas las reacciones de la Tabla 7 contenían la mezcla a granel de SubBi-1-FB 1 µM, Tris HCl (pH 9,0 a 25 °C) y MgCl₂ 25 mM. Las concentraciones de Partezimas oligonucleotídicas A y B son 1 µM.

35 **Tabla 7: Componentes de reacción para la detección de amplicones de ADN de RPLPO después de PCR *in vitro*. Los sistemas de MNAzima usaron el diseño 4 (R04A2/1:R04B3/1)**

Reacción de MNAzima de RPLPO	Diana
Oligo-diana (RPLPO de Control Positivo)	10 ¹² copias de Oligo Diana RO4/1
Diana-RPLPO producto de PCR (Ensayo)	5 µl de producto de PCR de RPLPO (equivalente a 100 ng de ADN genómico)
Sin Diana (RPLPO de Control Negativo)	5 µl de H ₂ O
ADN genómico no amplificado (Control Negativo)	5 µl que contienen 500 ng de ADN genómico

Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) usado durante el experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo, puesto que se sabe que este varía entre pocillos.

Este se midió leyendo la fluorescencia de la mezcla a granel sola. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir la comparación entre pocillos.

4.7. Resultados: detección de escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB

El diseño de MNAzima 4 para la detección de RPLPO, exón 4, mostró un aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo cuando se amplificó la secuencia de RPLPO diana de ADN genómico humano por PCR (Figura 14). El aumento de fluorescencia visto para amplicones de RPLPO fue similar al visto para 10^{12} copias de los oligonucleótidos diana RO4/1 de control positivo. La fluorescencia de los controles sin diana fue menor que la de las reacciones que contienen diana y ninguna de las reacciones de control negativo mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el aumento de fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debe a ensamblaje dependiente de diana de una MNAzima catalíticamente activa que después escinde el sustrato indicador.

Ejemplo 5: Uso de MNAzimas para detección de amplicones producidos por amplificación por PCR *in vitro* de secuencias de ácido nucleico cortas.

5.1. Oligonucleótidos de Partezima

Pueden usarse MNAzimas para detectar amplicones de secuencia de ácido nucleico amplificada *in vitro*. En este ejemplo la amplificación y detección se realiza en un procedimiento de tres etapas (Figura 5) pero también podría realizarse amplificación y detección por PCR de transcripción inversa simultáneamente en un tubo de reacción sencillo. Para este ejemplo los oligonucleótidos usados para detectar los amplicones usaron los oligonucleótidos de partezima A y B de miR de diseño 4 (Figura 11), que se diseñaron para detectar hsa-miR-20. Los oligonucleótidos de partezima de MNAzima se enumeran a continuación de modo que las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID N°: 10 Partezima A2 miR20A2/1:

TACCTGCACTACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID N°: 11 Partezima B3 miR20B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCTAAGCACTTTA

5.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. La escisión de SubBi-1-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID N°: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATg

5.3. Cebadores de PCR para amplificación de secuencias diana oligonucleotídicas D-20 de 22 mer

La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación *in vitro* del oligonucleótido D-20 usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEC ID N°: 25 Cebador 5miR20/1:

ACGTGACGCTAAAGTGCT

SEC ID N°: 26 Cebador 3miR20/L1:

CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

SEC ID N°: 27 Cebador 3miR20/P1:

CGAATGACGTACCTGCAC

5.4. Secuencias diana y controles

La secuencia de ADN (Diana D-20) con homología para miR-20 se usó como un molde para demostrar la amplificación y detección de una secuencia corta usando PCR y MNAzimas.

SEC ID N°: 12 Diana D-20:

TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

Además, para asegurar que cualquier secuencia “fuera de diana” cercanamente relacionada amplificada erróneamente no pueda detectarse con el sistema de miR-20, el oligonucleótido de ADN diana de control Diana D-17-5p también se ensayó con el sistema de oligonucleótido de partezima miR-20.

5 SEC ID N°: 13 Diana D-17-5p:

CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

5.5 Componentes de Reacción: Amplificación de secuencia diana

Se realizó amplificación de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación para las etapas 1 y 2 (transcripción inversa y PCR) fueron de 42 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 30 °C durante 30 segundos (más 2 °C por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 50 °C durante 30 segundos. Las reacciones inicialmente solamente contenían 3miR20/L1 10 nM, después de 42 °C durante 30 minutos la reacción se detuvo y se añadieron 3miR20/P1 30 nM y 5miR20/1 200 nM. Todos los otros reactivos enumerados estaban en la mezcla inicial de reacción MgCl₂ 3 mM, 200 µM de cada dNTP, Immobuffer 1 x (Bioline) y 1 unidad de Immolase (Bioline) y a) 10⁸ copias de Diana D-20, b) sin diana (dH₂O) o c) 10⁸ copias de ADN fuera de diana (Diana D-17-5p).

5.6. Componentes de Reacción: Detección de secuencia diana

La detección de la secuencia diana se midió por un aumento en la señal de fluorescencia causada por escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron a 40 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 7 segundos durante un total de 10 minutos. Todas las reacciones de la Tabla 8 contenían la mezcla a granel de SubBi-1-FB 1 µM, Tris HCl (pH 9,0 a 25 °C) y MgCl₂ 25 mM. Las concentraciones de partezima A y B fueron de 1 µM.

Tabla 8: Componentes de reacción para la detección de secuencias de ácido nucleico cortas amplificadas in vitro (20-25 mer).

El sistema de MNAzima usó el Diseño 4 (miR20A2/1:miR20B3/1)

Reacción de MNAzima	Diana
Diana miR-20-oligonucleotido (miR20 de Control Positivo)	10 ¹² copias de Diana D-20 en 5 µl (no amplificado)
Diana miR-20- producto de PCR (Ensayo)	Producto de PCR D-20 (5 µl de 25 µl de reacción) (equivalente a 2 x10 ⁷ copias de Diana D-20 amplificada por PCR)
Diana miR-20- oligonucleótido (D-20 no amplificado de control)	10 ⁸ copias de Diana D-20 en 5 µl (no amplificado)
Sin Diana (miR-20 de control negativo)	5 µl de H ₂ O
Fuera de diana (Control Fuera de Diana para miR-20)	Producto de PCR D-17-5p (5 µl de 25 µl de reacción) (equivalente a 2 x10 ⁷ copias de Diana D-17-5p amplificada por PCR)

Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) usado durante el experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

5.7. Resultados: detección de escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB

El diseño 4 de MNAzima para la detección de miR-20, mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue Diana D-20 amplificada mediante PCR (Figura 15(i)).

La fluorescencia del control sin diana fue menor que la de las reacciones que contenían diana y ninguna de las reacciones de control negativo mostraron un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debe a ensablaje dependiente de diana de MNAzimas catalíticamente activas que después escindieron el sustrato indicador.

El control fuera de diana (D-17-5p) en este ejemplo también se amplificó con los cebadores de miR-20 puesto que solamente tiene un emparejamiento erróneo en la posición terminal dentro de las regiones que hibridan con los cebadores de miR-20. La amplificación de tanto Diana D-20 como Diana D-17-5p se confirmó por electroforesis. Puesto que ambos amplicones incorporan las secuencias de cebadores en sus extremos terminales, ahora sólo difieren en una base sencilla en el medio de los amplicones. La MNAzima diferenció exitosamente entre los amplicones de D-20 y D-17-5p. Esta diferenciación es un resultado de la diferencia de un nucleótido sencillo en los amplicones de D-20 y D-17-5p en la región que queda entre los cebadores como se ilustra en la Figura 15(ii). La MNAzima requiere que las cuatro bases entre los cebadores estén presentes (permitiendo de este modo la diferenciación entre dímero de cebadores y amplicones genuinos) y las cuatro bases deben ser exactas sin tolerarse sustituciones. Este ejemplo ilustra la capacidad de las MNAzimas para diferenciar entre secuencias cercanamente relacionadas incluyendo las que difieren solamente en un polimorfismo de un nucleótido sencillo.

Ejemplo 6: Uso de MNAzimas para detección de amplicones de microARN producidos por amplificación por PCR *in vitro* de ARN total

6.1. Oligonucleótidos de Partezima

Pueden usarse MNAzimas para detectar amplicones de secuencias de ácido nucleico amplificadas *in vitro*. En este ejemplo se realiza amplificación y detección en un procedimiento de 2 etapas (Figura 5) en el que se realiza la amplificación por PCR y transcripción inversa en un primer tubo, seguido de detección mediada por MNAzima en un segundo tubo. Para este ejemplo los oligonucleótidos usados para detectar los amplicones fueron oligonucleótidos de partezima A y B de miR de diseño 4 (Figura 11), que se diseñaron para detectar hsa-miR-20. Los oligonucleótidos de partezima de MNAzima se enumeran a continuación de modo que las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID N°: 10 Partezima A2 miR20A2/1:

TACCTGCACTACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID N°: 11 Partezima B3 miR20B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCTAAGCACTTTA

6.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. La escisión de SubBi-1-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID N°: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATG

6.3. Cebadores de PCR para amplificación de hsa-miR-20

La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación *in vitro* de ARN total de timo humano (Ambion) usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEC ID N°: 25 Cebador 5miR20/1:

ACGTGACGCTAAAGTGCT

SEC ID N°: 26 Cebador 3miR20/L1:

CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

6.4. Secuencias diana y controles

Se usó ARN total de timo humano (Ambion) como molde para amplificación de miR-20 y se detectaron posteriormente amplicones usando MNAzimas (sección 6.6).

La secuencia de ARN (Diana R-20) con homología para miR-20 se usó como un control positivo para demostrar la amplificación de secuencias cortas, seguido de detección de amplicones resultantes usando MNAzimas.

SEC ID N°: 28 Diana R-20:

uaaagugcuuauagugcaggua

6.5 Componentes de Reacción: Amplificación de secuencia diana

Se realizó amplificación por PCR y transcripción inversa de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron de 40 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 30 °C durante 30 segundos (con un aumento de 2 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 50 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 3miR20/L1 40 nM y 5miR20/1 200 nM, MgCl₂ 3 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), 30 unidades de Transcriptasa Inversa MMLV(-H) (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline) y 0,5 unidades de Immolase (Bioline) y a) 1 µg de ARN total, b) sin diana (dH₂O) o c) 10¹⁴ copias (5 µM) de Oligonucleótido Diana R-20.

6.6. Componentes de Reacción: Detección de secuencia diana

La detección de la secuencia diana se midió mediante un aumento de la señal fluorescente causado por escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron a 40 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 30 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones de la Tabla 9 contenían la mezcla a granel de SubBi-1-FB 1 µM, partezima A 1 µM, partezima B 1 µM, Tris HCl (pH 9,0 a 25 °C), MgCl₂ 25 mM y diana (como se indica en la Tabla 9).

Tabla 9: Componentes de reacción para detección de ARN total amplificado in vitro. El sistema de MNAzima usó el Diseño 4 (miR20A2/1:miR20B3/1)

Reacción de MNAzima	Diana
Diana miR-20 - oligonucleótido de ARN (miR20 de Control Positivo)	Producto de PCR R-20 (5 µl de 25 µl de reacción) (equivalente a 2 x10 ¹³ copias de oligonucleótido de Diana R-20 amplificado)
Diana miR-20 – ARN total (Ensayo)	Producto de PCR (5 µl de una reacción de 25 µl) (equivalente a 200 ng de ARN total amplificado)
ARN sin diana (miR20 de control negativo)	Producto de PCR (5 µl de una reacción de 25 µl) de la reacción de "control sin diana" que contiene dH ₂ O.
ARN total no amplificado (miR-20 de control negativo)	ARN total (1 µg) en un volumen total de 5 µl

El nivel de fluorescencia de fondo se midió para cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid). Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparación entre pocillos.

6.7. Resultados: detección de escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB

El diseño de MNAzima 4 para la detección de miR-20 mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ARN total amplificado mediante PCR (Figura 16).

La fluorescencia del control sin diana de ARN fue menor que la de las reacciones que contenían diana de ARN y ninguna de las reacciones de control negativo mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debe a ensamblaje dependiente de diana amplificado por PCR de MNAzimas catalíticamente activas que escindieron después el sustrato indicador. Aunque este experimento se realizó en dos etapas (transcripción inversa/PCR después detección de puntos finales de MNAzima), todas las etapas podrían realizarse simultáneamente en un tubo de reacción sencillo permitiendo que la reacción se controle en tiempo real.

Ejemplo 7: Detección de diana por MNAzimas acopladas a una cascada de señal de ácido nucleico.

7.1. Cascadas de amplificación de señal iniciadas por MNAzima

Es posible reducir el límite de detección de los ácidos nucleicos acoplando detección de MNAzima a una reacción en cascada de amplificación de señal, como se ilustra en la Figura 7. Las MNAzimas también permiten un mecanismo desencadenante altamente específico para el inicio de una cascada.

7.2. Cascada de ADNzima Espacialmente Separada

Las ADNzimas pueden ligarse a un soporte usando una diversidad de procedimientos incluyendo unión a obleas

plásticas revestidas con estreptavidina que permiten la unión de ADNzimas marcadas con biotina. Las secuencias usadas para unión también pueden servir como sustratos de MNAzimas/ADNzimas genéricos. Las dianas (por ejemplo secuencias de ácido nucleico) pueden detectarse después de hibridación con secuencias de partezima permitiendo la formación de MNAzimas activas. Las MNAzimas pueden escindir después sustratos genéricos ligados liberando de este modo ADNzima A. La ADNzima A puede emigrar después a una segunda secuencia genérica en una segunda superficie sólida en la que está ligada la ADNzima B. ADNzima A puede escindir la segunda secuencia genérica liberando de este modo ADNzima B. La escisión de este sustrato entre pares de colorante interruptor/fluoróforo puede dar como resultado fluorescencia aumentada. La ADNzima B liberada puede a su vez escindir más del primer sustrato liberando de este modo más de ADNzima A e iniciando una cascada de señal que da como resultado amplificación de la señal A (Figura 7).

Este ejemplo describe un mecanismo para generar una cascada de señal usando ADNzimas espacialmente separadas, sin embargo, existen otros métodos que también permitirían la amplificación de la señal usando ácidos nucleicos catalíticos. El experto en la materia apreciará que cualquier procedimiento tal debería ser completamente funcional junto con la presente, siempre que por algún medio de unión o separación física, un sustrato se mantenga "inaccesible" a una enzima que actuaría sobre él. Otros ejemplos de amplificación de señal de ácido nucleico que podrían acoplarse a reacciones iniciadas por MNAzima incluyen, pero sin limitación, cascadas de ligación (Paul y Joyce, 2004) y cascadas de ADNzima circular (Levy y Ellington, 2003), cada una de las cuales implica el principio básico de mantener una "separación" de una enzima de su sustrato, con lo cual cuando la enzima y el sustrato entran en contacto de modo que se produzca actividad catalítica, se produce directa o indirectamente una señal amplificada o cascada de señal.

Ejemplo 8: Uso de MNAzimas para la cuantificación de una diana de ácido nucleico.

8.1. Oligonucleótidos de Partezima

Pueden usarse MNAzimas para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como PCR. Además, el control en tiempo real permite que se cuantifique la cantidad de diana inicialmente presente en la reacción. En este ejemplo la amplificación y detección se realizan en un procedimiento de una etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima se producen simultáneamente en un tubo sencillo. Los oligonucleótidos de partezima A y B usaron el diseño 6 con ramas sensoras complementarias al exón 5 del gen de RPLPO humano (Figura 17(i)). Los oligonucleótidos de partezima se enumeran a continuación indicando la "P" fosforilación 3' del oligonucleótido.

SEC ID N° 29 Partezima A4 RO5A4/3-P:

CAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID N° 30 Partezima B5 RO5B5/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

8.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-3 con la secuencia, de 5' a 3' como sigue. En el ejemplo presente, SubBi-3-FB se marcó en los extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. La escisión de SubBi-3-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N° 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

8.3. Cebadores de PCR para amplificación de exón 5 de RPLPO

La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación *in vitro* de ADN genómico humano usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEC ID N° 32 Cebador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID NO: 33 Cebador 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

8.4. Secuencia diana

Se usó ADN genómico humano extraído de la línea celular K562 (Promega) como molde para amplificación del gen

de RPLPO.

8.5. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de la secuencia diana

Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador ABI7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos (con una reducción de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 50 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5RO5/1 40 nM y 3RO5/1 200 nM, RO5A4/3-P 200nM y RO5B5/3-P 200nM, SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), referencia ROX 1 x (Invitrogen), ImmoBuffer 1 x (Bioline), 0,25 unidades de Immolase (Bioline) y molde de ADN genómico (20.000 pg, 4000 pg, 800 pg, 160 pg, 32 pg y 6,4 pg) o sin diana (dH₂O).

8.6. Resultados: Amplificación de diana y escisión de sustrato indicador SubBi-3-FB

El diseño 6 de MNAzima para la detección y cuantificación en tiempo real de exón 5 de RPLPO, mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ADN genómico humano amplificado mediante PCR (Figura 17(ii)).

La fluorescencia del control sin diana de ADN fue menor que la de las reacciones que contienen diana de ADN y no aumentó durante la reacción. Esto demuestra que el aumento de fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debe a ensamblaje dependiente de diana de MNAzimas catalíticamente activas que después escinden el sustrato indicador. Se generó una curva patrón representando el logaritmo de las concentraciones de ADN frente al ciclo umbral dando como resultado una representación lineal con un coeficiente de correlación de 0,995. En la reacción que contiene 6,4 pg de ADN genómico, estarían presentes aproximadamente 10 copias de la diana. Este ejemplo demuestra la alta sensibilidad de este enfoque.

Aunque este experimento usó relaciones de cebadores asimétricos los experimentos posteriores que usan PCR en tiempo real (datos no mostrados) demostraron que la detección de MNAzima también era compatible con PCR usando relaciones de cebadores simétricos.

Ejemplo 9: Reacción múltiple que emplea múltiples MNAzimas que se dirigen a múltiples dianas simultáneamente.

9.1. Oligonucleótidos de Partezima

Pueden detectarse simultáneamente múltiples dianas en una reacción múltiple que comprende múltiples MNAzimas únicas. Cada MNAzima tiene ramas sensoras específicas para una diana y ramas de sustrato específicas para un miembro único de una serie de sustratos genéricos, cada uno de los cuales está marcado con un fluoróforo diferente (Figura 18). En el siguiente ejemplo, se diseñaron MNAzimas para detectar dos dianas diferentes, concretamente secuencias D-20 y RPLPO. Se apreciará que puede usarse cualquier número de dianas de acuerdo con el procedimiento. Las secuencias de la partezimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato.

SEC ID N° 29 Partezima A4 RO5A4/3-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID N° 30 Partezima B5 RO5B5/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEC ID N° 34 Partezima A4 miR20A4/2:

TACCTGCACTAACAACGAGAGGAAACCTT

SEC ID N° 35 Partezima B5 miR20B5/2:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTTAAGCACTTTA

9.2. Sustratos Indicadores

Los dos sustratos indicadores usados en el presente ejemplo fueron SubBi-2 y SubBi-3 con las secuencias, de 5' a 3', como sigue. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. SubBi-3 se marcó en los extremos con un resto de 6-JOE en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-JB.

La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm

(longitud de onda de excitación de FAM) y la escisión de SubBi-3-JB se controló a 548 nm (longitud de onda de emisión de JOE) con excitación a 520 nm (longitud de onda de excitación de JOE). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N° 21 SubBi-2-FB:

5 AAGGTTTCCTCgCCCTGGGCA

SEC ID N° 36 SubBi-3-JB:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

9.3. Secuencias Diana

10 Las secuencias diana para este ejemplo fueron los oligonucleótidos sintéticos Diana R05/1 y Diana D-20 con las secuencias, de 5' a 3', como sigue. La secuencia Diana R05/1 tiene la misma secuencia que una sección del gen de RPLPO, exón 5 y la secuencia de Diana D-20 es un homólogo de ADN del ARN hsa-miR-20.

SEC ID N° 22 Diana R05/1:

GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

SEC ID N° 12 Diana D-20:

15 TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

9.4. Condiciones de Reacción

20 La detección de las secuencias diana se midió controlando el aumento de la señal fluorescente causada por la escisión de los sustratos indicadores por las MNazimas catalíticamente activas. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron a 55 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 7 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones en la Tabla 10 contenían tampón PCRII (Applied Biosystems) y MgCl₂ 25 mM.

Tabla 10: Componentes de reacciones para la detección simultánea de dos dianas de ácido nucleico diferentes.

Tipo de Reacción	Partezimas A (1 µM)	Partezimas (1 µM)	Diana B
Sencilla D-20	miR20A4/2	miR20B5/2	Diana D-20 1 µM
			Sin Diana (H ₂ O)
Sencilla RPLPO	R05A4/3-P	R05B5/3-P	Diana R05/1 1 µM
			Sin Diana (H ₂ O)
Múltiple D-20 y RPLPO	miR20A4/2	miR20B5/2	Diana D-20 1 µM y Diana R05/1 1 µM
	y R05A4/3-P	y R05B5/3-P	Sin Diana (H ₂ O)

25

Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) usado durante el experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo, puesto que se sabe que éste varía entre los pocillos. Este se midió leyendo la fluorescencia de la mezcla a granel sola. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

30 9.5. Resultados: Detección y escisión del sustrato

35 Las reacciones sencillas que contenían D-20 o RPLPO diana mostraron un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo en comparación con el control sin diana (Figura 19 (i)). Esto demuestra que las partezimas se ensamblan en una MNazima catalíticamente activa y escinden el sustrato indicador solamente en presencia de la secuencia diana. Los controles "sin diana" (dH₂O) no mostraron aumento de la fluorescencia lo que indica que no se produjo escisión en ausencia de diana. La reacción múltiple para la detección simultánea de RPLPO y D-20 (Figura 19 (ii)) produjo resultados similares para cada diana a los observados en las reacciones sencillas para cada diana. No se observó aumento de la fluorescencia en la reacción de control "sin diana". Estos resultados demuestran detección simultánea de dianas múltiples en una reacción sencilla sin pérdida de especificidad.

Ejemplo 10: Uso de MNAzimas para la cuantificación de amplicones producidos por amplificación *in vitro* de microARN.**10.1. Oligonucleótidos de Partezima**

Pueden usarse MNAzimas para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como RTPCR. Además, el control en tiempo real permite cuantificar la cantidad de diana inicialmente presente en la reacción. En este ejemplo, la amplificación y detección se realizan en un procedimiento de dos etapas, implicando la primera etapa producción de ADNc mediante transcripción inversa y después se produce amplificación por PCR y detección mediada por MNAzima del ADNc simultáneamente a la segunda etapa. Los oligonucleótidos de partezima A y B usaron el diseño 6 con ramas sensoras complementarias a microARN humano hsa-let-7a. Los oligonucleótidos de partezimas se enumeran a continuación indicando el “-P” fosforilación 3’ del oligonucleótido. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID N° 37 Partezima A4 PCR7aA4/2-P:

GACCGTGAGGTAGTAACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N° 38 Partezima B5 PCR7aB5/2-P:

TGCCAGGGAGGCTAGCTGGTTGTATAGTTGTC-P

10.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5’ a 3’, como sigue. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5’ y un resto de BHQ1 en el extremo 3’ y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 516 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 492 nm (longitud de onda de excitación de FAM). En la siguiente secuencia las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N° 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

10.3. Secuencias diana

La curva patrón para este ejemplo se generó por una RTPCR de dos etapas de un oligonucleótido de ARN sintético R-1et7a, que tiene secuencias homólogas a la especie de ARN hsa-let-7a. La secuencia de R-let7a, escrita de 5’ a 3’, es como sigue.

SEC ID N° 39 R-let7a:

ugagguaguagguuguauaguu

Se amplificaron muestras de ARN total humano de células de colon (Ambion), células leucémicas K562, células de cáncer cervical HeLa (Ambion) y células de bazo (Clontech) y se analizaron con respecto a la abundancia de hsa-1et-7a.

10.4. Cebadores de PCR para amplificación de hsa-let 7a

Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación de hsa-let-7a. El cebador 31et7a se usó para transcripción inversa y los cebadores 51et7a y 3PCR7a se usaron para amplificación por PCR.

SEC ID N° 40 Cebador 31et7a:

AGCGAAGCTGAGACAACTATACAA

SEC ID N° 41 Cebador 51et7a:

CGACGTGACCGTGAGGTAG

SEC ID N° 42 Cebador 3PCR7a:

CATGGCACAAGCGAAGCTGA

10.5. Componentes de Reacción: Transcripción inversa de la secuencia diana

Se realizó transcripción inversa de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. Las reacciones se

incubaron en un termociclador 2720 (Applied Biosystems) durante 20 minutos a 20 °C, seguido de 20 minutos a 30 °C y después de 20 minutos a 40 °C. Las reacciones contenían 31et7a 10 nM, MgCl₂ 5 mM, 300 µM de cada dNTP, 20 unidades de Rnasin (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline), 100 unidades de M-MLV RT(H-) y 5 µl de R-let7a (6 x 10¹¹ copias) o ARN total humano de colon normal (0,1 µg), K562 (0,1 µg), HeLa (0,2 µg) o bazo (0,2 µg). Una reacción de control contenía todos los reactivos anteriores pero carecía de diana de ARN conteniendo en su lugar 5 µl de dH₂O solamente.

10.6. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de la secuencia diana

Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana en volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005P™ QPCR (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 40 °C durante 30 segundos (con un aumento de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 50 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 3PCR7a 200 nM y 51et7a 40 nM, PCR7aA4/2-P 400 nM y PCR7aB5/2-P 400 nM, SubBi-2-FB 200 nM, MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 20 unidades de Rnasin (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline), 1 unidad de Immolase (Bioline) y 5 µl de ADNc de R-let7a (que contiene 5 x 10⁸, 5 x 10⁷, 5 x 10⁶, 5 x 10⁵, 5 x 10⁴ copias) o molde de ARN total humano (colon normal, 0,5 µg; K562, 0,5 µg; HeLa, 1 µg; bazo, 1 µg) o sin diana (dH₂O).

10.7. Resultados: Amplificación de diana y escisión de sustrato indicador de SubBi-2-FB

La MNAzima para la detección y cuantificación en tiempo real de hsa-let-7a mostró un aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ADNc generada a partir de oligonucleótido de ARN sintético o ARN humano total. No se detectó señal para la reacción de control sin diana (Tabla 11). Esto demuestra que el aumento de fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debió a ensamblaje dependiente de diana de MNAzimas catalíticamente activas que después escindieron el sustrato indicador. Se generó una curva patrón representando el logaritmo de las concentraciones iniciales de ARN frente al ciclo umbral, dando como resultado una representación lineal con un coeficiente de correlación de 0,999. También se amplificaron cuatro muestras de ARN humano total y la cantidad de hsa-let-7a en cada una se estimó extrapolando a partir de la curva patrón (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados de reacciones para la ampliación y detección de amplicones de hsa-let-7a

Muestra	Umbral (Ct) Media de Duplicados	Número de Copias Patrón conocido (S) o Estimado (E)	Comentarios
Patrón 1	19,4	5 x 10 ⁸ (S)	Curva patrón (media de reacciones por duplicado) R ² = 0,999 Pendiente = -3,829 Eficacia = 83 %
Patrón 2	23,1	5 x 10 ⁷ (S)	
Patrón 3	26,9	5 x 10 ⁶ (S)	
Patrón 4	30,9	5 x 10 ⁵ (S)	
Patrón 5	34,7	5 x 10 ⁴ (S)	
Control sin ARN diana	Sin señal	0	Sin señal
ARN de colon	20	4 x 10 ⁸ (E)	hsa-let-7a detectado y cuantificado en todas las muestras de ensayo
ARN de K562	31	3,5 x 10 ⁵ (E)	
ARN de HeLa	22	1,3 x 10 ⁸ (E)	
ARN de bazo	22	7,6 x 10 ⁸ (E)	

Este ejemplo demuestra la capacidad de las MNAzimas para detectar y cuantificar amplicones generados por amplificación por RTPCR de especies de microARN humano. El microARN es difícil de amplificar y detectar debido a su pequeño tamaño de aproximadamente 22 bases. Las MNAzimas son adecuadas para esta aplicación.

Ejemplo 11: Uso de MNAzimas para detectar metilación de ADN

11.1. Oligonucleótidos de Partezima

Se muestra en el Ejemplo 19 que la generación de señal mediada por MNAzima y PCR en tiempo real permite la diferenciación entre secuencias de ácido nucleico completamente coincidentes y las que contienen emparejamientos

erróneos con C frente a C. Esta capacidad permite que se usen las MNazimas para análisis de estado de metilación de las células. Las alteraciones en el patrón de metilación se producen frecuentemente en relación con cáncer. La mayoría de los protocolos para el análisis de metilación comienzan con modificación de bisulfito de ADN genómico que convierte citidinas no metiladas, pero no las metiladas, a uridinas. La amplificación por PCR del ADN modificado reemplaza después las uridinas con timidinas y pueden usarse diversos procedimientos para distinguir las secuencias que contienen T (originalmente C no metilada) y C (originalmente C metilada). En el siguiente ejemplo, se usó un MNazima para determinar el estado de metilación de dobletes CpG específicos en la región promotora del gen de p16 en ADN modificado con bisulfito.

En este ejemplo, las partezimas se diseñaron para coincidir con la secuencia producida después de la modificación con bisulfito de un gen de p16 metilado. Las secuencias de las partezimas se enumeran a continuación (de 5' a 3'). En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNazima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana modificada por bisulfito y las bases en cursiva hibridan con el sustrato. La "-P" indica fosforilación 3' del oligonucleótido.

SEC ID N° 43 Partezima A5 p16A5/3-P:

GCCCCGCTCCAACTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID N° 44 Partezima B6 p16B6/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGC**AACGCCCGCACCTC**-P

11.2. Sustrato indicador

El sustrato indicador usado en este ejemplo fue SubBi-3. En el presente ejemplo, SubBi-3 se marcó en los extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5', un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-FB. La escisión de SubBi-3-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia de SubBi-3-FB se muestra a continuación (de 5' a 3'); las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N° 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAAACCGuCACCAACCG

11.3. Cebadores de PCR para amplificación de p16 modificado por bisulfito

En este ejemplo, los cebadores de PCR se diseñaron para coincidir con la diana modificada por bisulfito, que estaba originalmente metilada. La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación *in vitro* de ADN genómico humano modificado por bisulfito usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación (de 5' a 3').

SEC ID N° 45 cebador 5p16:

GTTGGTTACGGTCGCGGTTTC

SEC ID N° 46 cebador 3p16:

CCGACCGTAACTATTCGATACG

11.4. Secuencias diana y controles.

Se usó ADN genómico humano extraído de la línea celular K562 como ADN genómico de control negativo que contenía un promotor del gen p16 no metilado. Se usó ADN genómico metilado CpG Universal (Chemicon) como un control para un promotor del gen p16 metilado. El ADN genómico se modificó con bisulfito durante una noche usando el kit MethylEasy (Uman Genetic Signatures), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se diluyó en serie el ADN metilado y ADN no metilado para producir muestras que contienen diversas proporciones de ADN metilado en el promotor del gen p16, concretamente 100 %, 20 %, 4 %, 0,8 %, 0,16 % y 0,032 %. Se usó dH₂O sin nucleasa en lugar de ADN genómico como un control sin diana.

11.5. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de secuencia diana

Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Stratagene MX3005p QPCR. Los parámetros de ciclación fueron 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 56 °C durante 30 segundos y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 52 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5p16 200 nM y 3p16 40 nM, p16A5/3-P 200 nM y p16B6/3-P 200 nM, SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 7,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline), 1 unidad de Immolase (Bioline) y 150 ng de ADN genómico modificado por bisulfito (que contenía ADN metilado 100 %, 20 %, 4 %, 0,8 %, 0,16 % o 0,032 %) o dH₂O solamente

(reacción de control sin diana). Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

11.6. Resultados: Detección de metilación por una MNAzima

La MNAzima específica de metilación mostró un aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la muestra diana contenía de 100 % hasta 0,16 % de ADN metilado (Tabla 12). Por el contrario, cuando la muestra diana contenía 0,032 % y 0 % de ADN metilado, la reacción mostró un bajo nivel de fluorescencia, similar al visto en el control sin diana y la fluorescencia no aumentó a lo largo del tiempo. A medida que el porcentaje de diana metilada se reducía, la Ct de la reacción aumentaba y se representó una curva patrón con un valor R^2 de 0,996. Los resultados experimentales se resumen en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12. Uso de MNAzimas para detectar metilación de ADN en muestras de ADN genómico modificado por bisulfito.

% de Metilación	Ct (media de duplicados)	Comentarios
100	19,36	La curva patrón generada usando estos valores tenía una $R^2 = 0,996$, una eficacia de 133 % y una pendiente $-2,72$.
20	20,94	
4	23,33	
0,8	24,83	
0,16	27,02	
0,032	Sin Ct	No detectado
0 (100 % no metilado)	Sin Ct	Sin señal para control no metilado
Control sin diana	Sin Ct	Sin señal para control sin diana

Los cebadores específicos de p16 metilado y MNAzima fueron capaces de diferenciar entre una diana metilada y no metilada en las condiciones usadas en este ejemplo. Además, el sistema permitió la detección de diana metilada 0,16 % en un fondo de diana no metilada. Una eficacia de 100 % en una reacción de PCR implica una duplicación en cada ciclo. La eficacia observada en este experimento de 133 % indica que hay tanto amplificación de diana (por PCR) como detección de amplicón amplificada por la actividad catalítica de la MNAzima.

Ejemplo 12: MNAzimas que se ensamblan a partir de partezimas que tienen ramas sensoras que forman estructuras en horquilla.

La estructura de las partezimas, que son capaces de ensamblarse en MNAzimas activas, es flexible. Este ejemplo demuestra estructuras adicionales que son compatibles con actividad de MNAzima.

12.1. Oligonucleótidos de Partezima

También puede realizarse detección usando MNAzimas cuando la región de rama sensora de partezima A o partezima B o tanto partezima A como B, se sigue de una secuencia en horquilla arbitraria. En los siguientes experimentos, las partezimas A y B se diseñaron para dirigirse a la secuencia de un microARN humano. hsa-miR-143. Las secuencias de los oligonucleótidos de partezima A y partezima B se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana, las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato y las bases que están en texto normal forman la horquilla.

SEC ID N° 142 Partezima A2 miR143 A2/1:

TGAGCTACAGTCGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID N° 143 Partezima B3 miR143 B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGC**GCTTCATCTCA**

SEC ID N° 144 Partezima A2 miR143 A2H/1:

GGCACTAACGTGCCT**TGAGCTACAGT**CGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID N° 145 Partezima B3 miR143 B3H/1:

CATCTCTTCTCCGAGC**GCTTCATCTC**ACGACGATAACGTCG

12.2. Sustrato Indicador

La actividad de MNAzima se controló por escisión de un sustrato indicador de ácido nucleico marcado de forma dual. El sustrato indicador para este ejemplo fue SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', como se escribe a continuación. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. Los cambios de la fluorescencia debido a escisión de SubBi-1-FB en el desoxirribonucleótido entre FAM y BHQ1 se controlaron a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID N° 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATG

12.3. Diana

La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido de ADN, Diana D-143, que tiene secuencia homóloga al microARN humano, hsa-miR-143. La secuencia de Diana D-143 fue como sigue, escrita de 5' a 3'.

SEC ID N° 146 Diana D-143:

TGAGATGAAGCACTGTAGCTCA

12.4 Condiciones de Reacción

La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de señal fluorescente provocado por escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron a 40 °C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada siete segundos durante un total de 10 minutos. Todas las reacciones en la Tabla 13 contenían la mezcla a granel que consistía en SubBi-1-FB 1 µM, Tris HCl 10 mM (pH 9,0 a 25 °C) y MgCl₂ 25 mM.

Tabla 13: Componentes de reacciones para la detección de una diana de ácido nucleico

Tipo de Reacción	Partezima A miR143 (0,8 µM)	Partezima B miR143 (0,8 µM)	Reacción de MNAzima	Molde (Diana D-143)
Ninguna partezima tenía una horquilla	A2/1	B3/1	Diana	0,1 µM
			Sin Diana	Nil (H ₂ O solamente)
Una partezima contenía una horquilla	A2H/1	B3/1	Diana	0,1 µM
	A2/1	B3H/1	Diana	0,1 µM
Ambas partezimas contenían una horquilla	A2H/1	B3H/1	Diana	0,1 µM
			Sin Diana	Nil (H ₂ O solamente)

Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) usado durante el experimento se ensayó primero con respecto a su nivel de fluorescencia de fondo, puesto que se sabe que éste varía entre pocillos. Este se midió leyendo la fluorescencia de la mezcla a granel solamente. Este valor se restó después de todas las otras reacciones realizadas en cada pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

12.5. Resultados: Detección de escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB

Todas las diversas combinaciones de diseños de las partezimas A y B fueron capaces de ensamblarse en MNAzimas activas. Estas escindieron el sustrato indicador, como demuestra un aumento de la fluorescencia, solamente en presencia de la secuencia diana. En este ejemplo, las ramas sensoras de las partezimas se habían extendido con secuencias que formaron una horquilla. Las reacciones, que contenían una partezima con una horquilla (partezima A o partezima B) o en las que ambas partezimas (A y B) contenían horquillas, dieron señales fluorescentes similares a las vistas cuando se usaron partezimas que carecían de horquillas. No se observó aumento de la señal en ninguna de las reacciones de control que carecían de diana.

El diseño de las partezimas que contenían horquillas proporciona una estrategia adecuada para detección de secuencias cortas tales como microARN. El oligonucleótido de ADN detectado en este experimento era de solamente 22 bases. Esta secuencia se detectó usando partezimas, que contienen, o no, horquillas. El diseño en

horquilla proporciona una estructura más estable y proporciona flexibilidad adicional en el diseño de partezimas que se sabe que son compatibles con un ensamblaje de MNAzima y actividad catalítica.

Ejemplo 13: Uso de MNAzimas para la cuantificación simultánea de cuatro secuencias de ácido nucleico mediante RTPCR en tiempo real

5 13.1. Oligonucleótidos de partezima para un ensayo de RTPCR cuádruple

Pueden amplificarse simultáneamente múltiples dianas en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como RTPCR. Además, la amplificación de las dianas puede controlarse simultáneamente en tiempo real en una reacción múltiple que comprende múltiples MNAzimas únicas. Cada MNAzima tiene ramas sensoras específicas para una diana y ramas de sustrato específicas para un miembro único de una serie de sustratos genéricos, cada uno de los cuales está marcado con un fluoróforo diferente (Figura 18). En este ejemplo, las MNAzimas se diseñaron para detectar cuatro dianas diferentes, concretamente BCR humana, RPLPO, β -actina y transcritos de HPRT. Se apreciará que puede usarse cualquier variedad de dianas de acuerdo con el procedimiento. Las secuencias de las partezimas A y B para cada diana se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato.

SEC ID N° 51 Partezima A4 BaA4/2-P:

AGATCAAGATCATTGCTCCACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N° 52 Partezima B5 BaB5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTTCCTGAGCGCAAGTACTC-P

20 SEC ID N° 29 Partezima A4 RO5A4/3-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID N° 30 Partezima B5 RO5B5/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEC ID N° 55 Partezima A4 BCRA4/6-P:

25 **AGTTCAAATCTGTACTGCACCACAACGAGAGGCGTGAT-P**

SEC ID N° 56 Partezima B5 BCRB5/6-P:

CTGGGAGGAAGGCTAGCTCTGGAGGTGGATTCCCTTTGG-P

SEC ID N° 57 Partezima A4 HPRTA4/7-P:

ACTGAATAGAAATAGTGATAGATACAACGAGTGCCATGTTAA-P

30 SEC ID N° 58 Partezima B5 HPRTB5/7-P:

TATCACAGCCAAGGCTAGCTCCATTCTATGACTGTAGATT-P

13.2. Sustratos Indicadores

Para este ejemplo, se usaron cuatro sustratos indicadores diferentes, cada uno marcado con un fluoróforo diferente. Las secuencias de los sustratos se escriben de 5' a 3' a continuación. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-JOE en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-JB. La escisión de SubBi-2-JB se controló a 555 nm con excitación a 535 nm. SubBi-3 se marcó en sus extremos con un resto de Quasar 670 en el extremo 5' y un resto de BHQ2 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-Q6B2. La escisión de SubBi-3-Q6B2 se controló a 665 nm con excitación a 635 nm. SubBi-6 se marcó en sus extremos con resto de Texas Red en el extremo 5' y un resto de BHQ2 en el extremo 5' y se designó SubBi-6-TRB2. La escisión de SubBi-6-TRB2 se controló a 610 nm con excitación a 585 nm. El cuarto sustrato, SubBi-7, se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-7-FB. La escisión de SubBi-7-FB se controló a 516 nm con excitación a 492 nm. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N° 59 SubBi-2-JB:

45 **AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA**

SEC ID N° 60 SubBi-3-Q6B2:

CAGCACAACCguCACCAACCG

SEC ID N° 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCAG

SEC ID N° 62 SubBi-7-FB:

5 TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

13.3. Secuencias diana y cebadores de PCR para amplificación de los cuatro amplicones

Se usó ARN total humano extraído de células leucémicas K562 como molde para amplificación *in vitro* de los cuatro transcritos diana. Los amplicones se generaron por RTPCR usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

10 SEC ID N° 32 5' cebador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID N° 33 3' cebador 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

SEC ID N° 63 5' cebador 5Bactin:

15 CATTGCCGACAGGATGCAGA

SEC ID N° 64 3' cebador 3Bactin:

GAGCCGCCGATCCACACG

SEC ID N° 65 5' cebador 5BCR14:

CACTCAGCCACTGGATTTAA

20 SEC ID N° 66 3' cebador 3BCR15/6:

GCGCGTCTTTGCTTTATTC

SEC ID N° 67 5' cebador 5HPRT/5:

CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

SEC ID N° 68 3' cebador 3HPRT/8:

25 CCTGTTGACTGGTCATTACAA

13.4. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de secuencia diana

Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de las secuencias diana en volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005P™ QPCR (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 54 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 40 nM de cada cebador 5' y 200 nM de cada cebador 3', 200 nM de cada partezima A y 200 nM de cada partezima B, 200 nM de cada sustrato, MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), 20 unidades de M-MLV RT (H-), Immobuffer 1 x (Bioline), 1,5 unidades de Immolase (Bioline) y molde de ARN total (100 ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg, 160 pg o 32 pg) o sin diana (dH₂O).

Tabla 14: Componentes de reacciones para la detección simultánea de cuatro dianas de ácido nucleico diferentes

Tipo Reacción	de	Cebadores 5' (40 nM) 3' (200 nM)	Partezima A (200 nM)	Partezima B (200 nM)	Sustrato (200 nM)	Diana
β-actina	Múltiple	5Bactina 3Bactina	BaA4/2-P	BaB5/2-P	SubBi-2-JB	ARN total humano 100 ng,

RPLPO BCR	5RO5/1 3RO5/1	RO5A4/3-P	RO5B5/3-P	SubBi-3-Q6B2	20 ng, 4 ng, 800 pg, 160 pg, 32 pg o sin ARN (H ₂ O)
HPRT	5BCR14 3BCR15/6	BCRA4/6-P	BCRB5/6-P	SubBi-6-TRB2	
	5HPRT/5 3HPRT/8	HPRTA4/7-P	HPRTB5/7-P	SubBi-7-FB	

13.5. Resultados: Amplificación simultánea de cuatro secuencias diana diferentes y detección mediante escisión de cuatro sustratos indicadores diferentes

Las cuatro MNAzimas usadas para detección y cuantificación en tiempo real de transcritos de β -actina, RPLPO, BCR y HPRT mostraron un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ARN total humano amplificado mediante RTPCR (Tabla 15). La fluorescencia del control sin diana de ARN para las cuatro reacciones fue menor que la de las reacciones que contenían diana de ARN y no aumentó durante la reacción (Tabla 15). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debió a ensamblaje dependiente de diana de MNAzimas catalíticamente activas que después escindieron el sustrato indicador.

Se generaron curvas patrón para las cuatro dianas representando el logaritmo de las concentraciones de ARN frente al ciclo umbral dando como resultado una representación lineal. El umbral (Ct) de cada patrón se muestra en la Tabla 15. Los valores de Ct mostrados en la tabla son una media de los resultados para reacciones duplicadas. El coeficiente de correlación (R^2), pendiente y eficacia de reacción para cada diana también se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: Resultados de reacciones para la amplificación y detección simultánea de cuatro dianas de ácido nucleico diferentes

Molde total)	(ARN	Umbral (Ct)			
		β -actina (JOE)	RPLPO (Quasar 670)	BCR (Texas Red)	HPRT (FAM)
100 ng		11,2	12,8	17,6	16,2
20 ng		13,8	15,2	19,9	18,5
4 ng		16,7	17,5	22,4	20,9
800 pg		19,1	20,1	25,0	23,5
160 pg		21,5	22,7	27,1	26,0
32 pg		23,8	25,2	29,1	27,7
Control sin ARN		Sin Ct	Sin Ct	Sin Ct	Sin Ct
Curva Patrón		$R^2 = 0,998$ Pendiente = - 3,599 Eficacia = 90 %	$R^2 = 1.000$ Pendiente = -3,561 Eficacia = 91 %	$R^2 = 0,998$ Pendiente = -3,320 Eficacia = 100 %	$R^2 = 0,997$ Pendiente = -3,370 Eficacia = 98 %

La reacción de RTPCR de MNAzima en este ejemplo permitió la detección y generación simultánea de curvas patrón para la cuantificación de cuatro dianas en una reacción múltiple sencilla que incluyó cuatro sustratos genéricos. Estos sustratos genéricos son adecuados para controlar otras combinaciones de cuatro dianas en una reacción sencilla.

Ejemplo 14: Uso de MNAzimas para la cuantificación simultánea de cinco secuencias de ácido nucleico en una RTPCR múltiple en tiempo real.

14.1. Oligonucleótidos de partezima para ensayo de RTPCR quintuple

Pueden amplificarse simultáneamente múltiples dianas en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como RTPCR. Además, la amplificación de las dianas puede controlarse simultáneamente en tiempo real en una reacción múltiple que comprende múltiples MNAzimas únicas. Cada MNAzima tiene ramas sensoras específicas para una diana y ramas de sustrato específicas para un miembro único de una serie de

sustratos genéricos, cada uno de los cuales está marcado con un fluoróforo diferente (Figura 18). En este ejemplo, se diseñaron MNAzimas para detectar cinco dianas diferentes, concretamente secuencias de ARNm de BCR, RPLPO exón 4, β -actina, RPLPO exón 5 y HPRT. Se apreciará que puede usarse cualquier variedad de dianas de acuerdo con el procedimiento. Las secuencias de las partezimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato.

SEC ID N° 69 Partezima A4 BaA4/7-P:

AGATCAAGATCATTGCTCCACAACGAGTGCCATGTTAA-P

SEC ID NO: 70 Partezima B5 BaB5/7-P:

TATCACAGCCAAGGCTAGCTTCCTGAGCGCAAGTACTC-P

SEC ID N° 71 Partezima A4 RO5A4/4-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGTGCGCCATG-P

SEC ID N° 72 Partezima B5 RO5B5/4-P:

TACTTCTCCCAAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEC ID N° 55 Partezima A4 BCRA4/6-P:

AGTTCAAATCTGTACTGCACCACAACGAGAGGCGTGAT-P

SEC ID N° 56 Partezima B5 BCRB5/6-P:

CTGGGAGGAAGGCTAGCTCTGGAGGTGGATTTCCTTTGG-P

SEC ID N° 75 Partezima A4 HPRTA4/2-P:

ACTGAATAGAAATAGTGATAGATACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N° 76 Partezima B5 HPRTB5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCATTCCTATGACTGTAGATT-P

SEC ID N° 77 Partezima A4 RO4A4/3-P:

GCTGGTCATCCAGCAGACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID N° 78 Partezima B5 RO4B5/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGTTGACAATGGC-P

14.2. Sustratos Indicadores

Para este ejemplo, se usaron cinco sustratos indicadores diferentes, cada uno de los cuales se marcó con uno de cinco fluoróforos diferentes. Las secuencias de sustrato se escriben de 5' a 3'. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de Alexa 350 en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-A350B. La escisión de SubBi-2-A350B se controló a 440 nm con excitación a 350 nm. SubBi-3 se marcó en sus extremos con un resto de Quasar 670 en el extremo 5' y un resto de BHQ2 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-Q6B2. La escisión de SubBi-3-Q6B2 se controló a 665 nm con excitación a 635 nm. SubBi-6 se marcó en sus extremos con un resto de Texas Red en el extremo 5' y un resto de BHQ2 en el extremo 5' y se designó SubBi-6-TRB2. La escisión de SubBi-6-TRB2 se controló a 610 nm con excitación a 585 nm. SubBi-7 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-7-FB. La escisión de SubBi-7-FB se controló a 516 nm con excitación a 492 nm. SubBi-4 se marcó en sus extremos con un resto de 6-JOE en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-4-JB. La escisión de SubBi-4-JB se controló a 555 nm con excitación a 535 nm. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N° 79 SubBi-2-A350B:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

SEC ID N° 60 SubBi-3-Q6B2:

CAGCACAACCGuACCAACCG

SEC ID N° 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

SEC ID N° 62 SubBi-7-FB:

TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

5 SEC ID N° 83 SubBi-4-JB:

CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA

14.3. Secuencias diana y cebadores de PCR para amplificación de las cinco secuencias diana de ARNm.

Se usó ARN total humano extraído de células K562 como molde para amplificación *in vitro* de las cinco dianas. Los amplicones se generaron por amplificación *in vitro* usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEC ID N1 32 5' cebador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID N° 33 3' cebador 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

15 SEC ID N° 63 5' cebador 5Bactina:

CATTGCCGACAGGATGCAGA

SEC ID N° 64 3' cebador 3Bactina:

GAGCCGCCGATCCACACG

SEC ID N° 65 5' cebador 5BCR14:

20 CACTCAGCCACTGGATTAA

SEC ID N° 66 3' cebador 3BCR15/6:

GCGCGTCTTTGCTTTATTC

SEC ID N° 67 5' cebador 5HPRT/5:

CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

25 SEC ID N° 68 3' cebador 3HPRT/8:

CCTGTTGACTGGTCATTACAA

SEC ID N° 84 5' cebador 5R04/3:

CAAGACTGGAGACAAAGTG

SEC ID N° 85 3' cebador 3R04/2:

30 GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

14.4. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de secuencia diana

Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de las secuencias diana en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005P™ QPCR (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 54 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5Bactina, SBCR14, 5HPRT/5 40 nM y 5R04/3, 5RO5/1 80 nM y 3Bactina, 3RO4 3BCR15/6, 3HPRT/8 200 nM y 3R04/2 y 3RO5/1 400 nM. Había 200 nM de cada partezima A y partezima B para βactina, BCR, RPLPO exón 4 y HPRT y 400 nM de cada partezima A y partezima B para RPLPO exón 5. Había SubBi-2-A350B, SubBi-3-Q6B2, SubBi-6-TRB2 y SubBi-7-FB 200 nM y SubBi-4-JB 400 nM. También había MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), 20 unidades de M-MLV RT (H-) (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline), 2 unidades de Immolase (Bioline) y 5 µl de cada molde de ARN total (100 ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg o 160 pg) o sin diana (dH₂O).

Tabla 16: Componentes de reacciones para la detección simultánea de cinco dianas de ácido nucleico diferentes.

Tipo de Reacción	Cebadores	Partezima A y B	Sustrato	Cantidad de partezima/ sustrato	Cantidad de cebador 3'/5'
β-actina, RPLPO exón 5	5Bactina 3Bactina	BaA4/7-P BaB5/7-P	SubBi-7-FB	200 nM / 200 nM	200 nM / 40 nM
	5RO5/1 3RO5/1	RO5A4/4-P RO5B5/4-P	SubBi-4-JB	400 nM / 400 nM	400 nM / 80 nM
BCR	5BCR14 3BCR15/6	BCRA4/6-P BCRB5/6-P	SubBi-6-TRB2	200 nM / 200 nM	200 nM / 40 nM
HPRT	5HPRT/5 3HPRT/8	HPRTA4/2-P HPRTB5/2-P	SubBi-2-A350B	200nM / 200 nM	200nM / 40 nM
RPLPO exón 4	5RO4/3 3RO4/2	RO4A4/3-P RO4B5/3-P	SubBi-3-Q6B2	200 nM / 200 nM	400 nM / 80 nM

14.5. Resultados: Amplificación simultánea de cinco secuencias diana diferentes y detección mediante escisión de cinco sustratos indicadores diferentes

Las cinco MNAzimas usadas para detección y cuantificación en tiempo real de secuencias de ARN dentro de RPLPO exón 4, BCR, β-actina, RPLPO exón 5 y HPRT mostraron un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ARN total humano amplificado por RTPCR (Tabla 17). La fluorescencia del control sin diana de ARN para las cinco reacciones fue menor que la de las reacciones que contenían diana de ARN y no aumentó durante la reacción (Tabla 17). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contenían diana se debió a ensamblaje dependiente de diana de MNAzimas catalíticamente activas que después escindieron el sustrato indicador.

Se generaron curvas patrón para las cinco dianas representando el logaritmo de las concentraciones de ARN frente al ciclo umbral, dando como resultado una representación lineal. El umbral (Ct) de cada patrón se muestra en la Tabla 17. Los valores de Ct son la media de las reacciones por duplicado. El coeficiente de correlación (R^2), pendiente y eficacia de reacción para cada diana se muestra también en la Tabla 17.

Tabla 17: Resultados de reacciones para la amplificación y detección simultánea de cinco dianas de ácido nucleico diferentes

	Umbral (Ct)				
	β-actina (FAM)	RPLPO exón 5 (JOE)	BCR (Texas Red)	HPRT (Alexa 350)	RPLPO exón 4 (Quasar 670)
100 ng RNA	13,8	13,7	17,2	21,4	17,2
20 ng RNA	16,3	17,0	19,5	23,5	19,8
4 ng RNA	19,0	20,8	22,0	25,8	23,2
800 pg RNA	21,9	24,0	24,3	28,6	26,0
160 pg RNA	24,1	26,8	26,8	30,8	28,8
Sin control de ARN	Sin señal	Sin señal	Sin señal	Sin señal	Sin señal
Curva Patrón	$R^2 = 0,998$ Pendiente = -3,729 Eficacia = 85 %	$R^2 = 0,997$ Pendiente = -4,750 Eficacia = 62 %	$R^2 = 1,000$ Pendiente = -3,425 Eficacia = 96 %	$R^2 = 0,997$ Pendiente = -3,440 Eficacia = 95 %	$R^2 = 0,999$ Pendiente = -4,192 Eficacia = 73 %

La reacción de RTPCR de MNAzima en este ejemplo permitió la detección y generación simultánea de curvas patrón

para la cuantificación de cinco dianas en una reacción múltiple sencilla que incluyó cinco sustratos genéricos. Estos sustratos genéricos son adecuados para controlar otras combinaciones de cinco dianas en una reacción sencilla.

Ejemplo 15: Uso de MNAzimas para la cuantificación de 16S ribosómica en bacterias

Para reemplazar el ensayo bacteriano de una tinción de Gram, pueden usarse MNAzimas para un ensayo de liberación rápida con respecto a esterilidad y/o contaminación de micoplasmas basándose en secuencias de ácido nucleico conservadas halladas en especies bacterianas. Pueden usarse MNAzimas para controlar la amplificación de ácidos nucleicos bacterianos diana en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como RTPCR. En este ejemplo, se usa una región conservada hallada en la secuencia 16S ribosómica bacteriana, en la que se realiza transcripción inversa, amplificación por PCR y detección mediada por MNAzimas simultáneamente en un tubo.

Se diseñó un sistema para dirigirse a una región de la secuencia 16S ribosómica que es común a varias especies bacterianas incluyendo *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter woffii*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*.

15.1 Oligonucleótidos de Partezima

Los oligonucleótidos de partezima A y B usaron el diseño 7 con ramas sensoras complementarias a una región conservada entre especies bacterianas. Los oligonucleótidos de partezimas se enumeran a continuación indicando la “-P” fosforilación 3’ del oligonucleótido. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID N°: 86 Partezima A5 16S1A5/2-P:

GGTTGTCGTCAGCTCGTGTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 87 Partezima B6 16S1B6/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTCGTGAGATGTTGGGTTAAG-P

15.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5’ a 3’ como sigue. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5’ y un resto de BHQ1 en el extremo 3’ y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 516 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 492 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N°: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCgCCCTGGGCA

15.3. Cebador de PCR para amplificación de 16S ribosómica en bacterias

La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación *in vitro* de *Bacillus subtilis* usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEC ID N°: 88 5’ Cebador 516S1-1:

TGGTGCATGGTTGTCGTC

SEC ID N°: 89 3’ Cebador 316S1-1:

TTGCGCTCGTTGCGGGA

15.4. Secuencia diana y control

Se extrajo ARN ribosómico bacteriano de células de *Bacillus subtilis* y se usó como molde para amplificación de la región 16S. Se usó dH₂O sin nucleasa en lugar de ARN como un control sin diana.

15.5. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de la secuencia diana

Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005p QPCR (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de un 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 40 ciclos de 95 °C durante 5

segundos y 55 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 516S1-1 40 nM y 316S1-1 200 nM, 16S1A5/2-P 200 nM y 16S1B6/2-P 200 nM, SubBi-2-FB 200 nM, MgCl₂ 7,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline), 1 unidad de Immolase (Bioline) y molde de ARN (500 ng, 50 ng, 5 ng o 500 pg) o sin diana (dH₂O).

5 15.6. Resultados: Amplificación de diana y escisión de sustrato indicador SubBi-2-FB

La MNAzima para detección y cuantificación en tiempo real de 16S ribosómica bacteriana, mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ARN bacteriano amplificado por RTPCR. La fluorescencia del control sin diana fue inferior a la de las reacciones que contenían ARN y no aumentó durante la reacción. Esto demuestra que el aumento de fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debe a ensamblaje dependiente de diana de MNAzimas catalíticamente activas que después escinden el sustrato indicador. Se generó una curva patrón representando el logaritmo de las concentraciones de ARN frente al ciclo umbral resultante en una representación lineal con un coeficiente de correlación de 0,992.

Tabla 18: Resultados de reacciones para la amplificación y detección de amplicones 16S ribosómicos bacterianos

Muestra (pg)	Ciclo umbral (Ct) Media de duplicados	Resultados
500.000	12,5	Curva Patrón (media de reacciones por duplicado) R ² =0,992 Pendiente=-4,461 Eficacia = 68%
50.000	16,4	
5000	20,5	
500	26,0	
Control sin diana de ARN	Sin señal	Sin señal

Este ejemplo demuestra la capacidad de las MNAzimas para detectar y cuantificar amplicones generados por amplificación por RTPCR de ARN 16S ribosómico bacteriano. Las MNAzimas usadas en este ejemplo se dirigen a una región 16S bacteriana que está 100 % conservada entre *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter woffii*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*. Como tal una MNAzima sencilla y sustrato indicador podrían usarse para explorar una muestra con respecto a la presencia de cualquiera de las bacterias anteriores. La detección de una señal (por ejemplo de FAM) sería indicativa de la presencia de una o más de estas especies bacterianas en la muestra.

25 Ejemplo 16: Uso de MNAzimas para la detección y cuantificación de ARN viral mediante RT-PCR en tubo sencillo

Las MNAzimas pueden usarse para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como RTPCR. Además, el control en tiempo real permite que se cuantifique la cantidad de diana inicialmente presente en la reacción. Este ejemplo ilustra el uso de MNAzima para la detección y cuantificación de ARN viral de VIH. Se realizaron transcripción inversa, amplificación por PCR y detección de MNAzimas en una reacción en un tubo.

16.1 oligonucleótidos de Partezima

Las partezimas se diseñaron para dirigirse específicamente al gen Nef de VIH-1. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato. La "-P" indica fosforilación 3' del oligonucleótido.

SEC ID N°: 90 Partezima A4 NefA4/6-P:

GAAGAGGCCAATAAAGGAGAGACAACGAGAGGCGTGAT-P

SEC ID N°: 91 Partezima B5 NefB5/6-P:

CTGGGAGGAAGGCTAGCTAACACCAGCTTGTTACACC-P

16.2. Sustrato Indicador

El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-6 con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. En el presente ejemplo, SubBi-6 se marcó en los extremos con un resto de Texas Red en el extremo 5' y un resto de BHQ2 en el extremo 3' y se designó SubBi-6-TRB2. La escisión de SubBi-6-TRB2 se controló a 610 nm (longitud de onda de emisión de

Texas Red) con excitación a 585 nm (longitud de onda de excitación de Texas Red). En la siguiente secuencia las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N°: 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCAG

5 16.3. Secuencias diana

La curva patrón en este experimento se generó por amplificación por RTPCR de ARN viral de VIH-1. Se usó un Kit de virus VIH-1 Ultrasens de QIAGEN para aislar ARN viral de medio recogido de células CEMT4 humanas infectadas con VIH-1. Se usó agua sin nucleasa (NF) en lugar de ARN viral como un control sin diana.

16.4. Cebadores de PCR para amplificación de los transcritos de Nef de VIH-1

- 10 Los siguientes cebadores se usaron para amplificación de transcritos de *Nef* de VIH-1. El cebador 3', Nef/3PCR, se usó para transcripción inversa y después este cebador y el cebador 5' Nef/5PCR facilitaron la amplificación por PCR.

SEC ID N°: 92 Cebador Nef/3PCR:

CAGGGTCATCCATTCCATGCAG

SEC ID N°: 93 Cebador Nef/5PCR:

- 15 GCTAGTACCAGTTGAGCCAG

16.5. Componentes de Reacción: Amplificación y cuantificación de secuencia diana

- Se realizó amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 μ l. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005p QPCR (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de un 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían cebador 3' Nef/3PCR 200 nM y cebador 5' Nef/5PCR 40 nM, partezima NefA4/6-P 200 nM y partezima NefB5/6-P 200 nM, SubBi-6-TRB2 200 nM, MgCl₂ 10mM, 200 μ M de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), Immobuffer 1 x (Bioline), 0,5 unidades de Immolase (Bioline), 10 unidades de MMLV RT (H-) y 5 μ l de molde de ARN total (que contiene 45.000 pg, 4.500 pg, 450 pg, 45 pg, 4,5 pg, o 0,45 pg) o sin diana (solo agua).

16.6. Resultados: Amplificación de diana y escisión de sustrato indicador SubBi-6-TRB2

- La MNazima para detección y cuantificación en tiempo real de transcritos de *Nef* de VIH-1 mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ARN viral de VIH-1 amplificado mediante RTPCR. No hubo aumento de la señal para la reacción de control sin diana (solo agua). Esto demuestra que el aumento de fluorescencia producido en reacciones que contenían diana se debió a ensamblaje dependiente de diana de MNazimas catalíticamente activas que después escindieron en sustrato indicador.

Se generó una curva patrón representando el logaritmo de la cantidad de molde de ARN en cada reacción frente al ciclo umbral (Ct) dando como resultado una representación lineal. La Ct de cada patrón, junto con el coeficiente de correlación (R^2), pendiente y eficacia de reacción se muestran en la Tabla 19.

35 **Tabla 19. Resultados de la amplificación y detección de transcritos de Nef de VIH**

Muestra	Ciclo Umbral (Ct) (media de reacciones por duplicado)	ARN viral de VIH (pg)	Resultados
Patrón 1	5,22	45.000	Curva de calibración $R^2=0,996$ Pendiente =-4,271 Eficacia =71,4 %
Patrón 2	9,96	4.500	
Patrón 3	13,78	450	
Patrón 4	17,22	45	
Patrón 5	22,09	4,5	
Patrón 6	27,15	0,45	
sin control diana	Sin señal	0	Sin señal

Este ejemplo demuestra la capacidad de las MNAzimas para usarse para la detección y cuantificación de secuencias virales, incluyendo VIH-1.

Ejemplo 17: Requisitos de secuencia de la actividad catalítica de MNAzimas.

17.1. Oligonucleótidos de Partezima

- 5 El núcleo catalítico de la ADNzima 10:23 como se descubrió originalmente comprende 15 nucleótidos (Santoro y Joyce, 1997). Estudios posteriores de las bases críticas dentro del núcleo catalítico han mostrado que ciertas sustituciones de bases específicas reducen significativamente la actividad catalítica, mientras que otras se toleran bien (Zaborowska y col).

- 10 En este ejemplo, se diseñó una serie de partezimas y se ensayaron para investigar la tolerancia del núcleo catalítico de MNAzima a variación de secuencia dentro de los núcleos parciales de las dos partezimas. Las partezimas no modificadas A y B para la MNAzima que detecta el gen de RPLPO humano se usaron como el control y se compararon con diversas secuencias de partezimas mutadas en las que se había realizado una sustitución de base sencilla en la región de núcleo catalítico parcial. Los oligonucleótidos de partezima usados para detectar la diana se basaron en el diseño 7 (véase el Ejemplo 20) y se enumeran a continuación, de 5' a 3'. En las siguientes secuencias
- 15 las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases que están subrayadas, en *cursiva* y en **negrita** están mutadas en comparación con las secuencias de núcleo parcial de control (no mutadas), las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID N°: 94 partezima A5 RO4A5/2:

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACGAGAGGAAACCTT

- 20 SEC ID N°: 95 partezima A5 RO4A5/2-G14A:

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACAAGAGGAAACCTT

SEC ID N°: 96 partezima A5 RO4A5/2-A9T:

GGGCTGGTCATCCAGCAGTTCAACGAGAGGAAACCTT

SEC ID N°: 97 partezima A5 RO4A5/2-A12T:

- 25 **GGGCTGGTCATCCAGCAGTACATCGAGAGGAAACCTT**

SEC ID N°: 98 partezima A5 RO4A5/2-A11T

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACTACGAGAGGAAACCTT

SEC ID N°: ID N°: 99 partezima B6 RO4B6/2:

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGTTCGACAATGGCAGCA

- 30 SEC ID N°: 100 partezima B6 RO4B6/2-C7A:

TGCCCAGGGAGGCTAGAGTGTTCGACAATGGCAGCA

SEC ID N°: 101 partezima B6 RO4B6/2-T4C:

TGCCCAGGGAGGCCAGCGTGTTCGACAATGGCAGCA

17.2 Sustrato Indicador

- 35 El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). En la siguiente secuencia las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

- 40 SEC ID N°: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

17.3. Secuencia diana

Se usó un oligonucleótido de ADN sintético como el molde diana en este experimento. La secuencia diana se muestra a continuación, de 5' a 3'.

SEC ID Nº: 102 Diana RO4/2:

ATGCTGCCATTGTCTGAACACCTGCTGGATGACCAGCCCAA

17.4. Condiciones de Reacción

- 5 Se realizó análisis de la actividad catalítica de diversos pares de partezimas usando un Termociclador SmartCycler System (Cepheid). Se iniciaron las reacciones mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl. Cada reacción contenía tampón de PCR II 1 x (Applied Biosystems), MgCl₂ 10 mM, SubBi-2FB 0,2 µM, DianaRO4/2 2 µM y un par de partezimas A y B cada una a 2 µM. Los pares de partezimas en cada reacción fueron como en la Tabla 20 a continuación.

Tabla 20: Componentes de reacciones para la detección de una diana de ácido nucleico

Reacción	Partezima A	Partezima B	Numero de repeticiones
Partezimas A y B de control (no mutadas)	RO4A5/2	RO4B6/2	6
Partezima mutada A (G14A) y partezima de control B	RO4A5/2-G14A	RO4B6/2	3
Partezima mutada A (A12T) y partezima de control B	RO4A5/2-A12T	RO4B6/2	3
Partezima mutada A (A11T) y partezima de control B	RO4A5/2-A11T	RO4B6/2	3
Partezima mutada A (A9T) y partezima de control B	RO4A5/2-A9T	RO4B6/2	3
Partezima de control A y partezima mutada B (C7A)	RO4A5/2	RO4B6/2-C7A	3
Partezima de control A y partezima mutada B (T4C)	RO4A5/2	RO4B6/2-T4C	3

- 10 Las reacciones se incubaron a 54 °C durante 20 minutos y se recogieron los datos fluorescentes a intervalos de 12 segundos. Puesto que la fluorescencia de partida puede variar para pocillos individuales en el termociclador SmartCycler System, el valor de fluorescencia inicial se restó de la fluorescencia en cada punto temporal para cada reacción para permitir la comparación entre reacciones en diferentes pocillos. Las medias de las reacciones por duplicado, que contenían una partezima mutada A o una partezima mutada B, se expresaron después como un porcentaje de la fluorescencia para repeticiones de control.
- 15

17.5. Resultados: Detección de escisión de sustrato indicador SubBi-2-FB.

La escisión del sustrato por los diversos pares de partezimas se midió por el cambio de fluorescencia a lo largo del tiempo. Los valores de fluorescencia normalizados para cada reacción se expresaron después como porcentaje de la fluorescencia observada en reacciones de control en el punto temporal equivalente (Tabla 21).

20 **Tabla 21: Actividad de escisión de diversas variantes de secuencia de partezimas (* este ejemplo) y comparación con la actividad de ADNzimas 10:23 variantes (**Zaborowska).**

Número de posición dentro del núcleo catalítico de 5' a 3'	Secuencias de núcleo parcial de partezima (control)		Núcleo de la secuencia 10:23 (Santoro y Joyce 1997)	Bases sustituidas (y nombre) dentro de (*) partezima A o B o dentro de la ADNzima (**) 10:23	Actividad de escisión (porcentaje de control) para enzimas de ADN con sustituciones	
	Partezima B	Partezima A			*MNAzimas (54 °C durante 10 minutos)	**ADNzima 10:23 (37°C durante 20 minutos)
1	G		G			
2	G		G			
3	C		C			
4	T		T	C (T4C)	17 %	< 10 %
5	A		A			
6	G		G			

(Cont)						
Número de posición dentro del núcleo catalítico de 5' a 3'	Secuencias de núcleo parcial de partezima (control)		Núcleo de la secuencia 10:23 (Santoro y Joyce 1997)	Bases sustituidas (y nombre) dentro de (*) partezima A o B o dentro de la ADNzima (**) 10:23	Actividad de escisión (porcentaje de control) para enzimas de ADN con sustituciones	
	Partezima B	Partezima A			*MNAzimas (54 °C durante 10 minutos)	**ADNzima 10:23 (37°C durante 20 minutos)
7	C		C	A (C7A)	40 %	< 80 %
8		T	T			
9		A	A	T (A9T)	70 %	90 %
10		C	C			
11		A	A	T (A11T)	86 %	80 %
12		A	A	T (A12T)	80 %	80 %
13		C	C			
14		G	G	A (G14A)	3 %	<10 %
15		A	A			

El experimento muestra que diversas sustituciones dentro del núcleo catalítico parcial de partezima A o B eran compatibles con la formación de MNAzima activa. Por el contrario otras sustituciones no se toleraban bien y producían estructuras con poca o sin actividad catalítica. Cuando los resultados obtenidos usando MNAzimas se compararon con los indicados para la sustitución equivalente dentro del núcleo catalítico de ADNzima 10:23 (Zaborowska y col), se observó un patrón similar (Tabla 21 anterior). Por ejemplo, la sustitución de G con A en la posición 14 (G14A) dentro de la partezima A, o dentro del núcleo 10:23, dio como resultado > 90 % de pérdida de actividad de escisión. Por el contrario, la sustitución de A por T en la posición 12 (A12T) dentro de la partezima A o dentro del núcleo 10:23, dio como resultado moléculas que conservaban aproximadamente 80 % de la actividad de escisión en comparación con las secuencias de control.

Como tal, la información en la bibliografía acerca de otras sustituciones de secuencia que son compatibles con la actividad de ADNzima (por ejemplo ADNzima 10:23 o ADNzima 8:17), podría predecir la actividad catalítica esperada cuando se introduce la misma variación de secuencia en una de las partezimas. Además, un experto en la materia podría usar ensayos empíricos para identificar variantes de secuencia de núcleo catalítico parcial de partezima adicional, que son compatibles con la formación de MNAzima activa.

Ejemplo 18: Aplicación de MNAzimas para detectar dianas incluyendo moléculas pequeñas tales como adenosin 5'-trifosfato

Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN monocatenarias evolucionadas *in vitro* a partir de grandes grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria por su capacidad para unirse a dianas con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros se han seleccionado por su capacidad para unirse específicamente a muchos tipos de dianas incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, células completas y virus. En este ejemplo, una secuencia de aptámero se incorporó en el extremo de una partezima (apta-partezima) en una configuración por la que se formaba solamente una MNAzima activa en presencia de la diana. Existen varias formas de conseguir este objetivo, incluyendo las estrategias descritas en la Figura 4 y la estrategia usada en el siguiente ejemplo que se ilustra en la Figura 20.

Los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para la estrategia de detección de MNAzima ilustrada en la Figura

20 incluyen; una partezima convencional;

a) una apta-partezima que es una partezima con un aptámero incorporado en uno de sus extremos;

b) un facilitador de ensamblaje que es un oligonucleótido que se une a tanto la apta-partezima como la partezima permitiendo el ensamblaje de una MNAzima activa;

5 c) un sustrato sonda indicador; y

d) un oligonucleótido inhibidor que hibrida con la apta-partezima en una región que abarca al menos parte de la secuencia del aptámero y parte de la rama de unión a sustrato de la secuencia de partezima.

10 En ausencia de una diana que se une al aptámero (Figura 20 panel izquierdo), el oligonucleótido inhibidor se une a la apta-partezima bloqueando de este modo la unión (y escisión) del sustrato sonda indicador. En presencia de una diana que se une al aptámero (Figura 20 panel derecho), la diana se une a la secuencia del aptámero de la apta-partezima, evitando la unión del oligonucleótido inhibidor y permitiendo la unión y escisión del sustrato sonda indicador. Como tal, las MNAzimas solamente pueden formarse y provocar generación de señal fluorescente en presencia de diana.

15 La estrategia se demostró usando detección de una molécula pequeña, ATP. Se ha indicado previamente que la secuencia del aptámero de 27 nucleótidos de longitud es altamente específica para la unión de ATP y dATP (Achenbach, 2005; Huizenga y Szostak, 1995).

18.1. Oligonucleótidos de partezimas, ensamblaje y oligonucleótidos inhibidores

20 En este ejemplo la secuencia de aptámero de ATP se situó adyacente a la rama de sustrato de la apta-partezima A (Figura 20). Las ramas sensoras de apta-partezima A y partezima B se diseñaron para unirse a un facilitador de ensamblaje. Las secuencias de apta-partezima AtpA2/1 y partezima Atp B3/1 (Figura 21) se muestran a continuación (de 5' a 3'). En las siguientes secuencias las bases en **negrita** hibridan con el facilitador de ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Además, las bases en texto normal en partezima AtpA2/1 indican secuencias de aptámero de ADN que se unen a ATP o dATP.

25 SEC ID N°: 103 Apta-Partezima A2 AtpA2/1:

AACGTACACTGCACGCGGTCGAA*ATAGTGAGTACC*TGGGGGAGTATTGCGGA
GGAAGGT

SEC ID N°: 104 Partezima B3 AtpB3/1:

CATCTCTTCTCCGAGC**GTCTGTACCGTGTAC**

La secuencia del facilitador de ensamblaje se muestra a continuación (de 5' a 3'):

30 SEC ID N°: 105 Facilitador de ensamblaje AtpC/1:

GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

La secuencia del oligonucleótido de inhibidor se muestra a continuación (de 5' a 3').

SEC ID N°: 106 Inhibidor AtpR/1:

CCAGGTACTCACTATTT

35 18.2. Sustrato indicador

La actividad de MNAzima se controló por escisión de un sustrato indicador de ácido nucleico marcado de forma dual. El sustrato indicador para este ejemplo es SubBI-FB con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. Los cambios de la fluorescencia debido a escisión de SubBi-1-FB en el ribonucleótido entre FAM y BHQ1 se controlaron a 520 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID N°: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATG

18.3 Dianas

Las moléculas diana para este ejemplo fueron adenosín 5'-trifosfato (ATP) y desoxiadenosín 5'-trifosfato (dATP). Se usaron guanosín 5'-trifosfato (GTP) y citosín 5'-trifosfato (CTP) como controles negativos. Todas las moléculas se obtuvieron de Bioline. Se usó agua sin nucleasa como un control sin diana.

18.4. Condiciones de Reacción

- 5 La detección de la diana se midió por un aumento de la señal de fluorescencia causado por escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 50 μ l. Antes de la inyección del sustrato, todas las reacciones se preincubaron a 60 °C durante 5 minutos (para reducir la estructura secundaria). Las reacciones se realizaron a 47 °C en un FLUOstat OPTIMA (BMG Biotech). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 3 segundos durante un
- 10 total de 10 minutos. Cada reacción contenía una concentración final de AtpA/1 200 nM, AtpB3/1 200 nM, AtpC/1 200 nM, AtpR/1 200 nM, SubBi-1-FB 200 nM, MgCl₂ 25 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 2 mM de ATP, dATP, GTP, CTP o sin diana (agua).

18.5. Resultados: Detección y escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB

- 15 En ausencia de ATP o dATP se vio un nivel bajo de fluorescencia que no aumentaba a lo largo del tiempo, demostrando que el oligonucleótido inhibidor era capaz de evitar el ensamblaje de una MNAzima activa (Figura 21). En presencia de ATP o dATP la señal fluorescente era mayor y aumentaba a lo largo del tiempo. Esto indica que el oligonucleótido inhibidor se desplazó por dATP y ATP y se formó una MNAzima activa. El ensamblaje de la MNAzima era dependiente de diana puesto que la señal fluorescente en presencia de GTP y CTP era la misma que en ausencia de ATP o dATP es decir en el control de agua sin analito. Este ejemplo demuestra que las MNAzimas
- 20 pueden acoplarse a aptámeros para la detección de dianas que incluyen dianas tanto de ácido nucleico como sin ácido nucleico, en un enfoque que es altamente específico para la diana.

- Un experto en la materia reconocerá que el diseño de esta estrategia puede ser flexible. El aptámero puede incorporarse a cualquiera de los extremos (de 5' o 3') de cualquiera de las dos partezimas que contienen secuencias de núcleo catalítico parcial. Como tal, el oligonucleótido inhibidor puede unirse a la región del aptámero y a la rama
- 25 de sustrato (que se une al sustrato indicador) o la rama sensora (que se une al facilitador de ensamblaje). En el primer diseño (Figura 20; este ejemplo), el inhibidor bloquea la unión del sustrato indicador. En el segundo diseño, el inhibidor evitaría la unión del facilitador de ensamblaje con las partezimas y por lo tanto evitaría la formación de MNAzima activa.

- La bibliografía contiene secuencias para un gran número de aptámeros capaces de detectar muchos tipos de dianas. Estas incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos, priones, nucleótidos, células completas y virus. Los aptámeros para todos estos tipos de dianas pueden ligarse a partezimas para detectar una serie de moléculas muy diversa. Las condiciones de reacción (tampón, temperatura, concentración de catión divalente, etc.), que eran compatibles con tanto unión de dianas a aptámeros (o apta-partezimas) como escisión de un sustrato indicador por una MNAzima, pueden determinarse mediante ensayos empíricos. Además, puesto que los aptámeros evolucionan
- 30 *in vitro* en condiciones de reacción seleccionadas por el investigador sería posible adaptar la evolución molecular para permitir el desarrollo de aptámeros para cualquier diana deseada que se uniría en condiciones compatibles con la escisión de MNAzima. Puesto que las MNAzimas son activas sobre un intervalo muy amplio de condiciones, un experto en la materia podría determinar fácilmente las condiciones compatibles con la escisión de MNAzima.

Ejemplo 19: Uso de MNAzimas para la detección de emparejamientos erróneos de una base

- 40 Las MNAzimas pueden usarse para detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana en tiempo real usando procedimientos de amplificación de diana *in vitro* tales como PCR. También pueden usarse MNAzimas para generar resultados cualitativos, por ejemplo detectando cambios en las secuencias de ácido nucleico. Puede realizarse detección de diana mediada por MNAzima mediante reconocimiento de bases de Watson-Crick de las ramas sensoras y la secuencia diana. En este ejemplo, se usan MNAzimas para detectar un emparejamiento erróneo de una base explotando este requisito de complementariedad entre la rama sensora de partezima y la secuencia de
- 45 ácido nucleico diana.

19.1. Oligonucleótidos de Partezima

- Los oligonucleótidos de partezima se diseñaron para que fueran completamente complementarios a la secuencia diana o emparejados erróneamente con respecto a la secuencia diana (Figura 22(i)). Las secuencias de la partezima
- 50 A completamente coincidente A (RO5A5/2(22)-P), la partezima completamente coincidente B (RO5B6/2(11G)-P) y la partezima emparejada erróneamente B (RO5B6/2(11C)-P) se enumeran a continuación (de 5' a 3'). En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. La base emparejada erróneamente en la partezima RO5B6/2(11C)-P está en **negrita** y subrayada. La “-P” indica fosforilación 3' del oligonucleótido.

- 55 SEC ID N°: 107 Partezima A5 RO5A5/2(22)-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 108 Partezima B6 RO5B6/2(11G)-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGA-P

SEC ID N°: 109 Partezima B6 RO5B6/2(11C)-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGA-P

5 19.2. Sustrato indicador

El sustrato indicador usado en este ejemplo fue SubBi-2. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5', un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia de SubBi-2-FB se enumera a continuación (de 5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N°: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

19.3. Cebadores de PCR para amplificación de exón 5 de RPLPO

La secuencia diana para este ejemplo se generó por amplificación *in vitro* de ADN genómico humano usando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación (de 5' a 3').

SEC ID N°: 32 Cebador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID N°: 110 Cebador 3RO5/2:

AGCAGCCACAAAGGCAGA

20 19.4. Secuencias diana y controles

Se usó ADN genómico extraído de la línea celular K562 humana como molde para amplificación del gen de RPLPO. Se usó agua sin nucleasa (NF) en lugar de ADN genómico como un control sin diana.

19.5. Componentes de Reacción: Amplificación y detección de secuencia diana

Se realizó amplificación y detección en tiempo real de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 47 °C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5RO5/1 40 nM, 3RO5/2 200 nM, RO5A5/2(22)-P 200 nM y ROSB6/2(11G)-P 200 nM o ROSB6/2(11C)-P 200 nM, SubBi-2-FB 200 nM, MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), referencia ROX 1 x (Invitrogen), ImmoBuffer 1 x (Bioline), 1 unidad de Immolase (Bioline) y 100 ng de molde de ADN genómico o agua NF.

19.6. Resultados: Detección de emparejamiento erróneo de una base usando una MNAzima

La MNAzima que comprende la rama sensora completamente emparejada B mostró un aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana usada fue ADN genómico humano amplificado mediante PCR (Figura 22(ii)). Por el contrario, la MNAzima que contiene la rama sensora emparejada erróneamente B mostró un nivel bajo de fluorescencia con la diana genómica, similar al visto en el control sin diana, y la fluorescencia no aumentó a lo largo del tiempo. Por lo tanto, el emparejamiento erróneo sencillo, a tres bases del punto de unión de partezima A y B fue suficiente para evitar la formación de la MNAzima activa.

Este ejemplo demuestra que las MNAzimas pueden usarse para detectar emparejamientos erróneos de base sencilla entre las ramas de diana y sensora. Puesto que las MNAzimas son capaces de detectar alteraciones tan pequeñas como cambios de una base sencilla, sería obvio para un experto en la materia que las MNAzimas podrían también usarse para diferenciar secuencias que difieren en delecciones pequeñas o inserciones pequeñas. Además, podrían detectarse alteraciones mayores tales como translocaciones asociadas con diversos tipos de cáncer, que dan como resultado transcritos de fusión. Estas se producen de forma frecuente en asociación con leucemia, por ejemplo transcritos de fusión *PML/RARα* se asocian con leucemia promielocítica aguda y los transcritos de fusión *bcr/abl* se asocian con leucemia granulocítica crónica.

Aunque este ejemplo muestra que los emparejamientos erróneos sencillos pueden ser suficientes para evitar el ensamblaje de MNAzima activa, experimentos adicionales demostraron que no todos los emparejamientos erróneos de base sencilla interrumpen completamente el ensamblaje de MNAzima en todas las condiciones. La capacidad

para diferenciar emparejamientos erróneos de base sencilla depende de varios factores incluyendo a) la rigurosidad de las condiciones de reacción, que pueden verse influenciadas por muchos factores incluyendo temperatura, concentración salina, concentración de cationes, b) del tipo de emparejamiento erróneo, por ejemplo emparejamientos erróneos G/T frente a C/C, c) la posición del emparejamiento erróneo dentro de la rama de partezima y d) la longitud de la rama de partezima.

Pueden usarse estrategias adicionales para aumentar la capacidad de la MNAzima para detectar polimorfismos de base sencilla. Estas incluyen, por ejemplo, el uso de una rama sensora de partezima truncada como se demuestra en el ejemplo 22.

Ejemplo 20: Ensayo de la actividad de MNAzima de una serie de pares de partezimas que contienen secuencias de núcleo catalítico parcial variantes derivadas del núcleo catalítico 10:23

Pueden prepararse enzimas de ácido nucleico multicomponentes (MNAzimas) que incorporan secuencias parciales de una diversidad de ADNzimas evolucionadas *in vitro*. Se han demostrado MNAzimas activas, basándose en secuencias parciales de las ADNzimas 8:17 y 10:23. Además, se ha mostrado que varios diseños de partezimas alternativas basadas en las ADNzimas 8:17 y 10:23 tienen (Ejemplos 1, 3, Figuras 9, 10 y 13) o carecen (Ejemplo 1, Figura 8) de actividad. Este ejemplo extiende adicionalmente estos estudios e identifica secuencias de partezima tanto activas como inactivas basándose en secuencias de núcleo catalítico parcial de la ADNzima 10:23. Además, el ejemplo proporciona un protocolo general para las etapas necesarias para identificar el lugar o lugares óptimos para dividir una secuencia de núcleo catalítico de modo que, cuando las secuencias de núcleo catalítico parcial se incorporan en partezimas, se generan MNAzimas activas funcionales.

20.1. Oligonucleótidos de Partezima

El procedimiento en este ejemplo se usó para investigar qué posiciones dentro de la secuencia de núcleo catalítico 10:23 son adecuadas para dividir en secuencias de núcleo catalítico parcial que, tras la incorporación en partezimas, dan como resultado MNAzimas funcionalmente activas. La secuencia 10:23 se dividió en diversos puntos y después las dos secuencias parciales se incorporaron en una serie de pares de partezimas que se diseñaron para escindir un sustrato en presencia de diana (gen de RPLPO humano). Los núcleos catalíticos parciales para cada par de partezimas que se ensayaron se muestran en la Tabla 22 en referencia a la secuencia de núcleo catalítico completo de la ADNzima 10:23 (Santoro y Joyce, 1997).

Tabla 22: Bases y posición en la ADNzima 10:23 y en una serie de pares de partezimas variantes en las que las bases en las posiciones 1 a 15 del núcleo se han distribuido de forma diferente entre las dos partezimas A y B.

Nº de posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ADNzima 10:23 (Santoro y Joyce, 1997)	G	G	C	T	A	G	C	T	A	C	A	A	C	G	A
Diseño 6 A4: BS (T8- A9)	Partezima A								A	C	A	A	C	G	A
	Partezima B		G	G	C	T	A	G	C	T					
Diseño 7 A5: B6 (C7- T8)	Partezima A							T	A	C	A	A	C	G	A
	Partezima B		G	G	C	T	A	G	C						
Diseño 8 A6: B7 (A11- A12)	Partezima A											A	C	G	A
	Partezima B		G	G	C	T	A	G	C	T	A	C	A		

(cont)

Nº de posición		1	2	3	4	S	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1S
Diseño 9 A7: B8 (A9- C10)	Partezima A										C	A	A	C	G	A
	Partezima	G	G	C	T	A	G	C	T	A						
Diseño 10 A8: B9 (G6- C7)	Partezima A							C	T	A	C	A	A	C	G	A
	Partezima B	G	G	C	T	A	G									
Diseño 11 A9: B10 A (A5- G6)	Partezima						G	C	T	A	C	A	A	C	G	A
	Partezima B	G	G	C	T	A										
Todas las secuencias están escritas de 5' a 3'. El diseño de MNAzima y nomenclatura de partezima se continúa a partir de la serie de la Tabla 3 y se extiende en esta tabla para identificar la localización de la división dentro del núcleo. Por ejemplo, el diseño 6 es una MNAzima derivada de 10:23 con diseño de partezima A4 y partezima B5 (A4:B5), en el que el núcleo se ha dividido entre T en la posición 8 y A en la posición 9 (T8-A9).																

En este experimento todas las series de pares de partezimas se sintetizaron con las ramas sensoras diseñadas para hibridarse con el exón 5 del gen de RPLPO humano y con ramas de sustrato dirigidas contra el sustrato, SubBi-2. Las ramas de partezima usadas en este experimento se sintetizaron por Sigma-Proligo y sus secuencias se enumeran a continuación (de 5' a 3'). Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana de ácido nucleico y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. La “-P” indica fosforilación 3' del oligonucleótido.

Par de partezimas de RPLPO A4:B5

SEC ID Nº: 147 RO5A4/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT -P

SEC ID Nº: 112 RO5B5(16)/2-P

*TGCCCAGGGAGGCTAGCT***GTGGAGACGGATTACA** -P

Par de partezimas de RPLPO A5:B6

SEC ID Nº: 107 RO5A5/2(22)-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT -P

SEC ID Nº: 114 RO5B6(16)/2-P

*TGCCCAGGGAGGCTAGC***GTGGAGACGGATTACA** -P

Par de partezimas de RPLPO A6:B7

SEC ID Nº: 115 RO5A6(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACGAGAGGAAACCTT -P

SEC ID Nº: 116 RO5B7(16)/2-P

*TGCCCAGGGAGGCTAGCTAC***GTGGAGACGGATTACA** -P

Par de partezimas de RPLPO A7:B8

SEC ID Nº: 117 RO5A7(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTCTCAACGAGAGGAAACCTT -P

SEC ID N°: 118 RO5B8(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCTAGTGGAGACGGATTACA -P

Par de partezimas de RPLPO A8:B9

5 SEC ID N°: 119 RO5A8(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTCTCTACAACGAGAGGAAACCTT -P

SEC ID N°: 120 RO5B9(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGGTGGAGACGGATTACA -P

Par de partezimas de RPLPO A9:B10

10 SEC ID N°: 121 R05A9(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTCTGCTACAACGAGAGGAAACCTT -P

SEC ID N°: 122 R05B10(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGTGGAGACGGATTACA -P

20.2. Sustrato Indicador

15 El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. En el siguiente ejemplo, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

20 SEC ID N°: 21 SubBi-2-FB

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

20.3. Cebadores de PCR para la amplificación de exón 5 del gen de RPLPO humano.

La secuencia de los cebadores se muestra, de 5' a 3', a continuación.

SEC ID N°: 123 5' Cebador 5R05/2

25 GCTACCCAACTGTTGCATC

SEC ID N°: 110 3' Cebador 3R05/2

AGCAGCCACAAAGGCAGA

20.4. Molde de diana

Se usó ADN genómico extraído de células K562 como molde en la reacción de PCR.

30 **20.5. Condiciones de reacción**

La amplificación en tiempo real de la secuencia diana y la detección de actividad catalítica de los pares de partezimas se realizó en una reacción de 25 µl sometida a ciclos en un termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 95 °C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 30 segundos (con una reducción de 1 °C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 50 °C durante 30 segundos. Cada reacción contenía 5R05/1 0,04 µM y 3R05/2 0,2 µM, Much 10 mM, 50 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Immobuffer 1 x (Bioline), SubBi-2-FB 0,2 µM, colorante de referencia Rox 1 x (Invitrogen), 10 unidades de Rnasin (Progema) y 1 unidad de polimerasa Immolase (Bioline) y 100 ng de ADN genómico. Además cada reacción contenía un par de partezimas, partezima A 0,2 µM y partezima B 0,2 µM (par de partezimas de RPLPO A4:B5, A5:B6, A6:B7, A7:B8, A8:B9 o A9:B10).

40 **20.6. Resultados**

Usando un procedimiento de PCR de MNAzima en tiempo real, se detectó la actividad catalítica de tres de los seis pares de partezimas de RPLPO. El par de partezimas A4:B5 y A5:B6 mostró altos niveles de actividad catalítica, permitiendo la detección de diana en ≤ 22 ciclos (Tabla 23). El par de partezimas A7:B8 también era activo, aunque

menos activo que A4:B5 y A5:B6. No se detectó actividad catalítica de los pares de partezimas A6:B7, A8:B9 o A9:B10 en las condiciones de este experimento.

Tabla 23: valores de Ciclo Umbral (Ct) obtenidos usando diversos pares de partezimas

División del núcleo (véase tabla anterior, este ejemplo)	Ct	Comentario
A4:B5 (T8-A9)	19,3	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partezimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.
A5:B6 (C7-T8)	21,6	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partezimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.
A6:B7 (A11-A12)	Sin señal a los 50 ciclos	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partezimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
A7:B8 (A9-C10)	31,7	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partezimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.
A8:B9 (G6-C7)	Sin señal a los 50 ciclos	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partezimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
A9:B10 (A5-G6)	Sin señal a los 50 ciclos	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partezimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
Los valores de Ct están promediados a partir de reacciones por triplicado, cuando el nivel de fluorescencia umbral se estableció a 0,2 y la fluorescencia de fondo de línea basal se restó entre los ciclos 1 y 14.		

5 **Ejemplo 21: Aplicación de MNAzimas para detectar dianas proteicas.**

Como se ha demostrado en el ejemplo 18, las MNAzimas pueden usarse para detectar dianas incorporando secuencias de aptámero en el extremo de una partezima (apta-partezima). En este ejemplo, la misma estrategia de detección de MNAzima (Figura 20) se usó para detectar la proteína *Taq* polimerasa usando una secuencia de aptámero de 46 nucleótidos de largo que se ha indicado que se une a *Taq* polimerasa con alta especificidad (Yakimovich, 2003). El facilitador de ensamblaje y el oligonucleótido de partezima B eran los mismos que los usados en el ejemplo 18 cuando se detectó ATP usando una MNAzima.

21.1. Oligonucleótidos de partezima, ensamblaje y oligonucleótidos inhibidores

En este ejemplo la secuencia de aptámero de *Taq* polimerasa se colocó adyacente a la rama de sustrato de la apta-partezima A (Figura 20). Las ramas sensoras de apta-partezima A y partezima B se diseñaron para unirse a un facilitador de ensamblaje. Las secuencias de aptapartezima TaqA2/1 y la partezima AtpB3/1 se muestran a continuación (de 5' a 3'). En las siguientes secuencias las bases en negrita hibridan con el facilitador de ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Además, las bases en texto normal en apta-partezima A2 TaqA2/1 indican secuencias de aptámero de ADN que se unen a *Taq* polimerasa.

20 SEC ID N°: 124 Apta-Partezima A2 TaqA2/1:

AACGTACACTGCACGCGGTCGAAATAGTGAGTGCGGTCGGCTCGGGGCATTC
TTAGCGTTTTGCCCCGAGCCGACCGC

SEC ID N°: 104 Partezima B3 AtpB3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCGTCTGTACCGTGTAC

La secuencia del facilitador de ensamblaje se muestra a continuación (de 5' a 3'):

5 SEC ID N°: 105 Facilitador de ensamblaje AtpC/1:

GTACACGGTACAGACCGTGCA GTGTACGTT

La secuencia del oligonucleótido inhibidor se muestra a continuación (de 5' a 3').

SEC ID N°: 125 Inhibidor TaqR/1:

TGCCCCGAGCCGACCGAACTCACTATT

10 **21.2. Sustrato indicador**

La actividad de MNAzima se controla por escisión de un sustrato indicador de ácido nucleico marcado de forma dual. El sustrato indicador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3'. Los cambios de fluorescencia debido a escisión de SubBi-1-FB en el ribonucleótido entre FAM y BHQ1 se controlaron a 520 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID N°: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATG

21.3. Diana

20 La molécula diana en este ejemplo fue la ADN *Taq* polimerasa (Amersham Biosciences) y se usó polimerasa Klenow (Amersham Biosciences) como un control negativo. Se usó agua sin nucleasa como un control "sin diana".

21.4. Condiciones de Reacción

25 La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de la señal de fluorescencia provocado por la escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 50 µl. Las reacciones se realizaron a 40°C en un FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 6 segundos durante un total de 15 minutos. Cada reacción contenía una concentración final de TaqA2/1 200 nM, AtpB3/1 200 nM, AtpC/1 200 nM, TaqR/1 200 nM, SubBi-1-FB 200 nM, MgCl₂ 25 mM, Tris HCl 25 mM pH 6,8 y 5 unidades de ADN *Taq* polimerasa o 5 unidades de polimerasa Klenow o sin proteína (solamente agua).

30 **21.5. Resultados: Detección y escisión de sustrato indicador SubBi-1-FB**

35 En ausencia de *Taq* polimerasa se vio un nivel bajo de fluorescencia que solo aumentaba ligeramente a lo largo del tiempo, demostrando que el oligonucleótido inhibidor era capaz de evitar el ensamblaje de una MNAzima activa. En presencia de *Taq* polimerasa, la señal fluorescente era mayor y aumentaba a lo largo del tiempo. Esto indica que el oligonucleótido inhibidor se desplazó por *Taq* polimerasa y se formó una MNAzima activa. El ensamblaje de la MNAzima era dependiente de diana puesto que la señal fluorescente en presencia de polimerasa Klenow era similar a la señal en ausencia de *Taq* polimerasa es decir en el control de agua "sin diana". Esto es coherente con las observaciones de Yakimovich y col (2003) que mostró que la secuencia de aptámero de *Taq* polimerasa es específica de *Taq* polimerasa y no se une a Klenow. Este ejemplo de MNAzima anterior demuestra que las MNAzimas pueden acoplarse con aptámeros para la detección de proteínas específicas.

40 **Ejemplo 22: Detección de un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) usando una partezima truncada y un oligonucleótido estabilizador**

45 Puede producirse detección de diana mediada por MNAzima mediante reconocimiento de bases de Watson-Crick de las ramas sensoras de partezima y la secuencia diana. En el ejemplo 19, este requisito de complementariedad se usó para detectar un emparejamiento erróneo de base sencilla entre la rama sensora de partezima y la secuencia de ácido nucleico diana. En el siguiente ejemplo, el requisito de complementariedad se explotó de nuevo para detectar un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) usando una estrategia que usaba una partezima con una rama sensora truncada, que puede estabilizarse por un oligonucleótido estabilizador. La estrategia de detección de MNAzima

usada en este ejemplo se ilustra en la Figura 23 y los oligonucleótidos requeridos se describen a continuación:

a) partezima patrón;

b) una partezima con una rama sensora truncada (por ejemplo 5 bases) que se diseña para coincidir completamente con una forma del SNP pero no con la otra;

5 c) un oligonucleótido estabilizador (por ejemplo 15 bases), que hibrida con la diana adyacente a la rama sensora truncada de la partezima.

El estabilizador se diseña para facilitar el ensamblaje de MNAzima cuando la rama sensora de 5 nucleótidos se hibrida con la diana; y

d) un sustrato sonda indicador

10 22.1. Oligonucleótidos de partezima y oligonucleótido estabilizador

En este ejemplo, la rama sensora de partezima B se diseñó para ser de solamente 5 nucleótidos de longitud y para diferenciar una SNP que se produce en el oligonucleótido diana. La rama sensora de partezima B se diseñó para hibridar con la forma "T" del SNP pero no la forma "C" del SNP. Las secuencias de partezimas A y B y el oligonucleótido estabilizador se muestran a continuación (de 5' a 3'). En las secuencias siguientes las bases en **negrita** hibridan con la diana, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. La "-P" indica fosforilación 3' del oligonucleótido.

SEC ID N°: 126 Parteizima A4 XdA4/2-P:

ACTGGATGTCCATCTGTCTGACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 127 Parteizima B5 XdB5/2-P:

20 **TGCCCAGGGAGGCTAGCTTATAC-P**

SEC ID N°: 128 Estabilizador XdF/2-P:

CTTCGTGAGGGTGAG-P

22.2. Sustrato indicador

25 El sustrato indicador para este ejemplo fue SubBi-2. En ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5', un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 520 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia de SubBi-2-FB se enumera a continuación (de 5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N°: 21 SubBi-2-FB:

30 **AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA**

22.3. Diana

35 Las moléculas diana para este ejemplo fueron oligonucleótidos sintéticos derivados del gen de Xd. Una de las dianas correspondía a la forma "T" del SNP (XdC/2(52)) y coincidía completamente con la rama sensora de partezima B. La otra diana correspondía a la forma "C" del SNP y estaba emparejada erróneamente con la rama sensora de partezima B. Los oligonucleótidos sintéticos se solicitaron de Sigma-Proligo y se usó agua sin nucleasa en lugar de diana como un control "sin diana". Las secuencias de ambas dianas se enumeran a continuación (de 5' a 3') con el SNP subrayado.

SEC ID N°: 129 Diana XdC/2(52):

TGCCCCCTCACCTCACGAAGGATATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

40 SEC ID N°: 130 Diana (emparejamiento erróneo) XdC/2(1M52):

TGCCCCCTCACCTCACGAAGGCATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

22.4. Condiciones de Reacción

45 La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de la señal fluorescente provocado por escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 50 µl. Las reacciones se realizaron a 55 °C en un FLUOstar

OPTIMA (BMG Biotech). La fluorescencia para cada reacción se leyó cada 2 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones contenían XdA4/2-P 200 nM, XdB5/2-P 200 nM, Tampón de PCR II 1x (Applied Biosystem) y MgCl₂ 25 mM. Además, la reacción contenía oligonucleótidos enumerados en la Tabla 24.

Tabla 24. Reactivos adicionales en las reacciones de MNAzima.

Reacción	Diana	Estabilizador
A	XdC/2(52) 200 nM	XdF/2-P 200 nM
B	XdC/2(1M52): 200 nM	XdF/2-P200 nM
C	XdC/2(52) 200 nM	Sin estabilizador
D	Sin diana	XdF/2-P 200 nM

22.5. Resultados: Detección y escisión de sustrato indicador SubBi-2-FB

La MNAzima mostró un aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo cuando se usó el molde de SNP completamente coincidente (Reacción A: Figura 23). Por el contrario, cuando el molde esta emparejado erróneamente (contenía un SNP), la señal fluorescente no aumentó a lo largo del tiempo (Reacción B: Figura 23). De forma similar, no hubo un aumento de fluorescencia en ausencia de oligonucleótido diana (Reacción D: Figura 23). Se mostró que la presencia del oligonucleótido estabilizador era esencial para estabilizar el complejo de MNAzima. Una reacción que contenía todos los componentes de reacción incluyendo diana completamente coincidente, pero que carecía del oligonucleótido estabilizador, no proporcionó aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo (Reacción C: Figura 23). Como tal, 5 bases de la rama sensora fueron insuficientes para formar un complejo de MNAzima estable pero la presencia de un oligonucleótido estabilizador podía compensar la corta longitud de la rama sensora de partezima (5 bases) y permitir formación de MNAzima estable en condiciones de temperatura rigurosas (55 °C en este ejemplo). El oligonucleótido estabilizador puede considerarse una tercera partezima en este sistema, puesto que se requiere para la formación de MNAzima estable.

Este ejemplo demuestra que las MNAzimas pueden usarse para diferenciar entre dos dianas que difieren en tan poco como un SNP. Además, demuestra la aplicación de partezimas con ramas sensoras truncadas y su uso en combinación con oligonucleótidos estabilizadores.

Ejemplo 23: Actividad catalítica de MNAzimas con sustituciones de ribonucleótidos.

A diferencia de las ribozimas, no se ha descubierto que las ADNzimas aparezcan en la naturaleza. Las ADNzimas evolucionan *in vitro* a partir de grandes bibliotecas de oligonucleótidos. La sustitución de ciertos ribonucleótidos por ciertos desoxirribonucleótidos en ribozimas conocidas se ha intentado en ciertas condiciones (McCall y col., 1992). Las ribozimas que se han convertido completamente a ADN no tienen actividad debido a las diferencias conformacionales de ADN y ARN (Perreault y col., 1990). Estos estudios demuestran que las enzimas de ARN no pueden modificarse a enzimas de ADN funcionales meramente reemplazando los ribonucleótidos con desoxirribonucleótidos. Se realizaron experimentos para investigar la tolerancia de MNAzimas a sustitución de desoxirribonucleótidos por ribonucleótidos.

23.1. Oligonucleótidos de partezima

En este ejemplo, se sintetizaron diversas partezimas en las que uno o más desoxirribonucleótidos se reemplazaron con ribonucleótidos dentro de las regiones que constituyen el núcleo catalítico parcial. Se sintetizaron partezimas que tenían una sustitución de ribonucleótido sencillo o que tenían la región del núcleo catalítico parcial completa reemplazada con ribonucleótidos. Los oligonucleótidos de partezima A y B tenían ramas sensoras complementarias a una región del exón 4 del gen de *RPLPO* humano. Los oligonucleótidos de partezimas se enumeran a continuación, de 5' a 3'. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Las bases en minúscula representan bases de ARN que han reemplazado a bases de ADN.

SEC ID N°: 131 partezima A (Control) RO4A5(18)/2-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 132 partezima B (Control) RO4B6 (19)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGTTGACAATGGCAGCA-P

SEC ID N°: 133 Partezima A (ribo-14g): RO4A5(18)/2-rG14

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACgAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 134 Partezima A (ribo-9a): RO4A5(18)/2-rA9-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTaCAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 135 Partezima A (ribo x 8): RO4rA5(18)/2

GGGCTGGTCATCCAGCAGuacaacgaGAGGAAACCTT

5 SEC ID N°: 136 Partezima B (ribo x 7): RO4rB6(19)/2

TGCCCAGGGAggcuagcGTGTTTCGACAATGGCAGCA

23.2. Sustrato Indicador

10 El sustrato indicador para este ejemplo fue SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. En el ejemplo presente, SubBi-2 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). En las siguientes secuencias, las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID N°: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

15 23.3. Secuencia diana

Se usó un oligonucleótido de ADN sintético como el molde diana en este experimento. La secuencia de la diana se muestra a continuación, de 5' a 3'.

SEC ID N°: 8 Diana RO4/1

GCCATTGTCGAACACCTGCTGGATGACCAGC

20 23.4. Condiciones de reacción

Se realizó análisis de la actividad catalítica de diversos pares de partezimas usando un termociclador SmartCycler System (Cepheid). Los volúmenes de reacción totales fueron de 25 µl y cada reacción contenía tampón de PCR II 1 X (Applied Biosystems), MgCl₂ 10 mM, SubBi-2-FB 0,2 µM, Diana RO4/1 µM y un par de partezimas A y B cada una a 2 µM. Los pares de partezimas en cada reacción fueron como en la Tabla 24.

25 **Tabla 24: Partezimas en diversas reacciones.**

Reacción	Partezima A	Partezima B	Número de repeticiones
Partezimas de control A y B(solamente ADN)	RO4A5(18)/2-P	RO4B6(19)/2-P	4
Partezima A (ribo - 9a) y partezima de control B	RO4A5(18)/2-rA9-P	RO4B6 (19)/2-P	3
Partezima A (ribo - 14g) y partezima de control B	RO4A5(18)/2-rG 14-P	RO4B6 (19)/2-P	3
Partezima A (ribo x 8) y partezima de control B	R04rA5(18)/2	RO4B6 (19)/2-P	3
Partezima de control A y partezima B (ribo x 7)	RO4A5(18)/2-P	RO4rB6(19)/2	3
Partezima A (ribo x 8) y partezima B (ribo x 7)	RO4rA5(18)/2	RO4rB6(19)/2	3

30 Las reacciones se incubaron a 54 °C durante 20 minutos y se recogieron datos de fluorescencia a intervalos de 12 segundos. Puesto que la fluorescencia de partida puede variar para pocillos individuales en el termociclador SmartCycler System, el valor de fluorescencia inicial se restó de la fluorescencia en cada punto temporal para cada reacción para permitir la comparación entre reacciones en diferentes pocillos.

23.5. Resultados: Actividad catalítica de las MNAzimas con sustituciones de ribonucleótidos dentro de las secuencias de núcleo catalítico parcial de partezima.

La escisión catalítica del sustrato por MNAzimas compuestas por los diversos pares de partezimas se controló como un cambio en la fluorescencia a lo largo del tiempo (Tabla 25).

35

Tabla 25: Resultados obtenidos usando diversas combinaciones de partezimas.

Reacción	Resultado
Reacción de control con partezimas A y B solamente de ADN	Aumento rápido de fluorescencia; la fluorescencia alcanzó una meseta después de 5 minutos de incubación
Partezima A (ribo - 9a) y partezima de control B	Aumento de fluorescencia; la fluorescencia no había alcanzado todavía una meseta después de 20 minutos de incubación
Partezima A (ribo - 14g) y partezima de control B	Aumento rápido de fluorescencia; la fluorescencia alcanzó una meseta después de 5 minutos de incubación
Partezima A (ribo x 8) y partezima de control B	Sin aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo.
Partezima de control A y partezima B (ribo x 7)	Sin aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo.
Partezima A (ribo x 8) y partezima B (ribo x 7)	Sin aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo.

El experimento muestra que algunas sustituciones de ribonucleótidos dentro del núcleo catalítico parcial de las partezimas son compatibles con formación de MNAzima activa. Aunque la sustitución sencilla (partezima A (ribo 14g)) tuvo actividad similar a la de las partezimas solo de ADN en estas condiciones, una sustitución sencilla alternativa (partezima A (ribo9a)), aunque aún era compatible con la formación de MNAzima activa, escindió sustrato a una velocidad menor que la del control. La MNAzima no toleró la sustitución de todos los nucleótidos en el dominio de núcleo catalítico parcial de partezima A y/o partezima B.

Ejemplo 24: Activación de una MNAzima por liberación de partezimas ligadas como un mecanismo para iniciar una cascada de amplificación de señal.

24.1. Cascadas de amplificación de señales mediadas por MNAzima

Pueden usarse MNAzimas para iniciar cascadas de amplificación de señal. Una estrategia para dicha cascada de amplificación de señal se ilustra en la Figura 25. En presencia de la diana, la MNAzima activa 1 se forma a partir de partezimas que están libres en solución. La MNAzima 1 escinde su sustrato ligado, Sub1, liberando de este modo componentes de partezima para la MNAzima 2. Una vez libres, estas partezimas hibridan con el facilitador de ensamblaje y forman MNAzima 2 que escinde sustrato Sub 2. El Sub 2 marcado de forma dual, que está libre en solución, se escinde por MNAzima 2 y se genera señal fluorescente. Además, la MNAzima 2 escinde Sub 2 ligada liberando partezimas, que tienen las mismas ramas sensoras que MNAzima 2 y cuando hibridan con el facilitador de ensamblaje, forman MNAzima 3. (El facilitador de ensamblaje puede estar ligado o estar libre en solución). Puesto que la MNAzima 3 comparte las mismas ramas de sustrato que la MNAzima, también puede escindir Sub1 ligado, liberando de este modo más componentes de partezima para MNAzima 2. Esto da como resultado una cascada de generación enzimática de los componentes (partezimas) para más enzimas (MNAzimas) y amplificación de señal conjunta.

24.2. Activación de MNAzima ligada capaz de escindir sustrato marcado con fluorescencia

Este ejemplo demuestra la primera etapa de la cascada de amplificación de señal como se ilustra en la Figura 25. En esta etapa de iniciación, la diana se une a partezimas, que están libres en solución y forma MNAzima activa 1. La MNAzima 1 escinde su sustrato ligado, Sub1, liberando de este modo componentes de partezima para MNAzima 2. Una vez libres, estas partezimas hibridan con el facilitador de ensamblaje y forman MNAzima 2. Sub 2 – FQ marcado de forma dual (específicamente SubBi-3-FB en este ejemplo), que está libre en solución, se escinde por MNAzima 2 y se genera señal fluorescente.

24.3. Oligonucleótidos de partezima

En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Las bases que están tanto en *cursiva* como subrayadas representan las secuencias de sustrato que están acopladas a partezimas a ligar. La “-P” indica fosforilación del oligonucleótido y la “(Biotina)” indica biotilación del oligonucleótido. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Todas las secuencias indicadas a continuación se escriben de 5' a 3'.

Las partezimas de MNAzima 1 libres en solución se diseñaron para unirse específicamente al exón 5 del gen de RPLPO humano y las partezimas de MNAzima 2 ligada se diseñaron para hibridar con el facilitador de ensamblaje.

SEC ID N°: 147 Partezima A4 RO5A4/2-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTCTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID N°: 148 Partezima B5 RO5B5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC -P

SEC ID N°: 138 Sustrato ligado 1/Partezima A4 RO4A4/3-5b:

(Biotina)AAAAAAAGGTTTCCTCquCCCTGGGCAGCTGGTCATCCAGCAG ACAACGAGGTTGTGCTG

5 SEC ID N°: 139 Sustrato ligado 1/Partezima B5 RO4B5/3-3b:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGTTCGACAATGGCAAGGTTTCCTCquCCCTGG GCAAAAAA(Biotina)

24.4. Sustrato indicador

10 El sustrato indicador (Sub 2; Figura 25) para este ejemplo es SubBi-3 con la secuencia, de 5' a 3', como sigue. En el presente ejemplo, SubBi-3 se marcó en sus extremos con un resto de 6-FAM en el extremo 5' y un resto de BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-FB. La escisión de SubBi-3-FB se controló a 516 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 492 (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEC ID N°: 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAACCCquCACCAACCG

15 24.5. Diana sintética y Secuencias facilitadoras

En las siguientes secuencias, "(Biotina)" indican biotilación del oligonucleótido.

SEC ID N°: 140 Facilitador de ensamblaje RO4/2-3b:

GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC-(Biotina)

SEC ID N°: 141 diana sintética RPLPO 5 (RO5):

20 GAAGGTGTAATCCGCTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

24.6. Unión de partezimas biotiniladas a placas de microtitulación revestidas de estreptavidina

25 La unión de partezimas biotiniladas y facilitador de ensamblaje se realizó a temperatura ambiente en un volumen de reacción total de 100 µl. La mezcla de unión contenía partezima RO4A4/3-5b 200 nM, partezima RQ4B5/3-3b 200 nM y facilitador de ensamblaje RO4/2-3b 200 nM en solución de PBS Amresco (sin Ca⁺ ni Mg⁺). La mezcla de unión (100 µl) se separó en alícuotas en cada pocillo de placas de microtitulación revestidas con estreptavidina (Roche Diagnostics). El tiempo de unión fue de 30 minutos, seguido de 3 lavados usando PBS, cada uno con 15 minutos de incubación antes de la retirada por lavado.

24.7. Escisión de MNAzima ligada y detección de sustrato marcado con fluorescencia escindido

30 La escisión de sustrato marcado con fluorescencia, SubBi-3-FB se controló de forma isotérmica a 55 °C durante 4 minutos en el fluorímetro FluoStar Optima (BMG LabTech) en un volumen total de reacción de 100 µl. Las reacciones contenían partezima RO5A4/2-P 200 nM, partezima RO5B5/2-P 200 nM, sustrato SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 25 mM, Tampón de PCR II 1x (Applied Biosystems) y diana RO5 sintética 200 nM. Se usó agua sin nucleasa en lugar de diana RO5 sintética para los controles "sin diana". La reacción se inició con adición del sustrato SubBi-3-FB.

35 24.8. Resultados: Cambio en el nivel de fluorescencia en presencia de diana R05 frente a control "sin diana".

40 Hay un aumento de la fluorescencia en presencia de la diana RO5 en comparación con reacciones que carecen de diana (control de agua). El cambio de fluorescencia después de 4 minutos fue de aproximadamente 36.000 unidades en presencia de diana, en comparación con < 1.000 unidades para el control sin diana. Esto demuestra la capacidad de MNAzima 1 (compuesta de partezimas RO5A4/2-P y RO5B5/2-P) para escindir el sustrato ligado y liberar las partezimas que componen MNAzima 2. Además, demuestra que una vez liberada, la partezima puede formar un complejo de MNAzima activa con el facilitador de ensamblaje que es capaz de escisión de sustrato que conduce a generación de señal.

Ejemplo 25: Diferenciación directa entre citosinas metiladas y citosinas en ADN.

45 El uso de una rama estabilizadora con una partezima que tiene ramas sensoras truncadas se usó para demostrar la capacidad de las MNAzimas para detectar polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) presentes en facilitadores de ensamblaje de diana (ejemplo 22). En la condición experimental usada en ese ejemplo, se usó una rama sensora de cinco bases como una sonda para SNP a 55 °C, bastante por encima de su temperatura de fusión esperada. Los

sistemas con ramas estabilizadoras, y partezimas que tienen ramas sensoras truncadas, son muy sensibles a pequeños cambios en la diana. Esta estrategia de detección puede extenderse adicionalmente para diferenciar directamente entre dianas, que están metiladas o no metiladas en restos de citosinas específicos, sin la necesidad de modificación con bisulfito anterior (véase ejemplo 11).

- 5 La presencia de 5-metilcitosina o 5-metilcitosinas aumenta la temperatura de fusión del ADN en 1,3 °C por base metilada, en relación con citosina o citosinas no metiladas. Por lo tanto, una partezima con, por ejemplo, una rama sensora de cinco nucleótidos de largo sería capaz de unirse a una diana que contenga tres 5-metilcitosinas a una temperatura casi 4 °C mayor que a la que sería capaz de unirse a una diana no metilada de la misma secuencia.

- 10 Cuando las partezimas, una rama estabilizadora y un sustrato se incuban a una temperatura, que es adecuada para hibridación y formación de MNAzima en presencia de una diana metilada, pero que es demasiado alta para la formación de MNAzima en presencia de una diana no metilada, se generaría una señal solamente en presencia de la diana metilada.

Esto proporciona una nueva estrategia para análisis de patrones de metilación que puede proporcionar un procedimiento para detección de bases de metilación como marcadores de cáncer y otras enfermedades.

- 15 **Ejemplo 26: Uso de MNAzimas para inducir un cambio de color en respuesta a una diana**

- Una estrategia para usar MNAzimas en formato colorimétrico se ilustra en la Figura 24. En este enfoque, un sustrato de MNAzima se incorporaría en un oligonucleótido puente. El oligonucleótido puente tiene complementariedad con oligonucleótidos unidos a partículas de oro. Si no estuviera presente el facilitador de ensamblaje, el oligonucleótido puente permanecería intacto y las partículas de oro se agregarían haciendo la reacción azul. Si un facilitador de
20 ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana, estuviera presente entonces las MNAzimas activas se ensamblarían a partir de partezimas presentes en solución y escindirían el sustrato (y por lo tanto el oligonucleótido puente). Esto conduciría a la dispersión de los agregados de partículas de oro que a su vez provocarían un cambio de color de azul a rojo.

- 25 La estrategia de MNAzima proporciona un sistema que incorpora varios componentes genéricos y, como tal, proporciona un procedimiento que puede adaptarse fácilmente para cualquier nueva diana. Esto proporciona una ventaja sobre otros sistemas que usan ADNzimas y partículas de oro que requieren con moléculas más complejas.

- En esta estrategia de MNAzima, el sustrato de MNAzima y las partículas de oro con oligonucleótidos unidos podrían ser genéricos y usarse para análisis de cualquier diana de ácido nucleico. Nuevos sistemas analíticos requerirían solamente la síntesis de nuevas partezimas con ramas sensoras complementarias a la nueva diana.
30 Además, la reacción colorimétrica también puede usarse junto con sistemas de MNAzimas sensibles a activación por ácidos nucleicos, proteínas u otras dianas.

REFERENCIAS

Patentes y Publicaciones de Patentes:

- 35 Publicación Internacional de PCT N° WO 99/45146
Publicación Internacional de PCT N° IB99/00848
Publicación Internacional de PCT N° WO 99/50452
Publicación Internacional de PCT N° WO 00/58505
Solicitud de PCT/US96/02380 ("Asher")
Patente de Estados Unidos N° 4.683.202
40 Patente de Estados Unidos N° 4.683.195
Patente de Estados Unidos N° 4.000.159
Patente de Estados Unidos N° 5.176.995
Patente de Estados Unidos N° 4.965.188
Patente de Estados Unidos N° 6.140.055
45 Patente de Estados Unidos N° 6.201.113

Otras Referencias:

- Achenbach, J., Nutiu, R. y Li, Y. (2005) Structure-switching allosteric deoxyribozymes. *Analytica Chimica Acta*. 534(1): 41-51.
Adams, J. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*. Oct;40(10): 1457-63.
50 Bobrow, M., Harris, T., Shaughnessy, K. y Litt, G. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. Dic 20(125(1-2)): 279-85.
Breaker, R. (1997) DNA enzymes. *Nat Biotech*. 15: 427-431.
Breaker, R.R. y Joyce, G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*. Dec;1 (4): 223-9.
55 Brown, A., Li, J., Pavot, C. y Lu, Y. (2003) A lead-dependent DNAzyme with a two-step mechanism. *Biochem*. Jun 17; 42(23): 7152-61.

- Cairns, M., King, A. y Sun, L. (2000) Nucleic acid mutation analysis using catalytic DNA. *Nucl Acids Res.* 28(3): e9.
- Cairns, M., King, A. y Sun, L. (2003) Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucl Acids Res.* Jun 1; 31(11): 2883-9.
- Carmi, N., Shultz, L.A. y Breaker, R.R. (1996) In vitro selection of self cleaving DNAs. *Chem Biol.* 3(12): 1039-46.
- 5 Chehab, F.F., Doherty, M., Cai, S.P., Kan, Y.W., Cooper, S. y Rubin, E.M. (1987) Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias [carta] [la carta publicada aparece en *Nature* Oct 1987 22-28;329(6141):678]. *Nature.* 329(6137): 293-4.
- Chen, C., Ridzon, D., Broomer, A., Zhou, H., Barbisn, M., Lao, K. y Livak, K. (2005) MicroRNA quantitation by looped RT-PCR. *AACR. póster.*
- 10 Cheng, S., Merlino, G.T. y Pastan (1993) A versatile method for coupling of proteins to DNA:synthesis of a2-macroglobin-DNA conjugates. *Nucleic Acid Research:* 11, 659-669.
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 350(6313): 91-2.
- Cruz, R.P., Withers, J.B. y Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme. *Chem Biol. Ene;*11(1): 57-67.
- 15 Cuenoud, B. y Szostak, J.W. (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature.* 375(6532): 611-4.
- Eigen, M. y Rigler, R. (1994) Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(13): 5740-7.
- Elghanian, R., Storhoff, J., Mucic, R., Letsinger, R. y Mirkin, C. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science.* 277: 1078-1079.
- 20 Fahy, E., Kwoh, D. y Gingeras, T. (1991) Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Appl.* Ago;1(1): 25-33.
- Hall, J.G., Eis, P.S., Law, S.M., Reynaldo, L.P., Prudent, J.R., Marshall, D.J., Allawi, H.T., Mast, A.L., Dahlberg, J.E., Kwiatkowski, R.W., de Arruda, M., Neri, B.P. y Lyamichev, V.I. (2000) From the Cover: Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(15): 8272-8277.
- 25 Haseloff, J. y Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature.* Ago 18; 334(6183): 585-91.
- Huizenga, D. y Szostak, J. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry.* 34: 656-665
- Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. y Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science.* 267(5198): 643-7.
- 30 Impey, H., Applegate, T., Houghton, M., Fuery, C., King, J. y Todd, A. (2000) Factors that influence deoxyribozyme cleavage during polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* Nov 15; 286(2): 300-3.
- Jonas, V., Alden, M., Curry, J., Kamisango, K., Knott, C., Lankford, R., Wolfe, J. y Moore, D. (1993) Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology.* 31: 2410-2416.
- 35 Kuwabara, T., Warashina, M., Nakayama, A., Ohkawa, J. y Taira, K. (1999) tRNAVal-heterodimeric maxizymes with high potential as gene inactivating agents: Simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(5): 1886-1891.
- Kuwabara, T., Warashina, M. y Taira, K. (2000) Allosterically controllable maxizymes cleave mRNA with high efficiency and specificity. *TIBTECH.* Nov (18): 462-468.
- 40 Lee, J.F., Hesselberth, J.R., Meyers, L.A. y Ellington, A.D. (2004) Aptamer Database. *Nucl Acids Res.* 32(90001): D95-100.
- Levy, M. y Ellington, A. (2003) Exponential growth by cross-catalytic cleavage of deoxyribozymogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(11): 6416-21.
- Li, J., Zheng, W., Kwon, A.H. y Lu, Y. (2000) In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn (II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucl Acids Res.* 28(2): 481-488.
- 45 Li, Y. y Sen, D. (1996) A catalytic DNA for porphyrin metallation [carta]. *Nat Struct Biol.* 3(9): 743-7.
- Liu, J. y Lu, Y. (2004) Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor. *Analytical Chemistry.* 76: 1627-1632.
- Lizardi, P., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. y Ward, D. (1998) Mutation detection and singlemolecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* Jul;19(3): 225-32.
- 50 Lohse, P.A. y Szostak, J.W. (1996) Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions. *Nature.* 381(6581): 442-4.
- McCall, M., Hendry, P. y Jennings, P. (1992) Minimal Sequence Requirements for Ribozyme Activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(13): 5710-5714.
- Mirkin, C., Letsinger, R., Mucic, R. y Storhoff, J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* 382: 607-609.
- 55 Nagamine, K., Kuzuhara, Y. y Notomi, T. (2002) Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 290(4): 1195-1198.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. y Hase, T. (2000) Loopmediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acids Res.* Jun 15;28(12): E63.
- 60 Oshima, K., Kawasaki, H., Soda, Y., Tani, K., Asano, S. y Taira, K. (2003) Maxizymes and Small Hairpin-Type RNAs That Are Driven by a tRNA Promoter Specifically Cleave a Chimeric Gene Associated with Leukemia in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 63(20): 6809-6814.
- Paul, N. y Joyce, G. (2004) Minimal self-replicating systems. *Current Opinion in Chemical Biology.* 8(6): 634-639.
- Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. y Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. *Biochemistry.* 30(16): 4020-5.
- 65 Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. and Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- y ribo- oligonucleotides

- with catalytic activity. *Nature*. 344(6266): 565-7.
- Perriman, R., Delves, A. y Gerlach, W.L. (1992) Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene*. 113(2): 157-63.
- 5 Raap, A., van de Corput, M., Vervenne, R., van Gijlswijk, R., Tanke, H. y Wiegant, J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet. Abstr*;4(4): 529-34.
- Raillard, S.A. y Joyce, G.F. (1996) Targeting sites within HIV-1 cDNA with a DNA-cleaving ribozyme. *Biochemistry*. 35(36): 11693-701.
- 10 Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230(4732): 1350-4.
- Santoro, S. y Joyce, G. (1997) A general purpose RNA cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 4262-4266.
- Santoro, S.W. y Joyce, G.F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochem*. 37(38): 13330-42.
- 15 Schubert, S., Furste, J., Werk, D., Grunert, H., Zeichhardt, H., Erdmann, V. y Kurreck, J. (2004) Gaining target access for deoxyribozymes. *J Mol Biol*. May 28;339(2): 355-63.
- Sidorov, A., Grasby, J. y Williams, D. (2004) Sequence-specific cleavage of RNA in the absence of divalent metal ions by a DNAzyme incorporating imidazolyl and amino functionalities. *Nucl Acids Res*. Mar 5;32(4): 1591-601.
- 20 Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzyme that cleaves RNA). *Chem Biol*. Jan;11(1): 7-8.
- Tarasow, T.M., Tarasow, S.L. and Eaton, B.E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature*. 389(6646): 54-7.
- Todd, A.V., Fuery, C.J., Impey, H.L., Applegate, T.L. y Haughton, M.A. (2000) DzyNA-PCR: use of DNAzymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format. *Clin Chem*. May;46(5): 625 -630.
- 25 Urdea, M. (1993) Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chem*. 39: 725-726.
- van Gijlswijk, R., Zijlmans, H., Wiegant, J., Bobrow, M., Erickson, T., Adler, K., Tanke, H. y Raap, A. (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. Mar;45(3): 375-82.
- 30 Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. y Malinowski, D.P. (1992) Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucl Acids Res*. 20(7): 1691-6.
- Warashina, M., Kuwabara, T., Nakamatsu, Y. y Taira, K. (1999) Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome. *Chem Biol. Abstr*;6(6): 237-50.
- Yakimovich, O., Alekseev, Y., Maksimenko, A., Voronina, O. y Lunin, V. (2003) Influence of DNA aptamer structure on the specificity of binding to Taq DNA polymerase. *Biochemistry (Moscow)*. 68(2): 228-235.
- 35 Zaborowska, Z., Furste, J., Erdmann, V. y Kurreck, J. (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme. *J Biol Chem*. 277(43): 24061-7-22.
- Zhang, S., Scharadin, N., Purohit, P. y Chasin, L. (2005) Aptamer-based multiplexed amplified real-time biochemical detector. *Indiana Biosensor Symposium. Poster*.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Johnson & Johnson Research Pty Limited	
5	<120> Enzimas de ácido nucleico multicomponentes y procedimientos para su uso	
	<130> 774711C	
	<160> 176	
10	<170> PatentIn versión 3.2	
	<210> 1	
15	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 1	
20	gctggtcatc cagcacggc gaaatagtga gt	32
	<210> 2	
	<211> 33	
25	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 2	
	gctggtcatc cagcagcggt cgaaatagtg agt	33
30	<210> 3	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
35	<400> 3	
	catctcttct ccgtcgaagt gttcgacaat ggc	33
	<210> 4	
40	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 4	
45	catctcttct ccggtgttcg acaatggc	28
	<210> 5	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
50	<400> 5	
	catctcttct ccgagcgtgt tcgacaatgg c	31
	<210> 6	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<220>	
60	<221> ARN	
	<222> (10)..(10)	
	<400> 6	
	actcactata ggaagagatg	20

ES 2 370 910 T3

5	<210> 7 <211> 32 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 7 gctggtcac cagcacggc taaatagtga gt	32
10	<210> 8 <211> 31 <212> ADN <213> Sintético	
15	<400> 8 gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c	31
20	<210> 9 <211> 31 <212> ADN <213> Sintético	
25	<400> 9 cgaccattag gtcgtccaca agctgttacc g	31
30	<210> 10 <211> 28 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 10 tacctgcact acggtcgaaa tagtgagt	28
35	<210> 11 <211> 27 <212> ADN <213> Sintético	
40	<400> 11 catctcttct ccgagctaag cacttta	27
45	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 12 taaagtgcct atagtgcagg ta	22
50	<210> 13 <211> 24 <212> ADN <213> Sintético	
55	<400> 13 caaagtgcct acagtgcagg tagt	24
60	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 14	

ES 2 370 910 T3

	aaagtgcgtg tcgtgcaggt ag	22
5	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> Sintético	
10	<400> 15 aaaagtgcctt acagtgcagg tagc	24
15	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Sintético	
20	<400> 16 taaagtgcgtg acagtgcaga t	21
25	<210> 17 <211> 42 <212> ADN <213> Sintético	
30	<400> 17 caaacgagtc ctggccttgt ccgcacaacg agaggaaacc tt	42
35	<210> 18 <211> 42 <212> ADN <213> Sintético	
40	<400> 18 tgcccaggga ggctagctgc ggtggagacg gattacacct tc	42
45	<210> 19 <211> 40 <212> ADN <213> Sintético	
50	<400> 19 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt	40
55	<210> 20 <211> 39 <212> ADN <213> Sintético	
60	<400> 20 tgcccaggga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc	39
	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Sintético	
	<220> <221> ARN <222> (12)..(13) <400> 21 aaggtttct cguccctggg ca	22
	<210> 22 <211> 43 <212> ADN	

ES 2 370 910 T3

	<213> Sintético	
	<400> 22	
5	gaagggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg	43
	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Sintético	
	<400> 23	
	caagactgga gacaaagtg	19
	<210> 24	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 24	
20	gcagagtffc ctctgtgata	20
	<210> 25	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 25	
	acgtgacgct aaagtgc	18
30	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
35	<400> 26	
	cgtccgaatg acgtacctgc ac	22
	<210> 27	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 27	
45	cgaatgacgt acctgcac	18
	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> ARN	
50	<213> Sintético	
	<400> 28	
	uaaagugcuu auagugcagg ua	22
	<210> 29	
55	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
60	<220>	
	<221> Fosforilación	
	<222> (39)..(39)	
	<400> 29	

ES 2 370 910 T3

	caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag gttgtgctg	39
5	<210> 30 <211> 39 <212> ADN <213> Sintético	
10	<220> <221> Fosforilación <222> (39)..(39)	
	<400> 30 cgggtgtgta ggctagctgt ggagacggat tacaccttc	39
15	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Sintético	
20	<220> <221> ARN <222> (11)..(12)	
25	<400> 31 cagcacaacc guaccaacc g	21
30	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 32 cattctatca tcaacgggta	20
35	<210> 33 <211> 18 <212> ADN <213> Sintético	
40	<400> 33 caaaggcaga tggatcag	18
45	<210> 34 <211> 29 <212> ADN <213> Sintético	
50	<400> 34 tacctgcact aacaacgaga ggaaacctt	29
55	<210> 35 <211> 28 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 35 tgcccaggga ggctagctaa gcacttta	28
60	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Sintético	
	<220>	

<221> ARN
 <222> (11)..(12)

 <400> 36
 5 cagcacaacc gucaccaacc g 21

 <210> 37
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Sintético

 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (33) .. (33)
 15
 <400> 37
 gaccgtgagg tagtaacaac gagaggaaac ctt 33

 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Sintético

 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (33)..(33)
 25
 <400> 38
 tgcccaggga ggctagctgg ttgtatagtt gtc 33
 30
 <210> 39
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Sintético
 35
 <400> 39
 ugagguagua gguuguauag uu 22

 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sintético
 40
 <400> 40
 agcgaagctg agacaactat acaa 24
 45
 <210> 41
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Sintético
 50
 <400> 41
 cgacgtgacc gtgaggtag 19
 55
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sintético
 60
 <400> 42
 catggcaca gcaagctga 20

 <210> 43
 <211> 33

<212> ADN
 <213> Sintético

 5 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (33)..(33)

 <400> 43
 gccccgcct ccaactacaa cgagggtgtg ctg 33
 10
 <210> 44
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Sintético
 15
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (31)..(31)
 20
 <400> 44
 cggttggtga ggctagcaac gcccgcacct c 31

 <210> 45
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Sintético

 <400> 45
 gttggttacg gtcgcggttc 20
 30
 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sintético
 35
 <400> 46
 ccgaccgtaa ctattcgata cg 22

 <210> 47
 40
 <400> 47
 000

 <210> 48
 45 <400> 48
 000

 <210> 49
 <400> 49
 50 000

 <210> 50
 <400> 50
 000
 55
 <210> 51
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Sintético
 60
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (37)..(37)
 65 <400> 51

ES 2 370 910 T3

	agatcaagat cattgctcca caacgagagg aaacctt	37
5	<210> 52 <211> 36 <212> ADN <213> Sintético	
10	<220> <221> Fosforilación <222> (36)..(36)	
15	<400> 52 tgcccaggga ggctagcttc ctgagcgcaa gtactc	36
20	<210> 53 <400> 53 000	
25	<210> 54 <400> 54 000	
30	<210> 55 <211> 38 <212> ADN <213> Sintético	
35	<220> <221> Fosforilación <222> (38)..(38)	
40	<400> 55 agttcaaadc tgtactgcac cacaacgaga ggcgtgat	38
45	<210> 56 <211> 38 <212> ADN <213> Sintético	
50	<220> <221> Fosforilación <222> (38)..(38)	
55	<400> 56 ctgggaggaa ggctagctct ggaggtggat tccttgg	38
60	<210> 57 <211> 42 <212> ADN <213> Sintético	
	<220> <221> Fosforilación <222> (42)..(42)	
	<400> 57 actgaataga aatagtgata gatacaacga gtgccatgtt aa	42
	<210> 58 <211> 41 <212> ADN <213> Sintético	
	<220>	

ES 2 370 910 T3

	<221> Fosforilación		
	<222> (41)..(41)		
	<400> 58		
5	tatcacagcc aaggctagct ccattcctat gactgtagat t	41	
	<210> 59		
	<211> 22		
	<212> ADN		
10	<213> Sintético		
	<220>		
	<221> ARN		
	<222> (12)..(13)		
	<400> 59		
15	aaggttcct cguccctggg ca	22	
	<210> 60		
	<211> 21		
	<212> ADN		
20	<213> Sintético		
	<220>		
	<221> ARN		
25	<222> (11)..(12)		
	<400> 60		
	cagcacaacc guaccaacc g	21	
30	<210> 61		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
35	<220>		
	<221> ARN		
	<222> (11)..(12)		
	<400> 61		
40	atcacgcctc gutctccca g	21	
	<210> 62		
	<211> 25		
	<212> ADN		
45	<213> Sintético		
	<220>		
	<221> ARN		
	<222> (13)..(14)		
50	<400> 62		
	ttaacatggc acgutggctg tgata	25	
	<210> 63		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 63		
60	cattgccgac aggatgcaga	20	
	<210> 64		
	<211> 18		
	<212> ADN		

ES 2 370 910 T3

	<213> Sintético	
5	<400> 64 gagccgccga tccacacg	18
10	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Sintético	
15	<400> 65 cactcagcca ctggatttaa	20
20	<210> 66 <211> 19 <212> ADN <213> Sintético	
25	<400> 66 gcgcgtcttt gctttattc	19
30	<210> 67 <211> 21 <212> ADN <213> Sintético	
35	<400> 67 ctttgctgac ctgctggatt a	21
40	<210> 68 <211> 21 <212> ADN <213> Sintético	
45	<400> 68 cctgttgact ggtcattaca a	21
50	<210> 69 <211> 38 <212> ADN <213> Sintético	
55	<220> <221> Fosforilación <222> (38) .. (38)	
60	<400> 69 agatcaagat cattgtctcca caacgagtgcatgttaa	38
65	<210> 70 <211> 38 <212> ADN <213> Sintético	
70	<220> <221> Fosforilación <222> (38)..(38)	
75	<400> 70 tatcacagcc aaggctagct tctgagcgc aagtactc	38
80	<210> 71 <211> 39	

<212> ADN
 <213> Sintético

 <220>
 5 <221> Fosforilación
 <222> (39)..(39)

 <400> 71
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag tgcgccatg 39
 10
 <210> 72
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Sintético
 15
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (41)..(41)
 20
 <400> 72
 tactctccc aaggctagct gtggagacgg attacacctt c 41

 <210> 73
 <400> 73
 25 000

 <210> 74
 <400> 74
 30 000

 <210> 75
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Sintético
 35
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (41)..(41)
 40
 <400> 75
 actgaataga aatagtgata gatacaacga gaggaacct t 41

 <210> 76
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Sintético

 <220>
 <221> Fosforilación
 50 <222> (39)..(39)

 <400> 76
 tgcccaggga ggctagctcc attcctatga ctgtagatt 39
 55
 <210> 77
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sintético
 60
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (33)..(33)

 <400> 77

ES 2 370 910 T3

gctggtcatc cagcagacaa cgagggtgtg ctg 33

5
 <210> 78
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sintético

10
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (33)..(33)

15
 <400> 78
 cggttggtga ggctagctgt gttcgacaat ggc 33

20
 <210> 79
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sintético

25
 <220>
 <221> ARN
 <222> (12)..(13)

30
 <400> 79
 aaggttcct cguccctggg ca 22

35
 <210> 80
 <400> 80
 000

40
 <210> 81
 <400> 81
 000

45
 <210> 82
 <400> 82
 000

50
 <210> 83
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sintético

55
 <220>
 <221> ARN
 <222> (11)..(12)

60
 <400> 83
 catggcgac gutgggagaa gta 23

65
 <210> 84
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Sintético

70
 <400> 84
 caagactgga gacaaagtg 19

75
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sintético

80
 <400> 85

ES 2 370 910 T3

	gcagagtttc ctctgtgata	20
5	<210> 86 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
10	<220> <221> Fosforilación <222> (37)..(37)	
15	<400> 86 gggtgtcgtc agctcgtgta caacgagagg aaacctt	37
20	<210> 87 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
25	<220> <221> Fosforilación <222> (37)..(37)	
30	<400> 87 tgcccaggga ggctagctcg tgagatgttg ggtaag	37
35	<210> 88 <211> 18 <212> ADN <213> Sintético	
40	<400> 88 tgggtcatgg ttgtcgtc	18
45	<210> 89 <211> 17 <212> ADN <213> Sintético	
50	<400> 89 ttgcgctcgt tgcggga	17
55	<210> 90 <211> 38 <212> ADN <213> Sintético	
60	<220> <221> Fosforilación <222> (38) .. (38)	
	<400> 90 gaagaggcca ataaaggaga gacaacgaga ggcgtgat	38
	<210> 91 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
	<220> <221> Fosforilación <222> (37)..(37)	

	<400> 91		
	ctgggaggaa ggctagctaa caccagcttg ttacacc	37	
	<210> 92		
	<211> 22		
5	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 92		
	cagggctcatc cattccatgc ag	22	
10	<210> 93		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
15	<400> 93		
	gctagtacca gttgagccag	20	
	<210> 94		
	<211> 37		
20	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 94		
25	gggctgggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt	37	
	<210> 95		
	<211> 37		
	<212> ADN		
30	<213> Sintético		
	<400> 95		
	gggctgggtca tccagcagta caacaagagg aaacctt	37	
35	<210> 96		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
40	<400> 96		
	gggctgggtca tccagcagtt caacgagagg aaacctt	37	
	<210> 97		
	<211> 37		
45	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 97		
	gggctgggtca tccagcagta catcgagagg aaacctt	37	
50	<210> 98		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
55	<400> 98		
	gggctgggtca tccagcagta ctacgagagg aaacctt	37	
	<210> 99		
60	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		

ES 2 370 910 T3

	<400> 99 tgcccaggga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca	36	
5	<210> 100 <211> 36 <212> ADN <213> Sintético		
10	<400> 100 tgcccaggga ggctagagtg ttcgacaatg gcagca	36	
15	<210> 101 <211> 36 <212> ADN <213> Sintético		
20	<400> 101 tgcccaggga ggccagcgtg ttcgacaatg gcagca	36	
25	<210> 102 <211> 40 <212> ADN <213> Sintético		
30	<400> 102 atgctgccat tgtgaacac ctgctggatg accagcccaa	40	
35	<210> 103 <211> 59 <212> ADN <213> Sintético		
40	<400> 103 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtacctgggg gagtattgcg gaggaaggt	59	
45	<210> 104 <211> 31 <212> ADN <213> Sintético		
50	<400> 104 catctcttct ccgagcgtct gtaccgtgta c	31	
55	<210> 105 <211> 30 <212> ADN <213> Sintético		
60	<400> 105 gtacacggta cagaccgtgc agtgtacgtt	30	
	<210> 106 <211> 17 <212> ADN <213> Sintético		
	<400> 106 ccaggtactc actattt	17	
	<210> 107 <211> 41 <212> ADN		

<213> Sintético
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (41)..(41)
 5
 <400> 107
 caaacgagtc ctggcctgt cttacaacga gaggaacct t 41
 10
 <210> 108
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Sintético
 15
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (28) .. (28)
 20
 <400> 108
 tgcccagggga ggctagcgtg gagacgga 28
 25
 <210> 109
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Sintético
 30
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (28)..(28)
 35
 <400> 109
 tgcccagggga ggctagcgtc gagacgga 28
 40
 <210> 110
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sintético
 45
 <400> 110
 agcagccaca aaggcaga 18
 50
 <210> 111
 <400> 111
 000
 55
 <210> 112
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Sintético
 60
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (34)..(34)
 <400> 112
 tgcccagggga ggctagctgt ggagacggat taca 34
 <210> 113
 <400> 113
 000
 <210> 114
 <211> 33
 <212> ADN

	<213> Sintético	
	<220>	
	<221> Fosforilación	
5	<222> (33) .. (33)	
	<400> 114	
	tgcccaggga ggctagcgtg gagacggatt aca 33	
10	<210> 115	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
15	<220>	
	<221> Fosforilación	
	<222> (37)..(37)	
	<400> 115	
20	caaacgagtc ctggccttgt ctacgagagg aaacctt	37
	<210> 116	
	<211> 37	
	<212> ADN	
25	<213> Sintético	
	<220>	
	<221> Fosforilación	
	<222> (37)..(37)	
30	<400> 116	
	tgcccaggga ggctagctac agtgagacg gattaca	37
	<210> 117	
35	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<220>	
40	<221> Fosforilación	
	<222> (39)..(39)	
	<400> 117	
	caaacgagtc ctggccttgt ctcaacgaga ggaaacctt	39
45	<210> 118	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
50	<220>	
	<221> Fosforilación	
	<222> (35)..(35)	
	<400> 118	
55	tgcccaggga ggctagctag tggagacgga ttaca	35
	<210> 119	
	<211> 42	
	<212> ADN	
60	<213> Sintético	
	<220>	
	<221> Fosforilación	
	<222> (42)..(42)	

ES 2 370 910 T3

	<400> 119 caaacgagtc ctggccttgt ctctacaacg agaggaaacc tt	42
5	<210> 120 <211> 32 <212> ADN <213> Sintético	
10	<220> <221> Fosforilación <222> (32)..(32)	
15	<400> 120 tgcccaggga ggctaggtgg agacggatta ca	32
20	<210> 121 <211> 43 <212> ADN <213> Sintético	
25	<220> <221> Fosforilación <222> (43)..(43)	
	<400> 121 caaacgagtc ctggccttgt ctgctacaac gagaggaaac ctt	43
30	<210> 122 <211> 31 <212> ADN <213> Sintético	
35	<220> <221> Fosforilación <222> (31)..(31)	
40	<400> 122 tgcccaggga ggctagtggga gacggattac a	31
45	<210> 123 <211> 19 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 123 gctacccaac tqttgcatc	19
50	<210> 124 <211> 78 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 124 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtgcggtcgg ctcggggcat tcttagcggt	60
55	ttgccccgag cccgaccgc	78
60	<210> 125 <211> 28 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 125	

ES 2 370 910 T3

	tgccccgagc cgaccgaact cactattt	28
5	<210> 126 <211> 38 <212> ADN <213> Sintético	
10	<220> <221> Fosforilación <222> (38) .. (38)	
	<400> 126 actggatgtc catctgtctg acaacgagag gaaacctt	38
15	<210> 127 <211> 23 <212> ADN <213> Sintético	
20	<220> <221> Fosforilación <222> (23)..(23)	
25	<400> 127 tgcccaggga ggctagctta tac	23
30	<210> 128 <211> 15 <212> ADN <213> Sintético	
35	<220> <221> Fosforilación <222> (15)..(15)	
	<400> 128 cttcgtgagg gtgag	15
40	<210> 129 <211> 52 <212> ADN <213> Sintético	
45	<400> 129 tgccccctca ccctcacgaa ggtatacaga cagatggaca tccagttggt ga	52
50	<210> 130 <211> 52 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 130 tgccccctca ccctcacgaa ggcatacaga cagatggaca tccagttggt ga	52
55	<210> 131 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
60	<220> <221> Fosforilación <222> (37)..(37)	

ES 2 370 910 T3

	<400> 131 gggctgggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt	37
5	<210> 132 <211> 36 <212> ADN <213> Sintético	
10	<220> <221> Fosforilación <222> (36)..(36)	
15	<400> 132 tgcccaggga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca	36
20	<210> 133 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
25	<220> <221> ARN <222> (25)..(25)	
30	<220> <221> Fosforilación <222> (37)..(37)	
35	<400> 133 gggctgggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt	37
40	<210> 134 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
45	<220> <221> ARN <222> (20)..(20)	
50	<220> <221> Fosforilación <222> (37)..(37)	
55	<400> 134 gggctgggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt	37
60	<210> 135 <211> 37 <212> ADN <213> Sintético	
	<220> <221> ARN <222> (19)..(26)	
	<400> 135 gggctgggtca tccagcagua caacgagagg aaacctt	37
	<210> 136 <211> 36 <212> ADN <213> Sintético	

ES 2 370 910 T3

<220>
 <221> ARN
 <222> (11)..(17)

5 <400> 136
 tgcccaggga ggcuagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

10 <210> 137
 <400> 137
 000

15 <210> 138
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Sintético

20 <220>
 <221> Biotina
 <222> (1)..(1)

25 <220>
 <221> ARN
 <222> (18)..(19)

30 <400> 138
 aaaaaaagg ttctctguc cctgggcagc tggatcatcca gcagacaacg aggtgtgtct g 61

35 <210> 139
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Sintético

40 <220>
 <221> ARN
 <222> (45)..(46)

45 <220>
 <221> Biotina
 <222> (61)..(61)

50 <400> 139
 cggtgtgtga ggctagctgt gtgcgacaat ggcaagggtt cctcguccct gggcaaaaaa a 61

55 <210> 140
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Sintético

60 <220>
 <221> Biotina
 <222> (31)..(31)

65 <400> 140
 gccattgtcg aacacctgct ggaatgaccag c 31

70 <210> 141
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Sintético

75 <400> 141
 gaaggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg 43

ES 2 370 910 T3

5	<210> 142 <211> 28 <212> ADN <213> Sintético <400> 142 tgagctacag tcggtcgaaa tagtgagt 28
10	<210> 143 <211> 27 <212> ADN <213> Sintético
15	<400> 143 catctcttct ccgagcgctt catctca 27
20	<210> 144 <211> 42 <212> ADN <213> Sintético
25	<400> 144 ggcactaacg tgccctgagct acagtcggtc gaaatagtga gt 42
30	<210> 145 <211> 41 <212> ADN <213> Sintético
35	<400> 145 catctcttct ccgagcgctt catctcacga cgataacgtc g 41
40	<210> 146 <211> 22 <212> ADN <213> Sintético
45	<400> 146 tgagatgaag cactgtagct ca 22
50	<210> 147 <211> 40 <212> ADN <213> Sintético
55	<220> <221> Fosforilación <222> (40)..(40)
60	<400> 147 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt 40
65	<210> 148 <211> 39 <212> ADN <213> Sintético
70	<220> <221> Fosforilación <222> (39)..(39)
75	<400> 148 tgcccaggga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc 39

5	<210> 149	
	<211> 8	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
10	<220>	
	<221> ARN	
	<222> (2)..(2)	
15	<400> 149	
	tacaacga	8
20	<210> 150	
	<211> 8	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
25	<400> 150	
	cggtcgaa	8
30	<210> 151	
	<211> 7	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
35	<400> 151	
	acaacga	7
40	<210> 152	
	<211> 8	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
45	<400> 152	
	tacaacga	8
50	<210> 153	
	<211> 8	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
55	<220>	
	<221> ARN	
	<222> (7)..(7)	
60	<400> 153	
	tacaacga	8
65	<210> 154	
	<400> 154	
	000	
70	<210> 155	
	<211> 8	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
75	<400> 155	
	tacaacaa	8
80	<210> 156	
	<211> 8	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	

ES 2 370 910 T3

	<400> 156 ttcaacga	8
5	<210> 157 <211> 8 <212> ADN <213> Sintético	
10	<400> 157 tacatcga	8
15	<210> 158 <400> 158 000	
20	<210> 159 <211> 8 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 159 tactacga	8
25	<210> 160 <400> 160 000	
30	<210> 161 <211> 6 <212> ADN <213> Sintético	
35	<400> 161 caacga	6
40	<210> 162 <400> 162 000	
45	<210> 163 <400> 163 000	
50	<210> 164 <400> 164 000	
55	<210> 165 <400> 165 000	
	<210> 166 <211> 6 <212> ADN <213> Sintético	
60	<400> 166 ccgagc	6
65	<210> 167 <211> 8 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 167	

ES 2 370 910 T3

	ggctagct	8
5	<210> 168 <211> 7 <212> ADN <213> Sintético	
10	<400> 168 ggctagc	7
15	<210> 169 <211> 7 <212> ADN <213> Sintético	
20	<400> 169 ggctaga	7
25	<210> 170 <211> 7 <212> ADN <213> Sintético	
30	<400> 170 ggccagc	7
35	<210> 171 <400> 171 000	
	<210> 172 <211> 9 <212> ADN <213> Sintético	
	<400> 172 ggctagcta	9

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en la que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador de ensamblaje de MNAzima para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa, en la que cada uno de dichos al menos primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprende una parte de rama de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora;
- 5 en la que tras el autoensamblaje, la parte de rama sensora de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como ramas sensoras de la MNAzima, la parte de rama de sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como ramas de sustrato de la MNAzima, y el núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como un núcleo catalítico de la MNAzima;
- 10 y en la que las ramas sensoras de la MNAzima interaccionan con dicho facilitador de ensamblaje de MNAzima para mantener el primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para asociación de sus respectivas partes de núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, siendo capaz dicho núcleo catalítico de modificar al menos un sustrato y en la que dichas ramas de sustrato de dicha MNAzima interaccionan con un sustrato de modo que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima puede modificar dicho sustrato.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1 en la que al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o sustrato están comprendidos por ADN o un análogo del mismo.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2 en la que dicho facilitador de ensamblaje es una diana a identificar, detectar o cuantificar.
- 20 4. La composición de la reivindicación 3 en la que dicha diana es un ácido nucleico.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico que actúa para estabilizar al menos una de dichas partes de rama de sustrato o partes de rama sensora.
- 25 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la que al menos uno de dicho facilitador de ensamblaje, dichos componentes oligonucleotídicos o sustrato o una combinación de los mismos está comprendido por más de una molécula.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que las partes de núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico se seleccionan del grupo que comprende SEC ID N°: 149 - 153, 155 - 157, 159 y 161 y las partes del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico se seleccionan del grupo que comprende SEC ID N°: 166 - 170 y 172.
- 30 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en la que al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador de ensamblaje o sustrato o una combinación de los mismos comprende adicionalmente al menos un aptámero o parte del mismo.
- 35 9. La composición de la reivindicación 8 en la que dichos aptámeros o parte de los mismos están comprendidos por al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende adicionalmente un inhibidor de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la que al menos uno de dicho primer o segundo componentes oligonucleotídicos o dicho facilitador de ensamblaje o dicho sustrato comprende adicionalmente al menos una parte de secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura en horquilla.
- 40 12. La composición de la reivindicación 11 en la que dicha estructura en horquilla inhibe el autoensamblaje de dicha MNAzima.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en la que dicho facilitador de ensamblaje es un ácido nucleico o una proteína.
- 45 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que dicho sustrato comprende adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula o combinación de las mismas.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que dicho sustrato comprende una parte detectable y una parte interruptora, en la que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce.
- 50 16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 en la que dicha modificación de dicho sustrato

por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable.

17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 en la que dicha modificación de dicho sustrato se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida o cualquier combinación de los mismos.

5 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en la que al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador de ensamblaje, dicho sustrato o dicho inhibidor se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos péptido nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico-péptido o una combinación de los mismos.

10 19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 en la que dichos facilitador de ensamblaje y dicho sustrato son ácidos nucleicos que son completamente o parcialmente complementarios a al menos parte de dicho primer o segundo componente oligonucleotídicos.

15 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19 que comprende adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un facilitador de ensamblaje adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, en la que cada uno de dichos al menos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos comprenden una pare de rama de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora;

20 en la que tras el autoensamblaje de al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico, la parte de rama sensora de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman ramas sensoras de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, la parte de rama de sustrato de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman ramas de sustrato de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional y la parte de núcleo catalítico de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional;

25 y en la que las ramas sensoras de dicha al menos una MNAzima adicional interaccionan con dicho al menos un facilitador de ensamblaje adicional para mantener dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componente oligonucleotídico en proximidad para asociación de sus partes de núcleo catalítico respectivas para formar el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional, siendo dichos núcleos catalíticos capaces de actuar en al menos un sustrato adicional y en la que las ramas de sustrato de dicha al menos una MNAzima adicional se une con al menos un sustrato adicional de modo que el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional puede actuar en dicho al menos un sustrato adicional.

21. La composición de la reivindicación 20 en la que cada uno de los sustratos adicionales es la mismo, diferente o una combinación de los mismos.

22. Un procedimiento para detectar la presencia de al menos un facilitador de ensamblaje que comprende:

35 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en los que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador de ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa;

40 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, siendo capaz dicho primer sustrato de modificarse por dicha primera MNAzima, proporcionando dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima un efecto detectable;

(c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que potencialmente contiene dicho al menos primer facilitador de ensamblaje en condiciones que permiten:

- (1) el autoensamblaje de dicha al menos primera MNAzima y
- (2) la actividad catalítica de dicha al menos primera MNAzima; y

45 (d) detectar dicho efecto detectable, detectando de este modo la presencia de dicho al menos un facilitador de ensamblaje.

23. El procedimiento de la reivindicación 22 en el que al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o sustrato está comprendido por ADN o un análogo del mismo.

50 24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-23 en el que al menos uno de dicho facilitador de ensamblaje, dicho primer o segundo componentes oligonucleotídicos o sustrato o combinación de los mismos está comprendido por más de una molécula.

25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23-24 en el que dicho facilitador de ensamblaje es un ácido nucleico o una proteína.

26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 que comprende adicionalmente proporcionar al

menos un tercer y cuarto componente oligonucleotídico, en el que dicho al menos tercer y al menos cuarto componente oligonucleotídico es capaz de autoensamblarse en presencia de al menos un facilitador de ensamblaje adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional y

5 en el que al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, siendo capaz dicho sustrato adicional de modificarse solamente por la MNAzima adicional, proporcionando dicha modificación un efecto detectable adicional.

27. El procedimiento de la reivindicación 26 en el que dicho un sustrato adicional se une a al menos un soporte insoluble de modo que se produce un efecto detectable cuando el sustrato se modifica por su MNAzima respectiva.

10 28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27 en el que al menos un de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos comprende adicionalmente al menos un aptámero; y en el que dichas condiciones permiten

- (1) unión de dicho facilitador de ensamblaje con dicho al menos un aptámero y
- (2) modificaciones catalíticas de dicho sustrato por dicha MNAzima; y

determinar la presencia de la modificación catalítica de la MNAzima, siendo la presencia de la modificación catalítica indicativa de la presencia de dicho facilitador de ensamblaje.

15 29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-28 que comprende adicionalmente proporcionar al menos un primer inhibidor que es capaz de inhibir dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa en ausencia de dicho facilitador de ensamblaje.

30. El procedimiento de la reivindicación 29 en el que al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador de ensamblaje o aptámero comprende adicionalmente dicho inhibidor.

20 31. El procedimiento de la reivindicación 30 en el que dicha inhibición de autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa se retira tras el contacto de dicho aptámero con dicho facilitador de ensamblaje.

32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 29-31 en el que dicho inhibidor es capaz de unirse al menos a uno de dicho aptámero o parte del mismo.

25 33. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-32 en el que dicho efecto detectable se mide cuantitativa o cualitativamente.

34. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-33 en el que el facilitador de ensamblaje es una variante de secuencia de ácido nucleico o un ácido nucleico metilado.

30 35. El procedimiento de la reivindicación 34 en el que la variante de secuencia se selecciona del grupo que comprende polimorfismos de nucleótido sencillo, polimorfismos de múltiples nucleótidos, inserciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones, variantes de secuencia de desplazamiento de fase, variantes de secuencia sin sentido o cualquier combinación de los mismos.

36. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-35 en el que uno o ambos de dicho primer componente oligonucleotídico y dicho segundo componente oligonucleotídico están comprendidos por más de una molécula.

35 37. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 34 o 35 que comprende adicionalmente una etapa de amplificar dicha variante de secuencia de ácido nucleico.

38. El procedimiento de la reivindicación 37 que comprende adicionalmente la determinación de la presencia de dicha variante de secuencia de ácido nucleico durante o después de dicha amplificación.

40 39. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 34 o 35 en el que la ausencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha variante de secuencia.

40. El procedimiento para detectar un ácido nucleico metilado de la reivindicación 34 en el que dichas condiciones comprenden adicionalmente una temperatura que facilita la hibridación de dicha MNAzima con dicho ácido nucleico metilado pero no con ácido nucleico no metilado.

45 41. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-38 o 40 que comprende adicionalmente amplificar el efecto detectable mediante el uso de una cascada de amplificación de efecto detectable.

42. El procedimiento de la reivindicación 41 en el que la cascada de amplificación de efecto detectable comprende una o más de una cascada de ribozima/ligasa, una cascada de enzima de ácido nucleico circular, una cascada de enzima proteica o una o más enzimas unidas a un soporte o cualquier combinación de las mismas.

50 43. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-42 que comprende adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos uno de dicho sustrato o dicho primer o segundo componentes

oligonucleotídicos, o dicho inhibidor, o dicho facilitador de ensamblaje, o una combinación de los mismos unida al mismo.

44. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-38 o 39-43 en el que dicho efecto detectable se detecta por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de spin electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, procedimientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

45. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-44 en el que dicho sustrato comprende una parte detectable y una parte interruptora, en el que tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, un efecto detectable proporcionado por dicha parte detectable aumenta o se reduce.

46. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-45 en el que dicha modificación se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, instalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

47. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-46 en el que dicho al menos un efecto detectable adicional es detectable de forma independiente.

48. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-46 en el que cada uno de los sustratos adicionales son el mismo, diferentes o una combinación de los mismos.

49. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-46 en el que al menos uno de cada sustrato adicional se une a un soporte insoluble de modo que solamente una de una parte detectable y una parte interruptora del sustrato adicional permanece unida al soporte cuando dicho sustrato adicional se modifica por dicha MNAzima adicional.

50. El procedimiento de la reivindicación 22 que comprende adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos dicho primer sustrato unido al mismo, dicho primer sustrato es capaz de modificarse por dicha MNAzima, en el que dicho primer sustrato comprende adicionalmente al menos una tercera molécula que comprende al menos una primera enzima catalíticamente activa que se libera tras la modificación de dicho primer sustrato por dicha primera MNAzima.

51. El procedimiento de la reivindicación 50 que comprende adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un segundo sustrato unido al mismo, dicho segundo sustrato escindible por dicha primera enzima catalíticamente activa comprendiendo dicho segundo sustrato al menos una cuarta molécula que comprende al menos un resto detectable que se libera a través de la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima; y

(a) en el que dicha primera enzima catalíticamente activa modifica una pluralidad de dicho segundo sustrato liberando de este modo una pluralidad de restos detectables

(b) en el que dichos restos detectables son detectables después de modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima catalíticamente activa y;

(c) en el que la detección de dichos restos detectables es indicativa de la presencia de dicho facilitador de ensamblaje.

52. El procedimiento de la reivindicación 51 en el que dichos restos detectables comprenden adicionalmente una segunda enzima catalíticamente activa adicional capaz de modificar dicho primer sustrato liberando de este modo enzima catalíticamente activa adicional.

53. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52 en el que al menos una de dicha primera o dicha segunda enzimas catalíticamente activas se selecciona del grupo que comprende MNAzimas, ADNzimas, ribozimas, enzimas hidrolíticas, endonucleasas de restricción, exonucleasas, proteasas, proteinasas, hidrolasas, liticasas, peptidasas, dipeptidasas, esterasas, caspasas, catepsinas, desulfhidrasas, amidasas, glucosidasas.

54. Un procedimiento para preparar una pluralidad de enzimas de ácido nucleico multicomponentes (MNAzimas) que reconocen cada una al menos un facilitador de ensamblaje y modifican un sustrato, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar una pluralidad de facilitadores de ensamblaje a identificar, detectar o cuantificar,

(b) diseñar dos o más componentes oligonucleotídicos en los que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador de ensamblaje para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) catalíticamente activa, en que cada uno de los al menos primer y segundo componentes oligonucleotídicos comprende una parte de rama de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de rama sensora, en el que tras el autoensamblaje, la parte de rama sensora del primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman ramas sensoras de la MNAzima, la parte de rama de sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman ramas de

sustrato de la MNAzima y la parte del núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de la MNAzima;

y en el que las ramas sensoras de la MNAzima interaccionan con un facilitador de ensamblaje de modo que mantienen el primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para asociación de sus partes de núcleo catalítico respectivas para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, dicho núcleo catalítico capaz de actuar en al menos un sustrato, y en el que las ramas de sustrato de la MNAzima se unen a un sustrato de modo que el núcleo catalítico de la MNAzima pueda modificar dicho sustrato;

(c) alterar dichos dos o más componentes oligonucleotídicos de modo que la parte de rama de sustrato y la parte de núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos sea constante y la parte de rama sensora de al menos uno del primer y segundo componentes oligonucleotídicos se adapte para reconocer otro de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje y

(d) repetir la etapa de alteración para cada uno de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje.

55. Uso de al menos un oligonucleótido como un sustrato de enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) en el que dicho sustrato se modifica por dicha MNAzima después de la unión de dicho sustrato por las ramas de sustrato de dicha MNAzima.

56. Un procedimiento para fabricar MNAzimas que incorporan secuencias parciales de una ADNzima; ensayando las secuencias de núcleo catalítico parcial derivadas de un núcleo catalítico de ADNzima que, tras la incorporación en partezimas, generan MNAzimas funcionalmente activas; o identificando qué posiciones dentro de una secuencia de núcleo catalítico de ADNzima son adecuadas para dividir en secuencias de núcleo catalítico parcial que, tras la incorporación en partezimas, dan como resultado MNAzimas funcionalmente activas; comprendiendo dicho procedimiento:

a) dividir la secuencia de núcleo catalítico de dicha ADNzima;

b) incorporar las secuencias de núcleo catalítico parcial resultantes en partezimas; y

c) detectar actividad de MNAzima funcional en presencia de un facilitador de ensamblaje para determinar qué combinación de dichas secuencias de núcleo catalítico parcial en dichas partezimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.

Figura 1

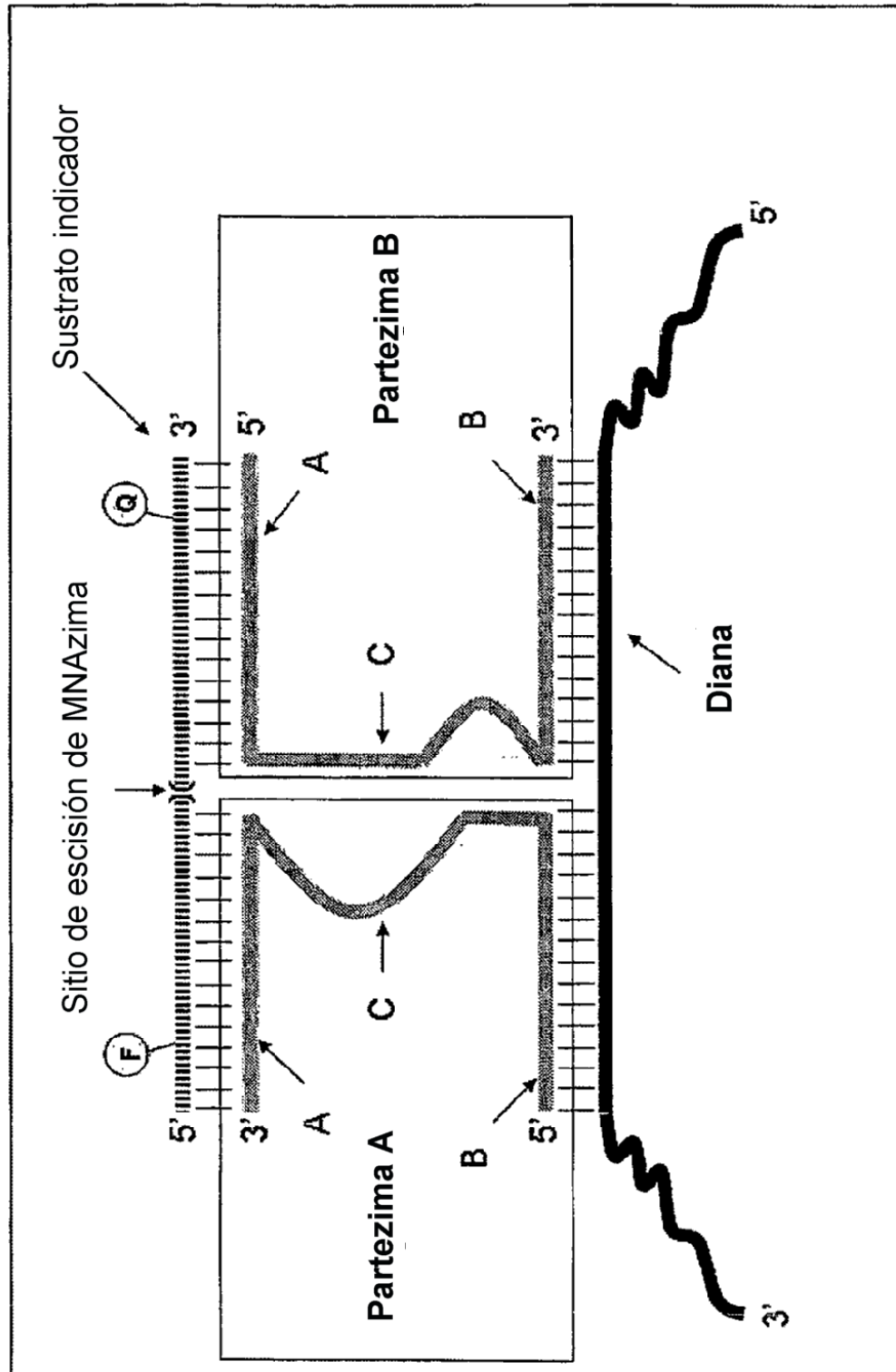


Figura 2

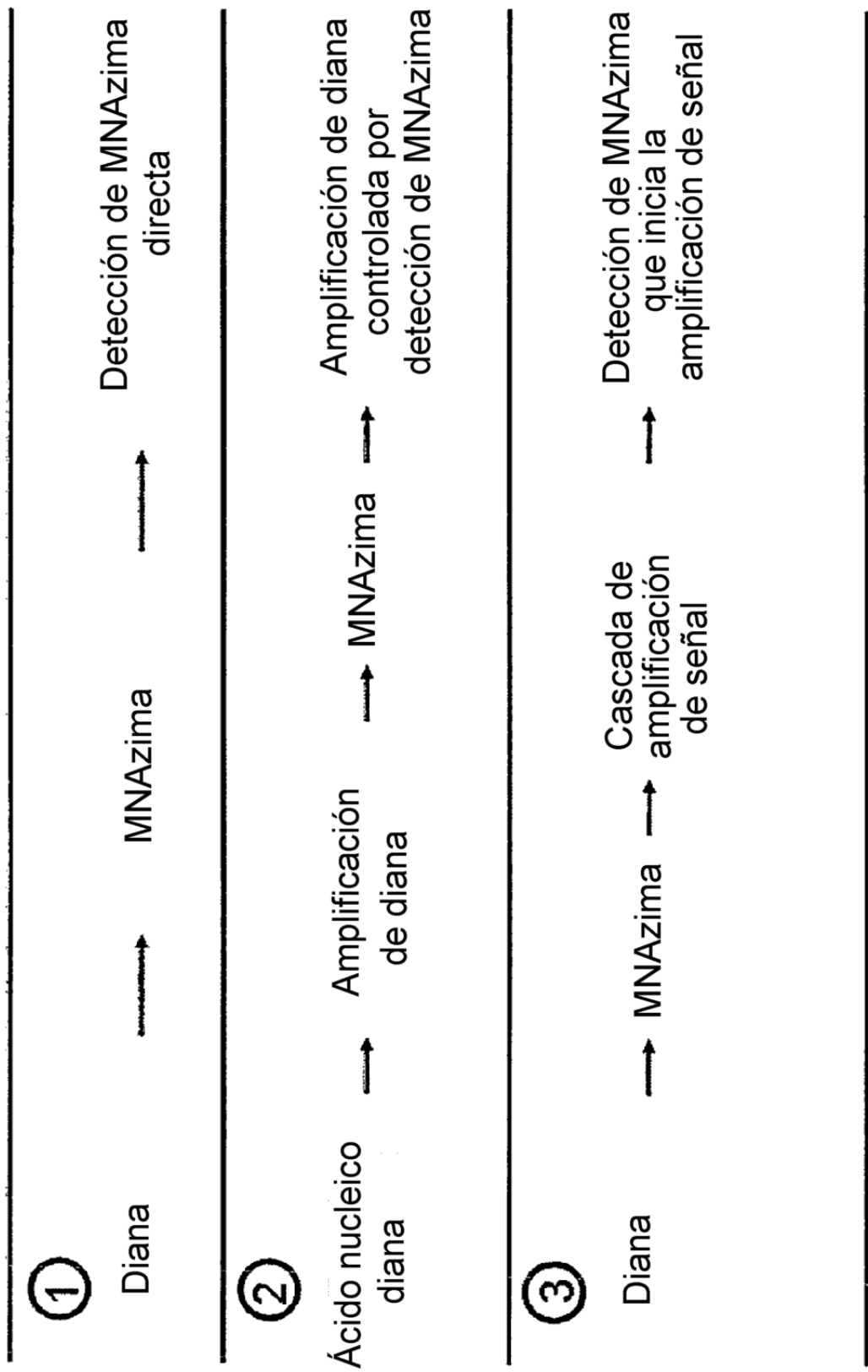


Figura 3

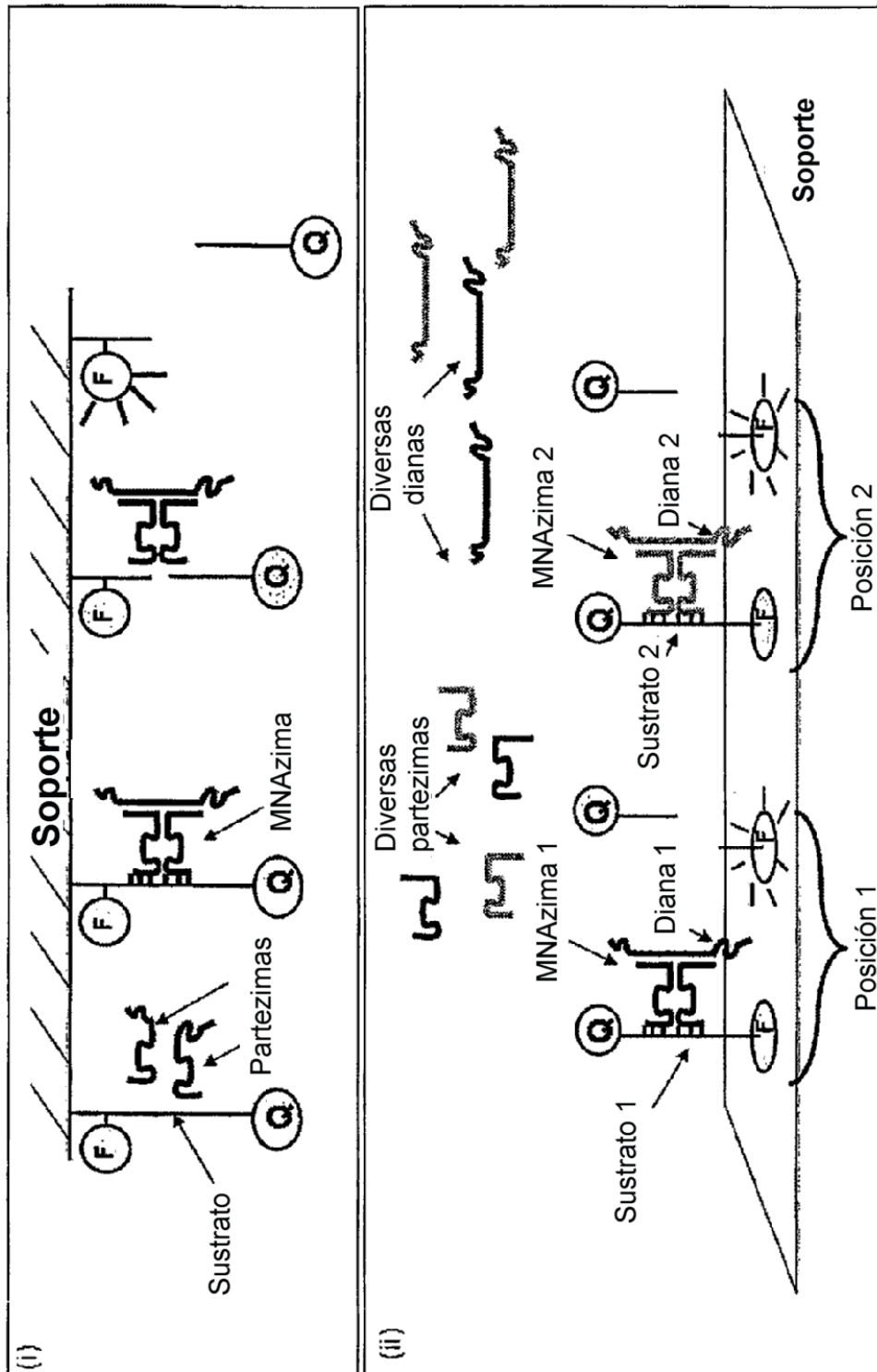


Figura 4

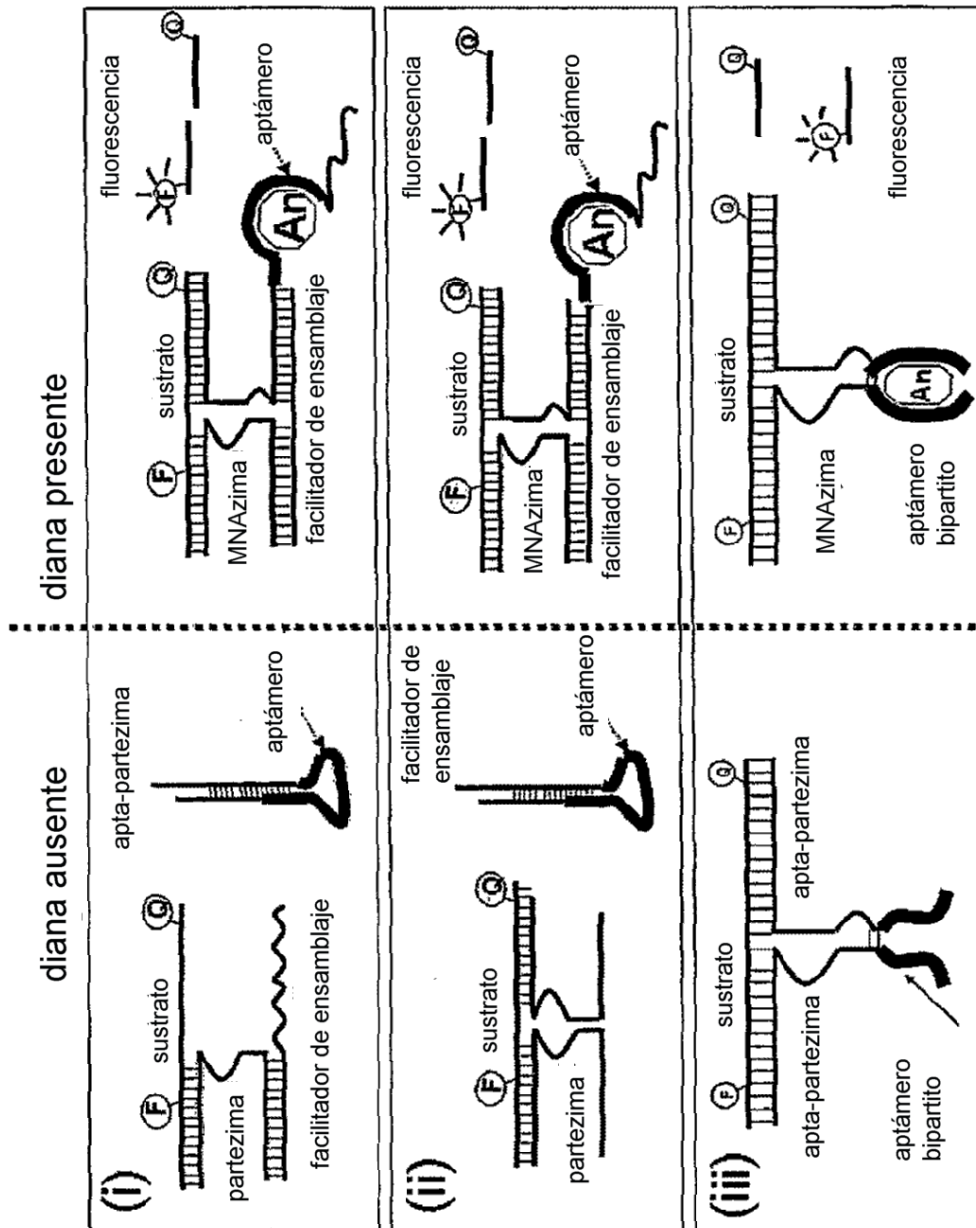


Figura 5

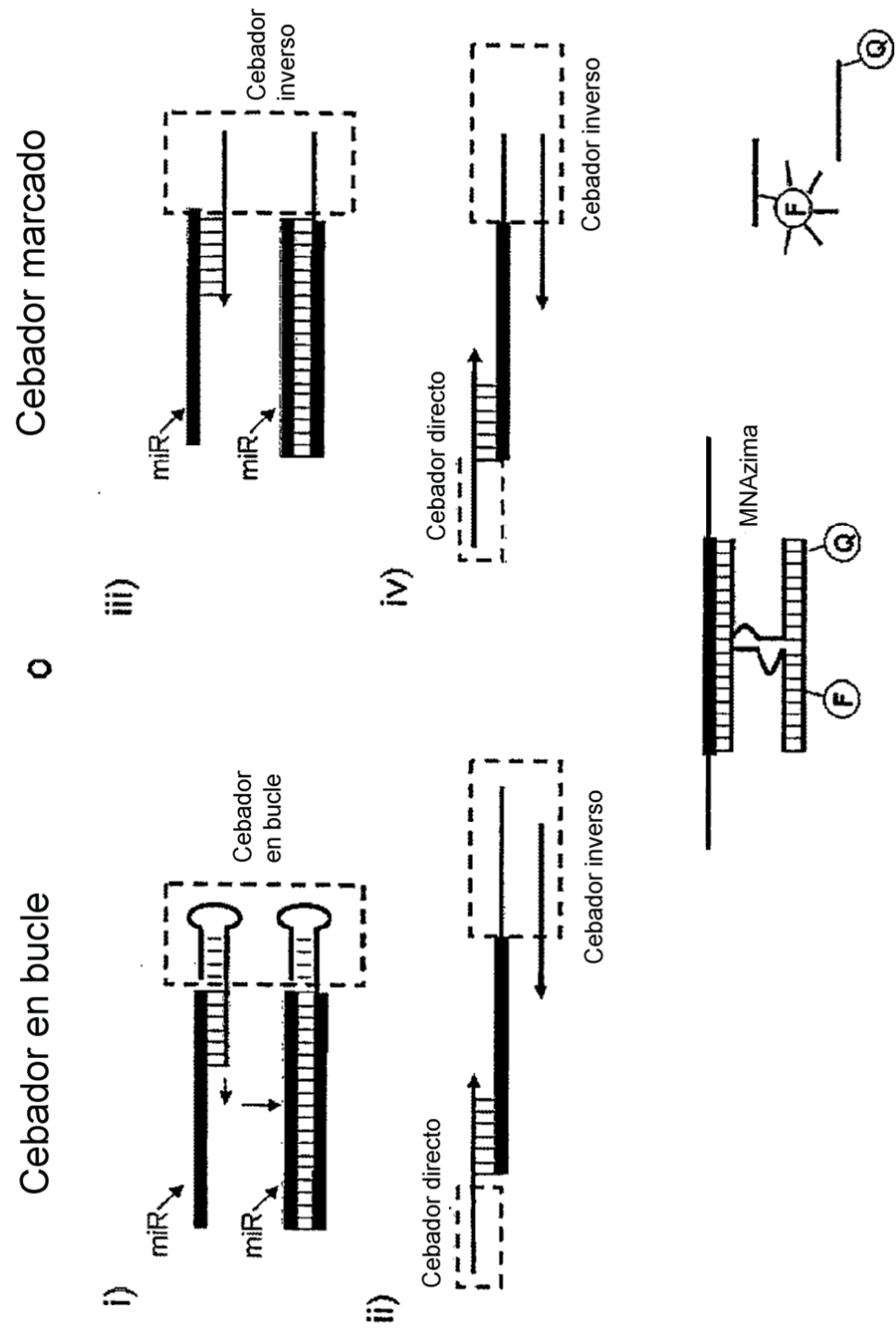


Figura 6

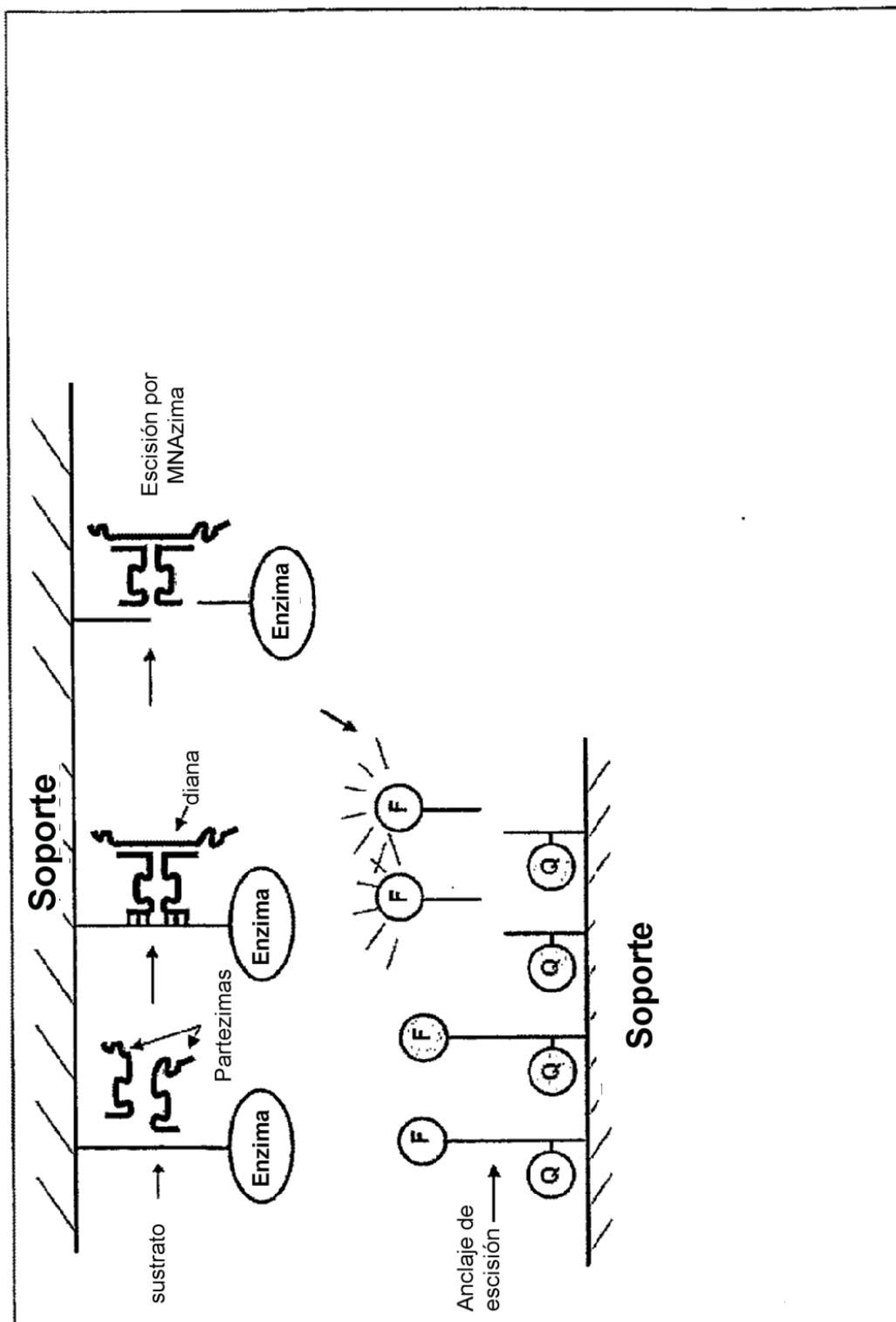


Figura 7

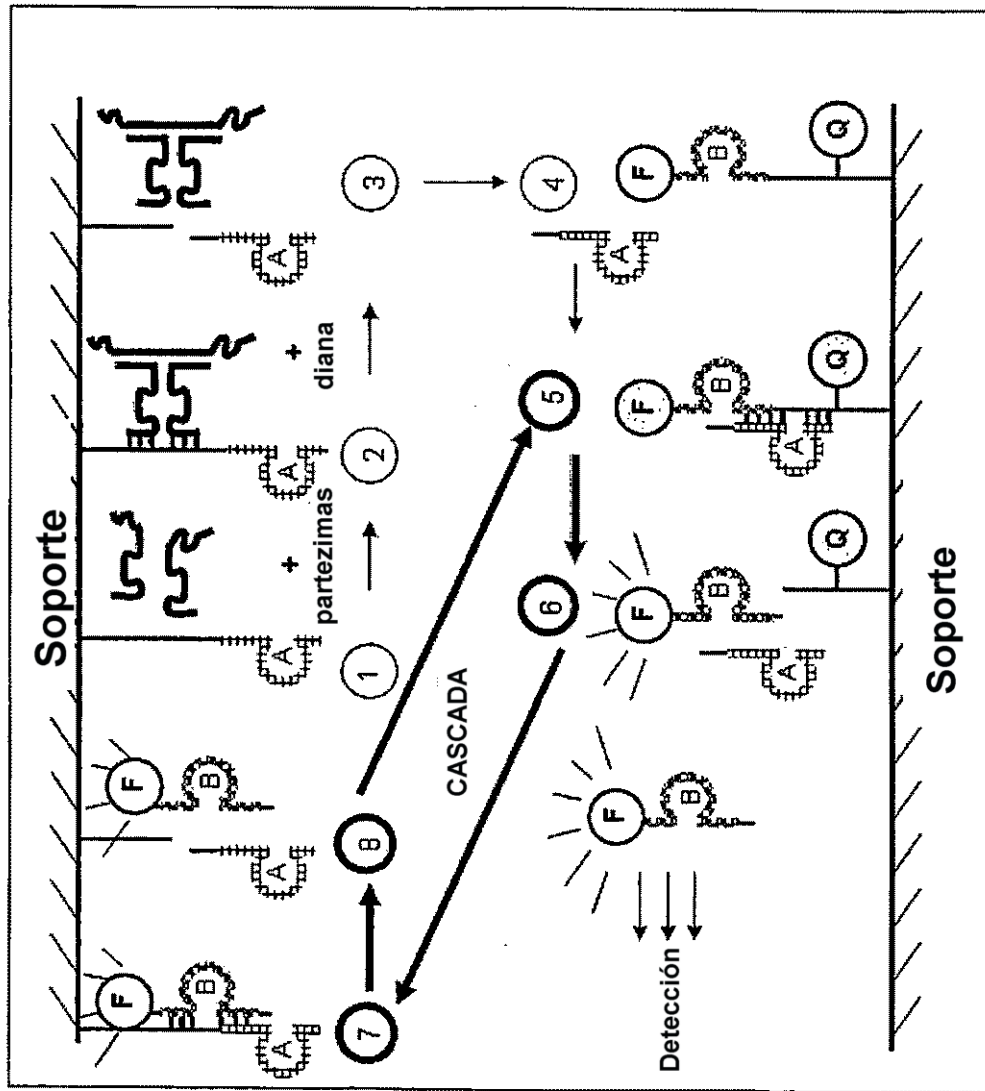


Figura 8

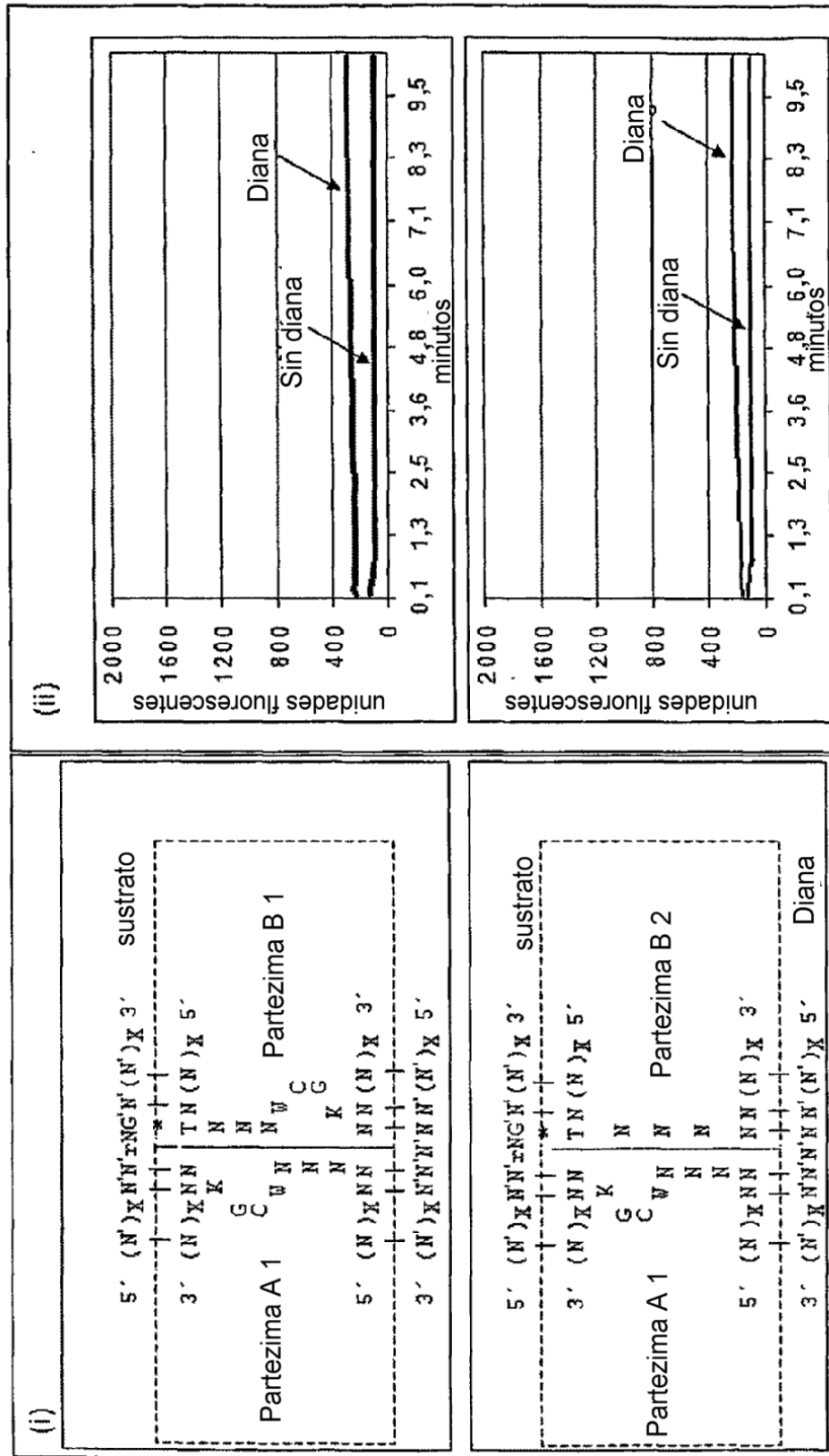


Figura 9

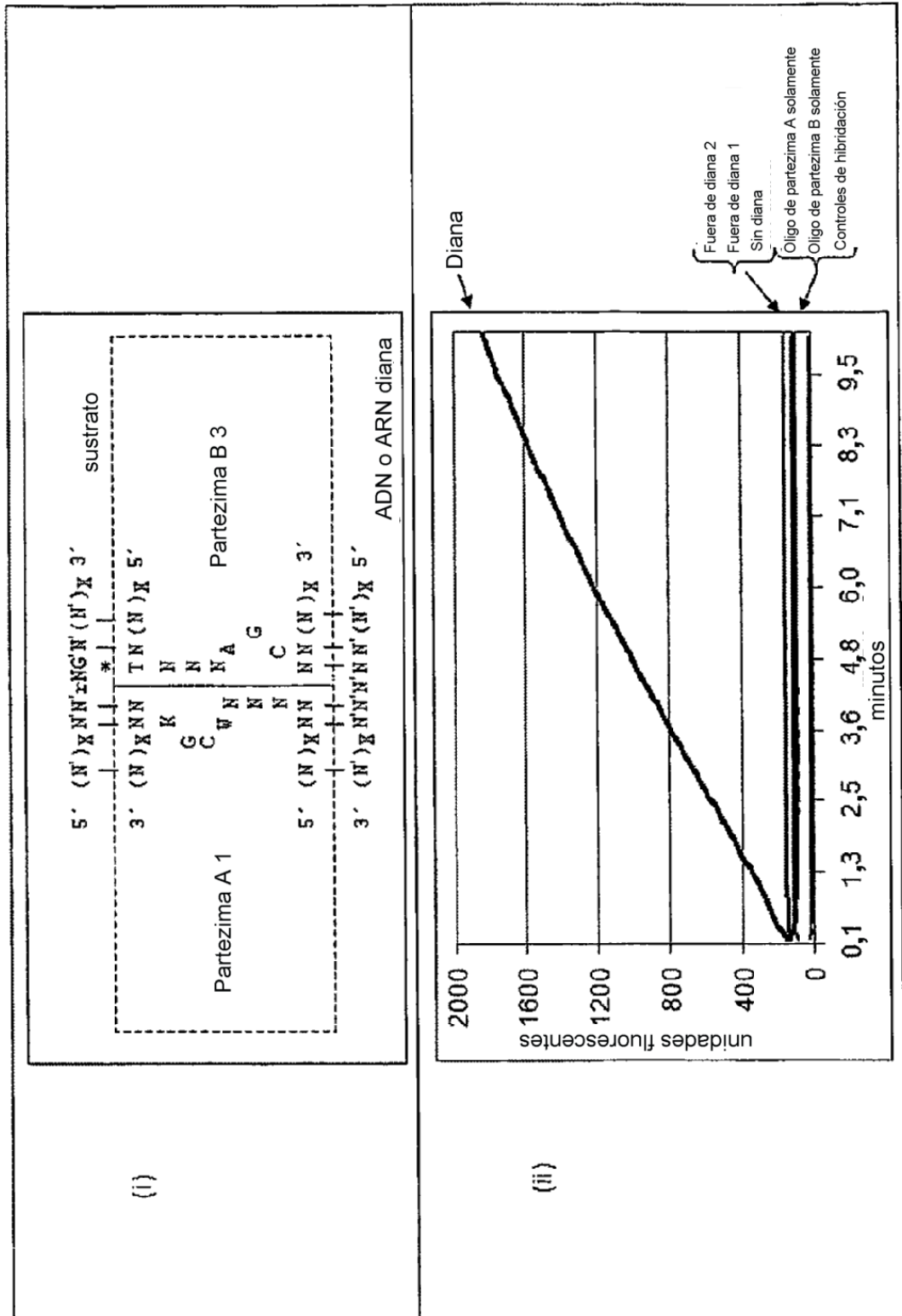


Figura 10

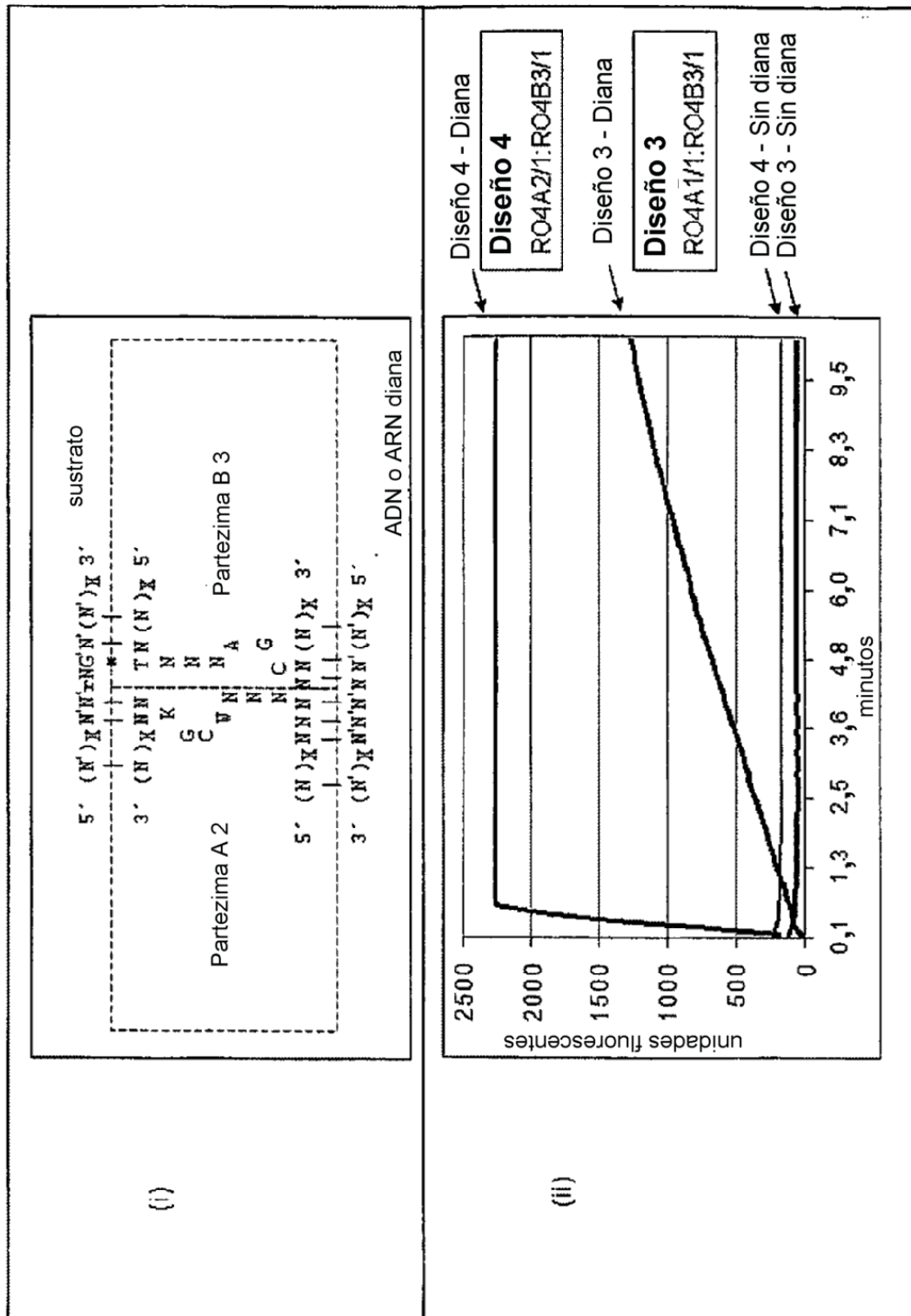


Figura 11

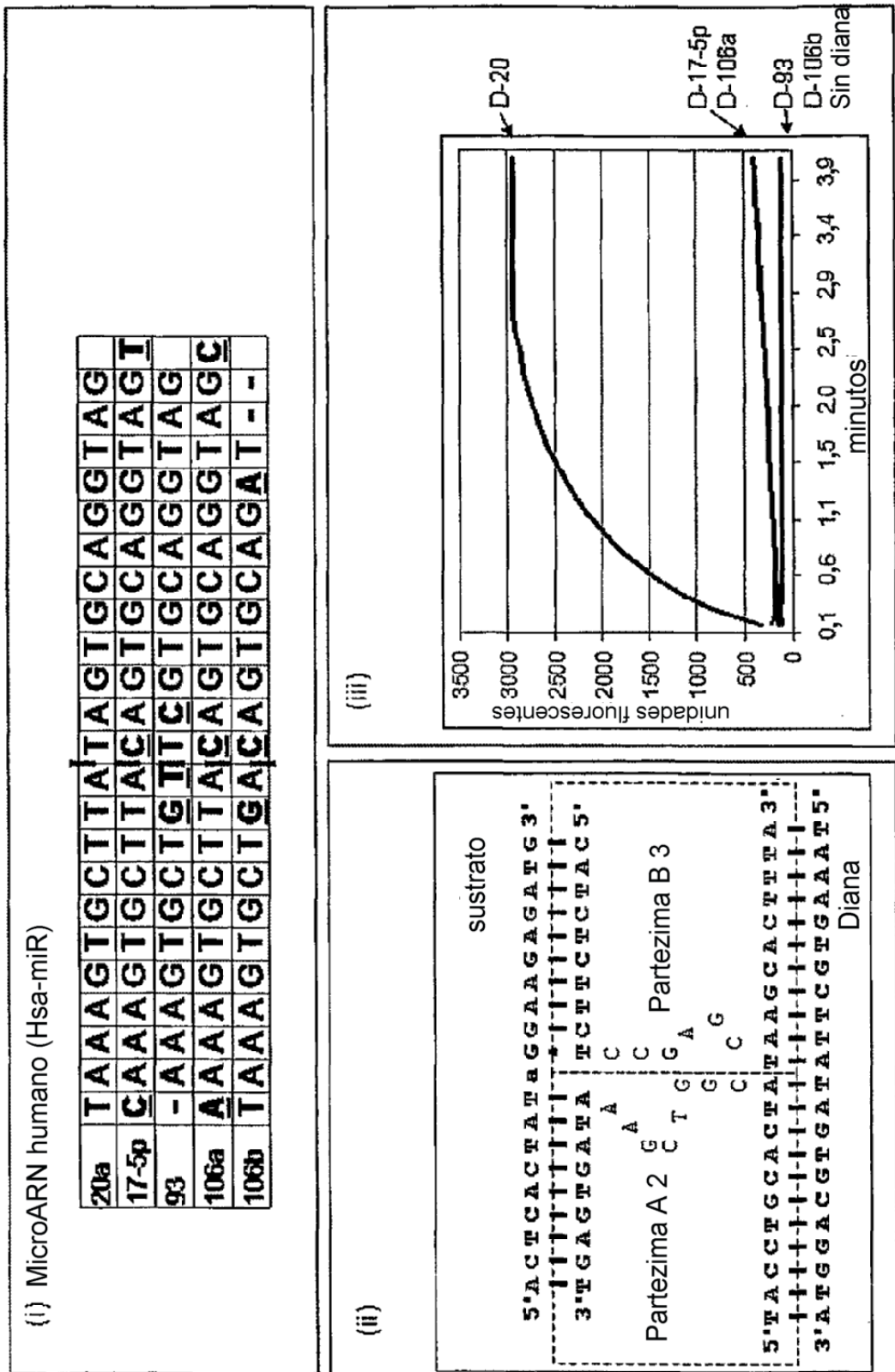


Figura 12

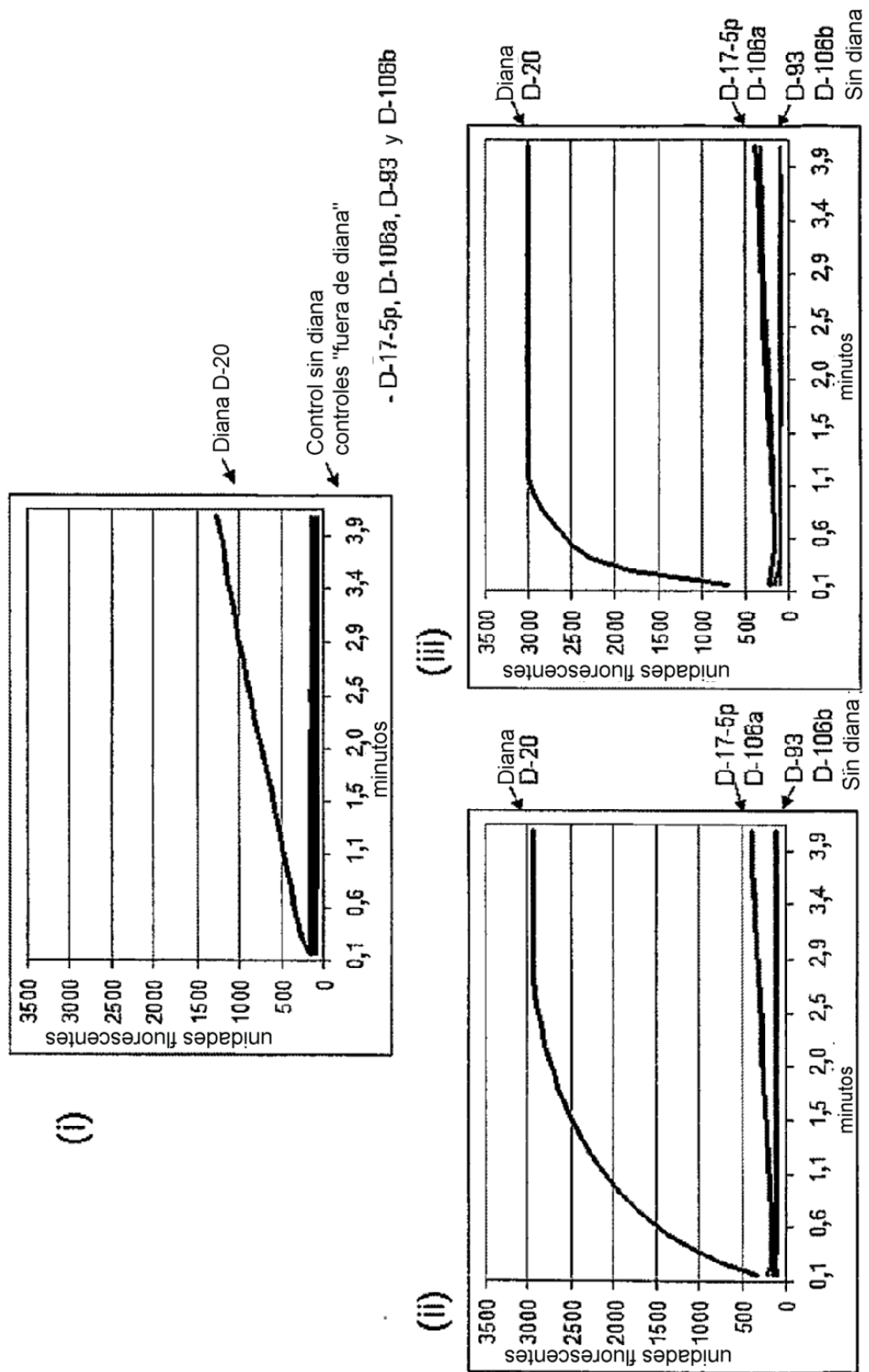


Figura 13

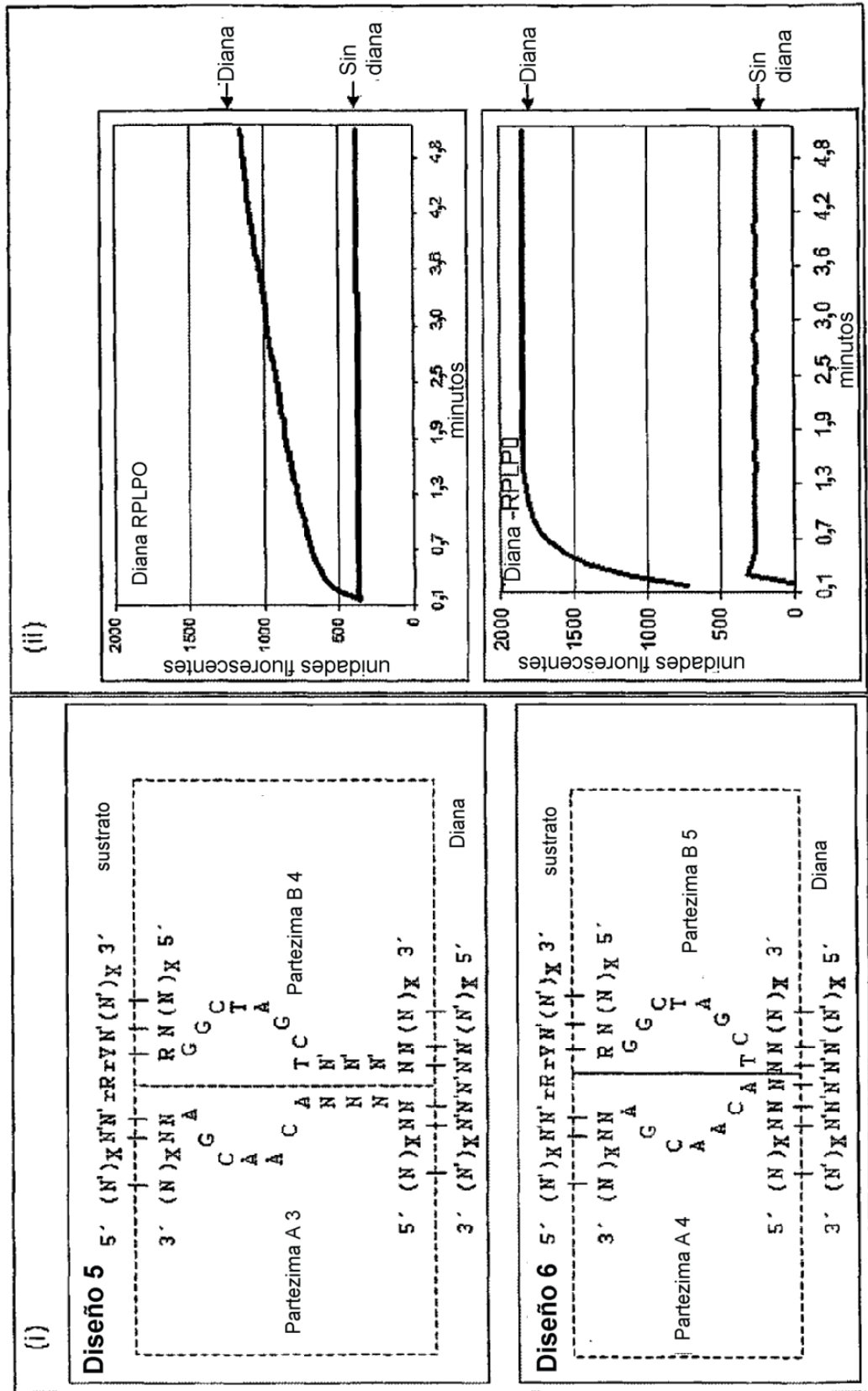


Figura 14

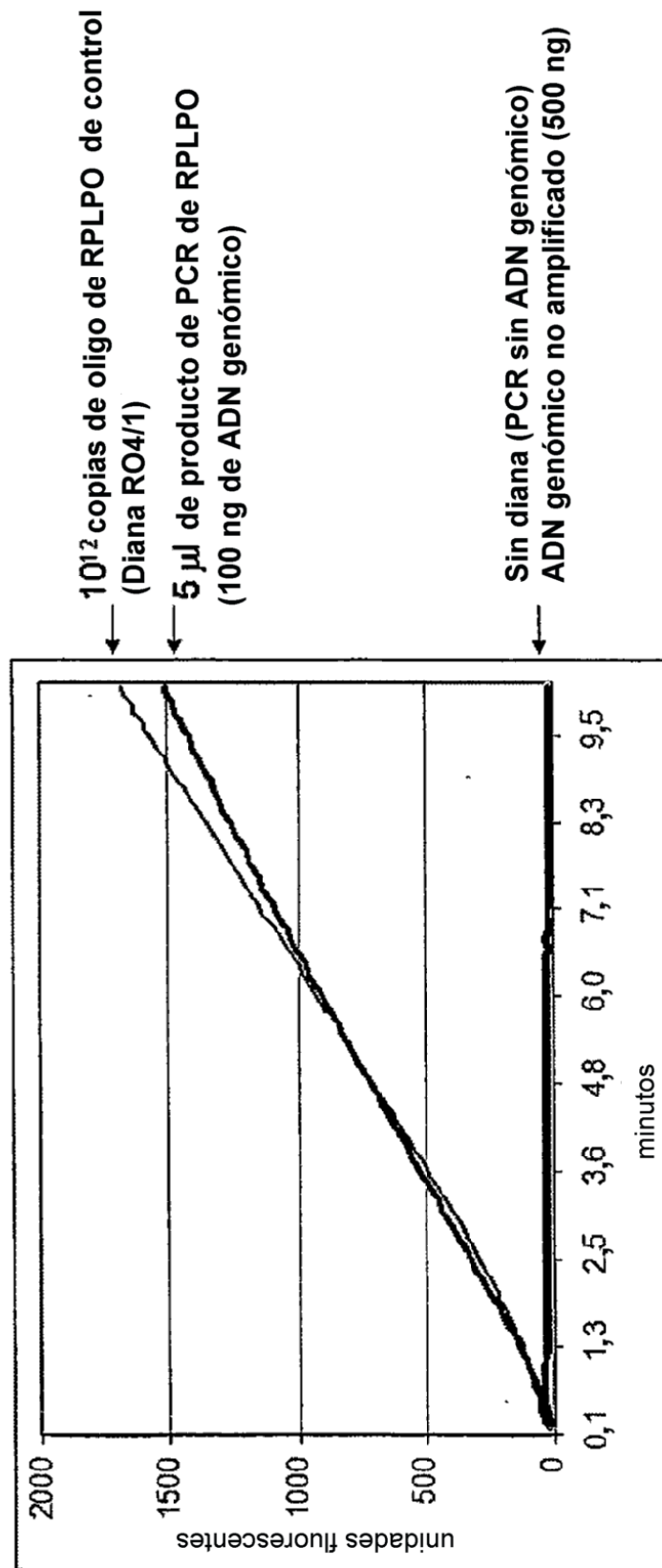


Figura 15

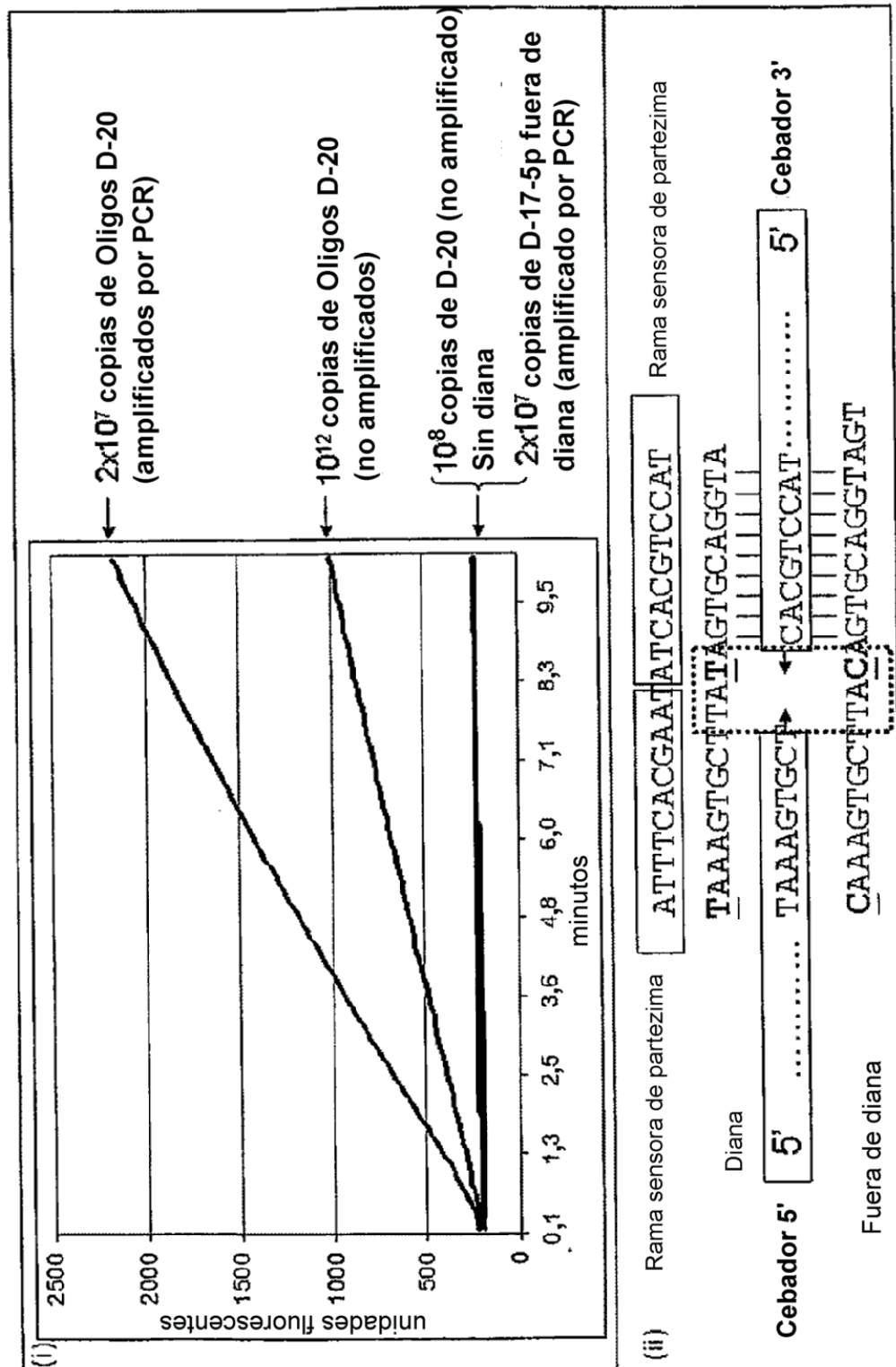


Figura 16

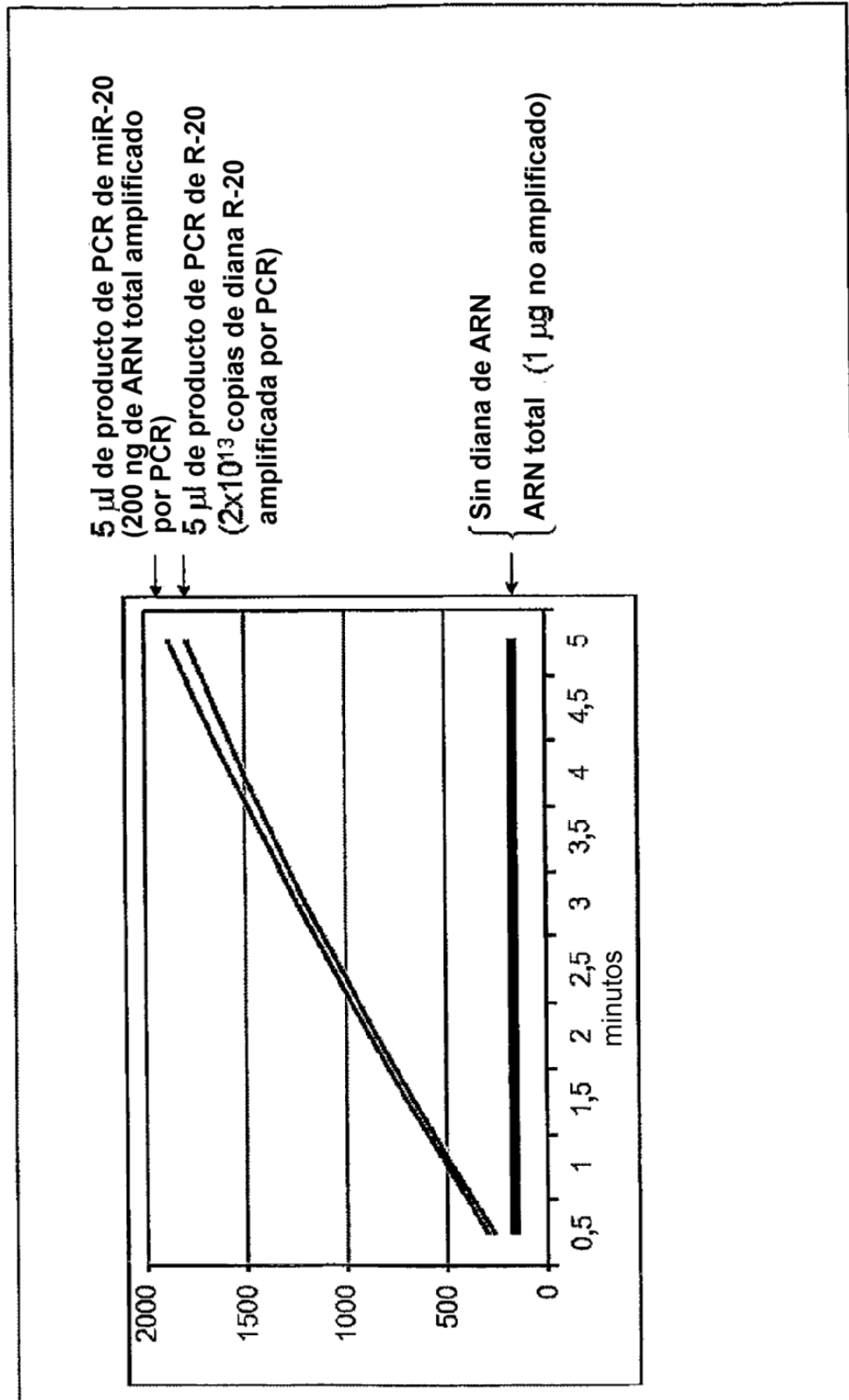


Figura 17

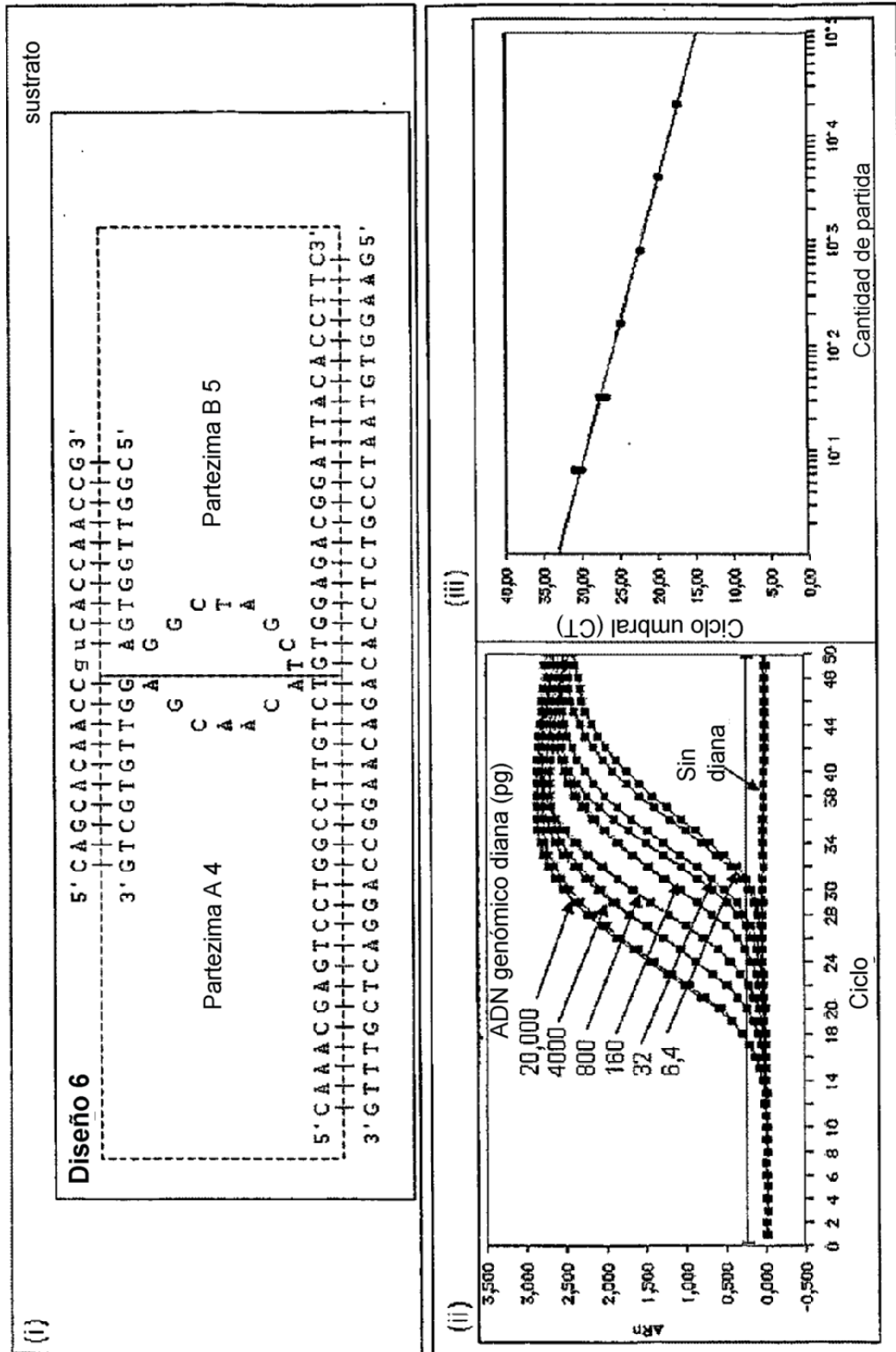


Figura 18

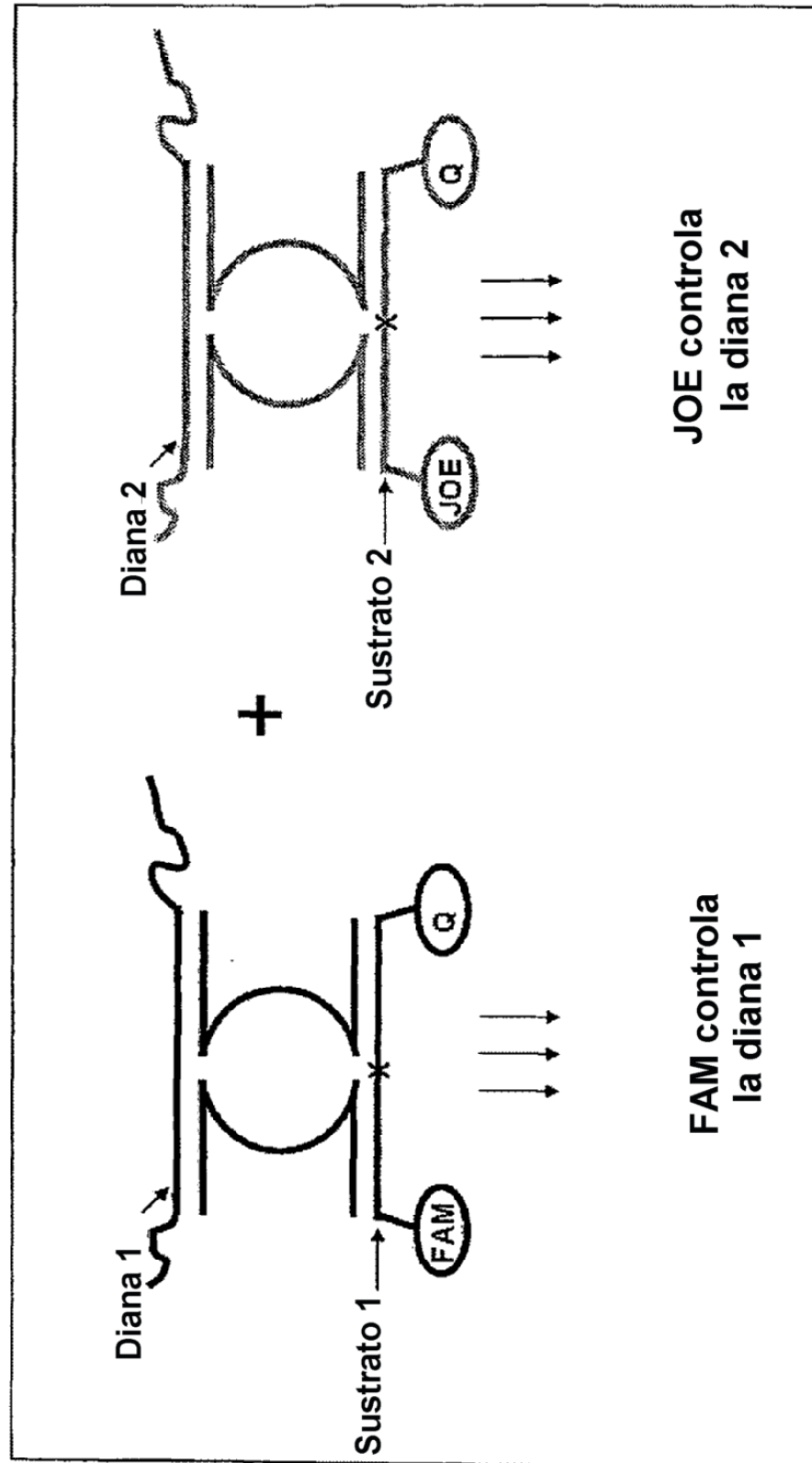


Figura 19

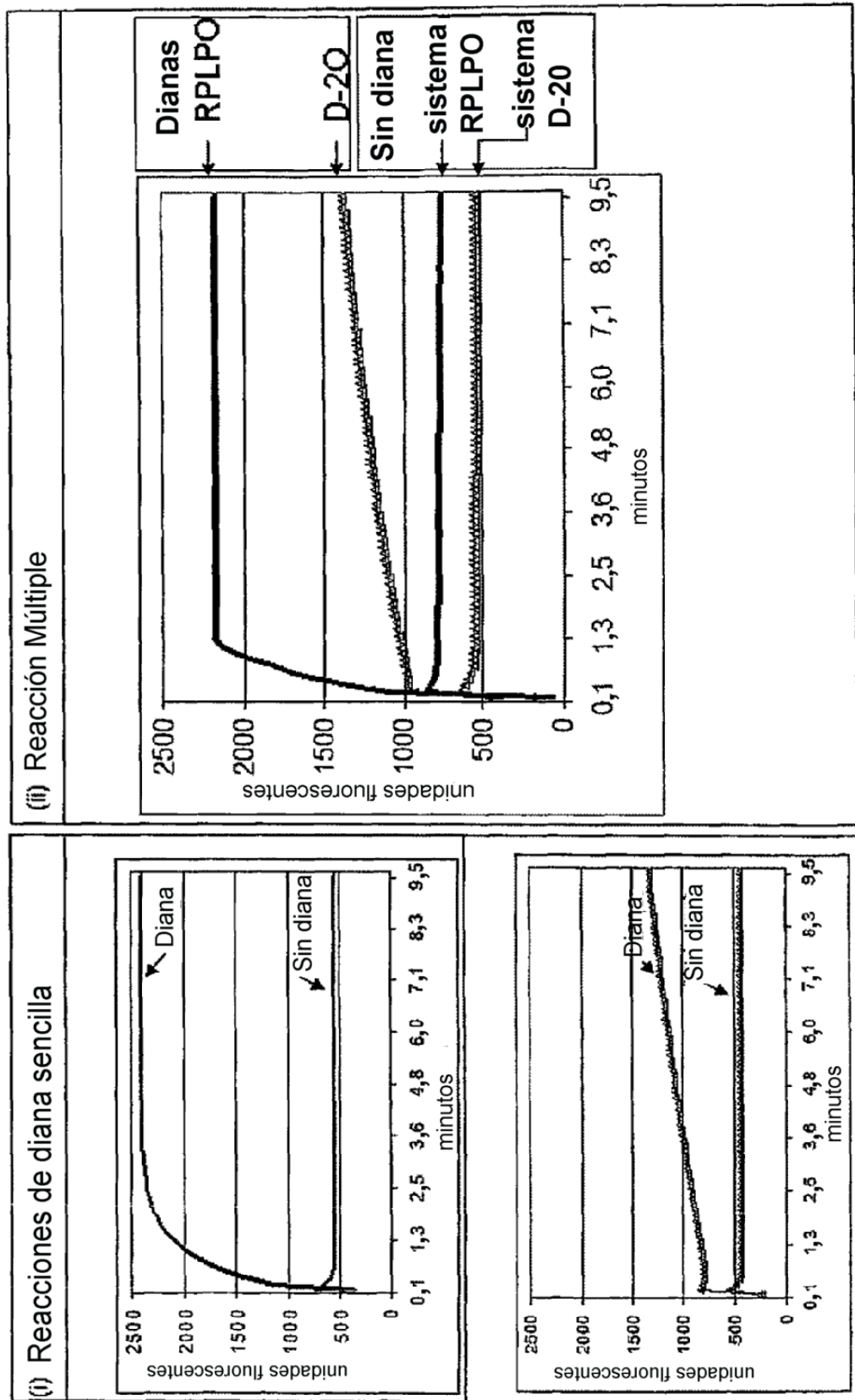


Figura 20

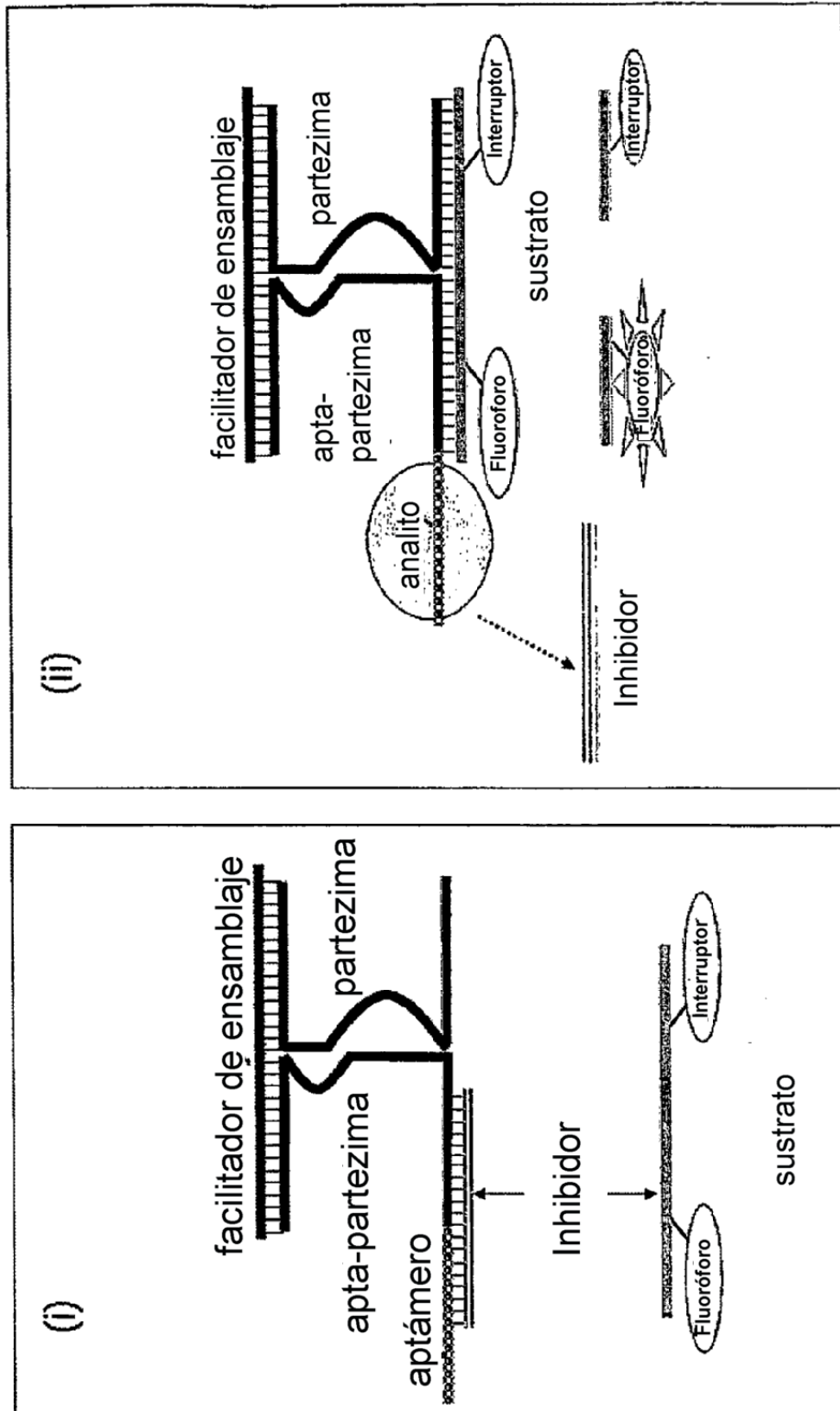


Figura 21

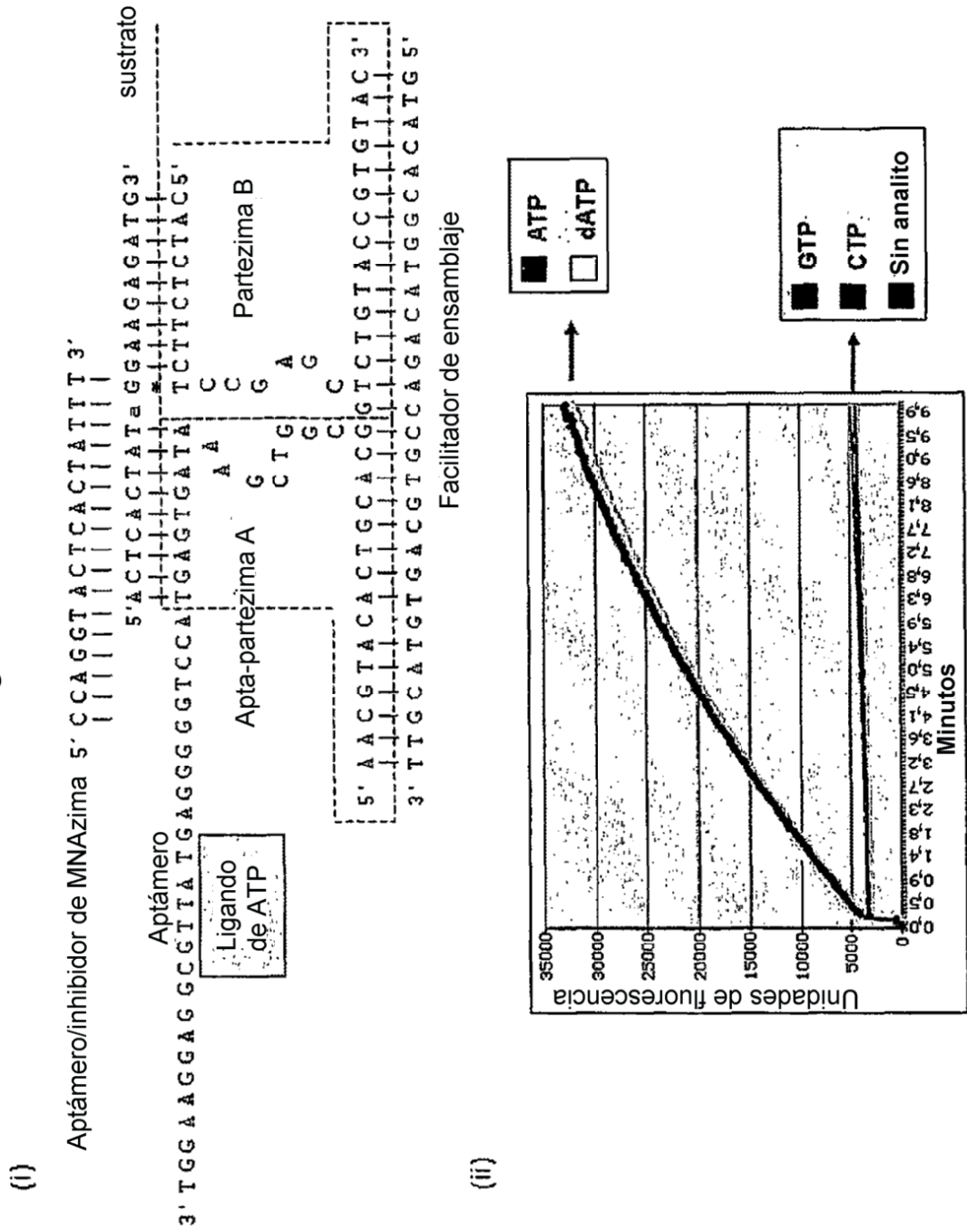


Figura 22

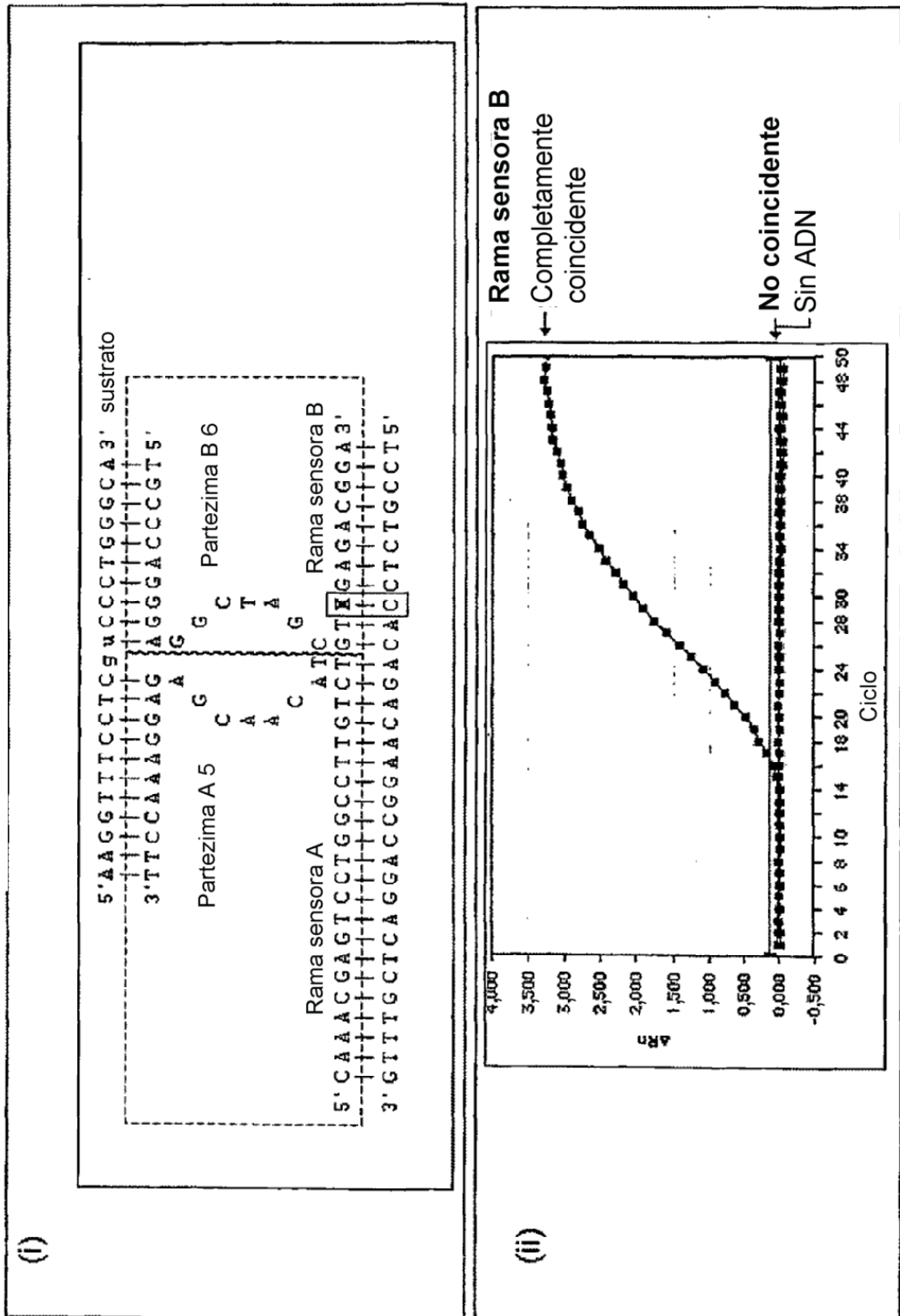


Figura 23

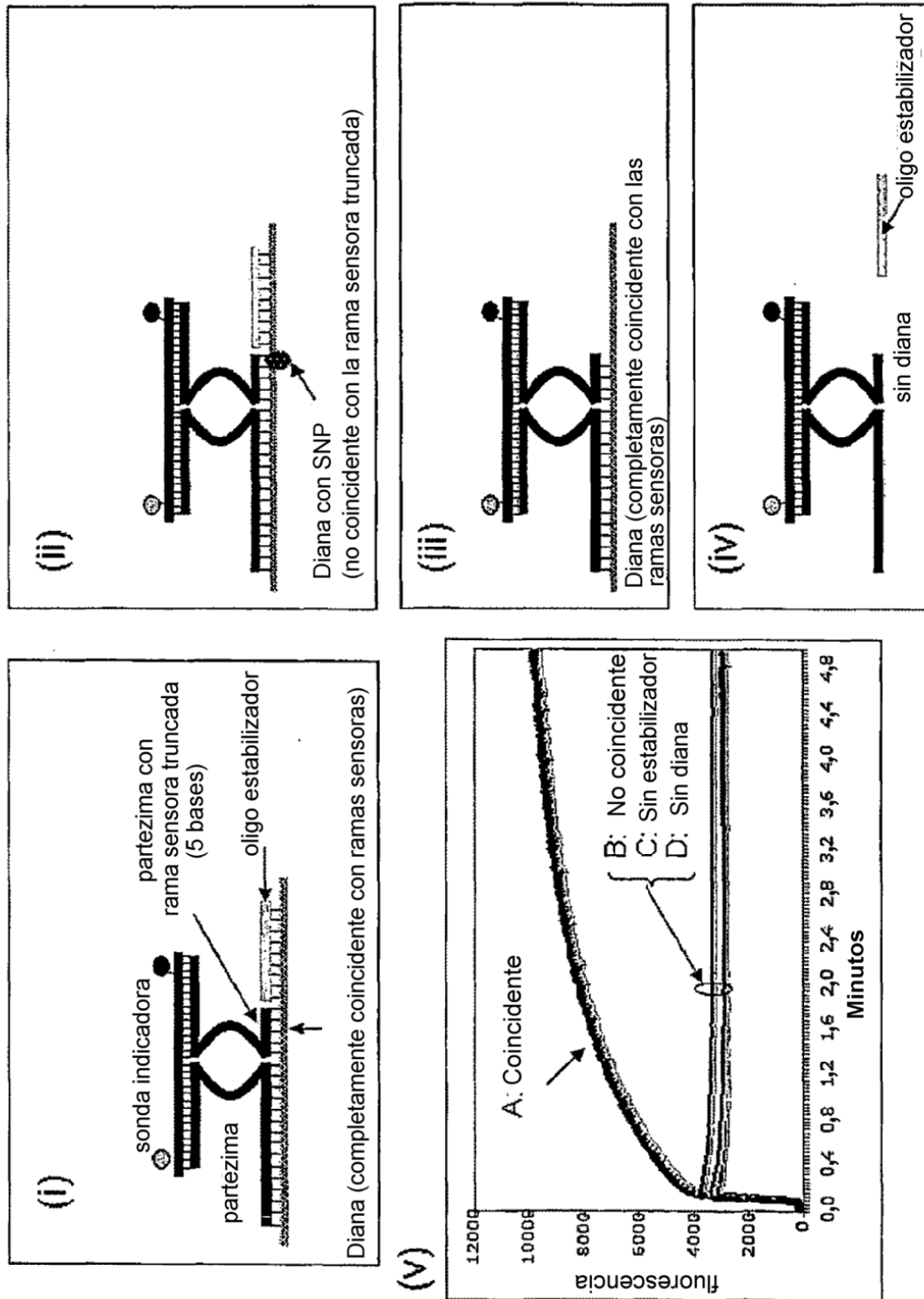


Figura 24

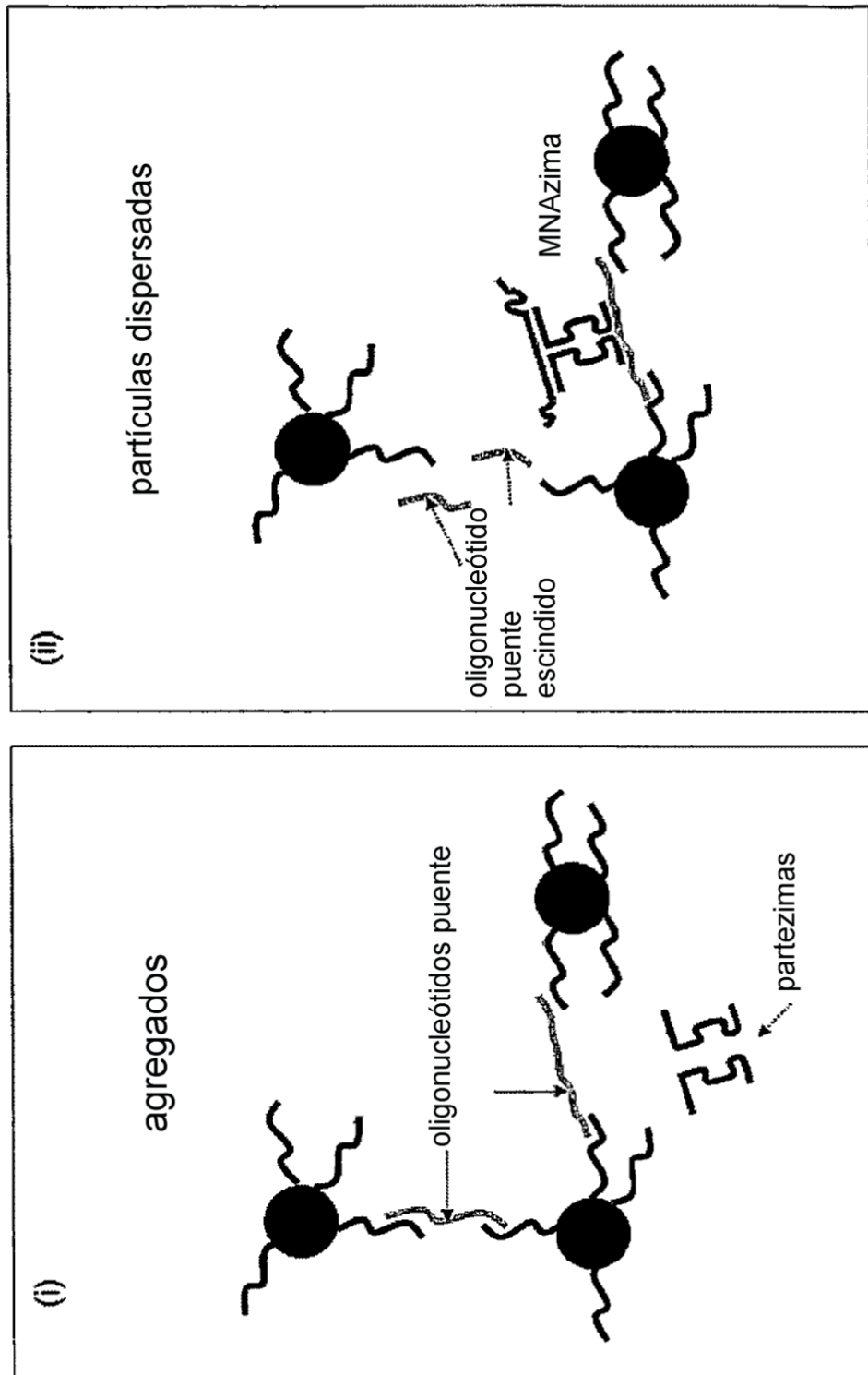


Figura 25

